



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

Regulação transcricional de genes de hidrolases em fungos filamentosos: sistemas PacC/CreA em *Humicola grisea* var. *thermoidea* e sistema Xyr1 em *Trichoderma reesei*.

Thiago Machado Mello de Sousa

Orientação: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca

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

Brasília, 2012

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Biologia Celular da Universidade de Brasília, sob orientação do Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca, com co-orientação da Profa. Dra. Ildinete Silva Pereira e no Laboratório de Tecnologia do Gene da *Technische Universität Wien* sob co-orientação do Prof. Dr. Robert Ludwig Mach.

Thiago Machado Mello de Sousa

Regulação transcricional de genes de hidrolases em fungos filamentosos: sistemas PacC/CreA em *Humicola grisea* var. *thermoidea* e Sistema Xyr1 em *Trichoderma reesei*.

Brasília, 04 de maio de 2012

Orientador: Prof. Dr. Marcio José Poças Fonseca, Universidade de Brasília (UnB).

Examinador externo: Profa. Dra. Nilce Maria Martinez-Rossi, Universidade de São Paulo, *campus* Ribeirão Preto (USP-Ribeirão Preto).

Examinador externo: Dr. João Ricardo Moreira de Almeida, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Agroenergia (Embrapa Agroenergia).

Examinador interno: Profa. Dra. Sônia Maria de Freitas, Universidade de Brasília (UnB).

Examinador interno: Prof. Dr. Edivaldo Ximenes Ferreira Filho, Universidade de Brasília (UnB).

Suplente: Prof. Dr. Marcelo de Macedo Brígido, Universidade de Brasília (UnB).

Agradecimientos

À querida Tatiana, minha esposa e maior incentivadora deste trabalho. A única pessoa que sabe da real dimensão de como foi complicado todo o processo, desde as noites em claro, dos finais de semana no laboratório, dos feriados inexistentes e do ano que passamos longe um do outro. Obrigado, pequena! Sem seu apoio, nada disso teria acontecido! *Ich liebe dich mein Schatz!*

À minha família, meus pais, Kátia e José Orlando, e meus irmãos, Saulo e Carolina. Obrigado pelo apoio incondicional e pela eterna torcida! Mesmo de longe, o amor de vocês me ajudou a superar muitos obstáculos!

Aos professores Marcio e Ildinete, pela orientação ao longo desses anos, pelo aprendizado, discussões, oportunidades, confiança e amizade. Vocês são demais!

Aos professores Robert Mach e Astrid da TU-Wien. *Vielen Dank für Ihren herzlichen Empfang, Vertrauen und Chancen. Die Zusammenarbeit mit Ihnen war ein einmaliges Erlebnis in meinem Leben! Danke für die interessante Themenstellung, die stete Förderung dieser Arbeit und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen.*

Aos queridos professores Cynthia, Andréa, Marcelo e César (*in memoriam*), não só pelos ensinamentos, mas também pelos conselhos, apoio, companheirismo e amizade. Vocês são parte importante da minha formação!

Aos queridos amigos que ainda estão ou já passaram pelo Lab 3: Lorena, Eveline, Marciano, Caliandra, Luciano, Sérgio e Luciana. Aos ex-estagiários Bárbara, Natália, Mariana, Celiane e Antônio e toda essa meninada da nova geração que está chegando com todo o gás para trabalhar! Obrigado pelas conversas, sugestões, discussões, brincadeiras, butecadas e tudo mais!

Obrigado especial a Rafael, Luciano e Andréa pelas desventuras em série em Amsterdam e Berlim!

Aos amigos de outros laboratórios, Túlio, Viviane, Nádia, Hugo e Marcus. Aos

demais amigos, colegas e professores da Biomol! Da moçada antiga à nova! Obrigado por um ambiente descontraído, pelas discussões e auxílio! Em especial à Fátima, Ivanildes e Thompson. Sem vocês, aquele laboratório simplesmente não funciona!

Eine besondere Danksagung an Barbara, Rita, Christian, Nikolin, Julia und Birgit. Liebe freunde aus TU-Wien, ihr seid einfach wunderbar! Danke viel mals für absolut alles! Ich can auch nicht vergessen den anderen Collegen des TU-Wien, Georg, Rene, Nathalie, Simone und Gaby. Für die sehr nette Zusammenarbeit und die Unterstützung bei jeder Gelegenheit möchte ich mich herzlich bei euch dafür bedanken.

Agradeço aos membros da banca por gentilmente disporem de seu tempo para avaliar meu trabalho.

Aos queridos amigos da *Brotherhood*! Vocês não fazem idéia com o que eu trabalho, mas sempre me apoiaram!

Ao Pink Floyd, Anathema, Tingo's, DMB, NIN, Led Zeppelin, Motörhead, The Who, Deodato, ACDC, Black Keys, Caro Emerald, Imelda May, Morphine, Sugar Pie DeSanto, Lynyrd Skynyrd, Ramones, Rancid, Sivuca, Baden Powell, Francisco Tárrega, Joaquín Rodrigo, Cartola, entre outros, pela indispensável companhia durante as solitárias noites e finais de semana na TU-Wien!

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Índice

Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas.....	x
Abreviaturas e Siglas.....	xi
Resumo.....	xviii
Abstract.....	xvi

Capítulo 1: *Investigação do mecanismo de regulação transcricional mediada pelo pH ambiental em Humicola grisea var. thermoidea*

1. Introdução.....	2
1.1 A biomassa vegetal.....	3
1.2 Estrutura da celulose, xilana e enzimas responsáveis por sua degradação.....	4
1.3 A regulação transcricional mediada pelo pH ambiental.....	5
1.4 O pH e a regulação transcricional de enzimas do complexo lignocelulolítico.....	8
1.5 A repressão por carbono.....	9
1.6 <i>Humicola grisea</i> como modelo de estudo.....	11
2. Objetivo e Metas.....	13
2.1 Objetivo.....	14
2.2 Metas propostas.....	14
3. Metodologia.....	15
3.1 Condições de cultivo de <i>H. grisea</i>	16
3.2 Clonagem do gene <i>pacC</i>	17
3.3 Extração de RNA, transcrição reversa e análise por PCR em tempo real.....	18
3.4 Análise in silico das regiões 5' UP.....	19
3.5 Produção das proteínas de fusão.....	19
3.6 Ensaio de pull-down para DNA.....	20
3.7 Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) – versão I.....	21
4. Resultados e Discussão.....	22
4.1 Análise da seqüência de <i>pacC</i>	23
4.2 Perfis de expressão dos genes de hidrolases e de fatores transcricionais.....	27
4.3 Análise in silico das regiões 5' UP.....	40
4.4 Análise in vitro da ligação de PacC e CreA a elementos em <i>cis</i>	41
5. Conclusão.....	49
6. Perspectivas.....	51
7. Referências Bibliográficas.....	53

Capítulo 2: Caracterização molecular de Xyr1 – o ativador global da expressão de hidrolases em *Trichoderma reesei*

1. Introdução.....	69
1.1 A degradação de xilana por <i>Trichoderma</i> : uma visão geral.....	70
1.2 A regulação da expressão de xilanases: diferentes indutores ativam genes distintos.....	71
1.3 Fatores transcricionais envolvidos na regulação dos genes de xilanases.....	74
2. Objetivo e Metas.....	76
2.1 Objetivo.....	77
2.2 Metas propostas.....	77
3. Metodologia.....	78
3.1 Clonagem e produção de rXyr1 e rXyr1 _{T577A}	79
3.2 Imunodeteção.....	80
3.3 Teste de solubilidade de rXyr1.....	80
3.4 Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) – versão II.....	81
3.5 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida azul nativo (2D BN-PAGE).....	83
3.6 Caracterização estrutural.....	83
4. Resultados e Discussão.....	85
4.1 Produção e purificação de rXyr1 e rXyr1 _{T577A}	86
4.2 Instabilidade de rXyr1 em solução.....	87
4.3 Topologia de Xyr1: um paralelo com XlnR.....	90
4.3.1 Domínio de ligação ao DNA.....	91
4.3.2 Sinal de localização nuclear e região em <i>coiled-coil</i>	103
4.3.3 Domínio de ativação transcricional.....	106
4.3.4 Fosforilação em rXyr1.....	106
4.3.5 Domínio responsivo à glicose.....	110
5. Conclusão.....	118
6. Perspectivas.....	118
7. Referências Bibliográficas.....	120
8. Anexos.....	133

Índice de Figuras

Capítulo 1:

Figura 1. Resumo da regulação pelo pH em <i>A. nidulans</i>	7
Figura 2. Seqüência do gene <i>pacC</i> de <i>H. grisea</i>	27
Figura 3. Similaridade da região correspondente ao DLD de PacC em <i>H.grisea</i> e <i>A. nidulans</i> (resíduos 99 a 187).....	28
Figura 4. Cultivo de <i>H. grisea</i> na presença de 1% de glicose (GLI) ou 0,1% de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e em diferentes condições de pH.....	35
Figura 5. Gel de poliacrilamida desnaturante a 12% corado com azul de Coomassie de 1 mL dos sobrenadantes de cultivo de <i>H. grisea</i>	36
Figura 6. Análise por PCR em tempo real da acumulação dos transcritos de (a) <i>pacC</i> e (b) <i>creA</i> após a mudança de pH ácido para alcalino.....	38
Figura 7. Ensaio de <i>pull-down</i> para ligação <i>in vitro</i> de PacC e CreA nas regiões 5' UP de genes de <i>H. grisea</i>	44
Figura 8. Ensaio de EMSA para as regiões 5' UP de <i>pacC</i> e <i>creA</i>	47

Capítulo 2:

Figura 1. Representação esquemática do papel central de Xyr1 na regulação de genes de enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de xilana ou celulose.....	73
Figura 2. Purificação e identificação de Xyr1 e suas versões mutantes.....	86
Figura 3. Espectros de CD na região do UV distante (200 – 260 nm) de 0,3 µM rXyr1e rXyr1 _{T577A}	88
Figura 4. Alinhamento das seqüências protéicas dos fatores Xyr1 de <i>T. reesei</i> e XlnR de <i>A. niger</i>	92
Figura 5. Similaridade da região correspondente ao DLD de Xyr1 (resíduos 98 a 124) com outros membros da família Zn(II) ₂ Cys ₆	93
Figura 6. Ensaio de EMSA: ligação de rXyr1 na região promotora de <i>xyn1</i>	95
Figura 7. Ensaio de EMSA: ligação de rXyr1 na região promotora de <i>xyn1</i> : confirmação da dimerização de rXyr1..	97
Figura 8. Espectros de CD de rXyr1 na região do UV distante (200 – 260 nm) na ausência e presença de DNA.....	98
Figura 9. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida azul nativo (2D BN-PAGE) para Xyr1 e Xyr1 _{T577A}	104
Figura 10. Ensaio de EMSA para a região promotora de <i>xyn1</i> : defosforilação de rXyr1.....	107
Figura 11. Espectros de CD na região do UV distante (200 – 260 nm) de 0.3 µM de rXyr1 e rXyr1 _{T577A}	108
Figura 12. Ensaio de EMSA para a região promotora de <i>xyn1</i> : interação de rXyr1T577A com a sonda pxyn1 WT...	109
Figura 13. Espectros de CD de 0,25 µM de rXyr1 na região do UV distante (200 – 260 nm) na presença de D-glicose e D-xilose.....	113
Figura 14. Ensaio de EMSA para a região promotora de <i>xyn1</i> : interação de rXyr1 com a sonda pxyn1 WT na presença de D-glicose e D-xilose.....	114

Índice de Tabelas

Capítulo 1:

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	17
Tabela 2. Análise por PCR em tempo real, da acumulação dos transcritos de genes de glicosil hidrolases e fatores transcricionais de <i>H. grisea</i>	29
Tabela 3. Possíveis sítios de ligação para PacC e CreA nas regiões 5' UP dos genes de <i>H. grisea</i>	40

Capítulo 2:

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.....	83
Tabela 2. Soluções tampão empregadas para solubilização de rXyr1.....	90
Tabela 3. Compilação dos dados de CD da interação de rXyr1 com fragmentos do promotor de <i>xyn1</i>	100

Abreviaturas e Siglas

[θ]: elipticidade residual molar
%: por cento
°C: grau Celsius
 λ : comprimento de onda
2D BN-PAGE: Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida azul nativo
5' UP: região 5' não codificadora a montante do gene
BCA: bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor
bHLH: hélice-alça-hélice
BSA: albumina sérica bovina.
bZIP: zíper de leucina
CD: espectroscopia de Dicroísmo Circular
cDNA: seqüência de DNA complementar
DAT: domínio de ativação transcricional
DLD: domínio de ligação ao DNA
DNA: ácido desoxirribonucléico
DNase: desoxirribonuclease
DOC: desoxicolato de sódio
E: coeficiente de extinção molar
EDTA: ácido etilenodiaminotetracético
EMSA: ensaio de retardo de mobilidade eletroforética
FAM: 6-carboxi-fluoresceína
g: aceleração gravitacional
GLI: D-glicose
GST: glutationa S-transferase
h: hora
HRP: *horseradish peroxidase*
IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo.
Kd: aparente constante de dissociação
kDa: quilo Dalton
LB: meio Luria-Bertani
mA: miliampère
mg: miligrama
min: minuto
mL: mililitros
MM: meio mínimo
mM: milimolar
mRNA: ácido ribonucléico mensageiro
MRW: *mean residue weight*
MWCO: Molecular Weight Cut-Off
ng: nanograma
nm: nanômetro
nM: nanomolar
OD₆₀₀: densidade óptica a 600 nm.
p/v: peso/volume
pb: pares de base
PCR: reação em cadeia da polimerase
pH: potencial hidrogeniônico

PK: proteinase K
PVDF: fluoreto de polivinilideno.
RHD: domínio de homologia Rel
RNA: ácido ribonucléico
RPM: rotações por minuto
RT-PCR: transcrição reversa - reação em cadeia da polimerase
SDS: dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante.
SLN: sinal de localização nuclear
SON-PCR: *Single Oligonucleotide Nested-PCR*
SPB: *signaling protease box*
STPR: *score and three amino acid peptide repeat domain*,
TBE: Tris-borato-EDTA
TBS: tampão salina Tris tamponada.
TCA: ácido tricloroacético
Tm: temperatura de *melting*
Tris: Tri(hidroximetil)aminometano
UV: radiação ultravioleta
V: volt
v/v: volume/volume
wHTH: hélice-volta-hélice alada
WT: tipo selvagem
 μ g: micrograma
 μ g: micrograma
 μ L: microlitros

Resumo

O pH ambiental é um sinal importante para fisiologia de fungos, intervindo na regulação da transcrição de vários genes. Em fungos filamentosos e leveduras, PacC é um importante fator transcricional que regula a expressão de genes tanto em pH ácido como alcalino. A produção de enzimas envolvidas na bioconversão de biomassa vegetal é regulada principalmente no nível da transcrição. No entanto, o envolvimento da via de regulação por pH na expressão de enzimas lignocelulolíticas não tem sido extensivamente estudado. Nosso grupo havia demonstrado anteriormente que o deuteromiceto termofílico *Humicola grisea* var. *thermoidea* é um potente produtor de celulases, apresentando um considerável potencial biotecnológico para bioconversão de resíduos agrícolas. Nossos resultados sustentam a existência de uma via de regulação por pH para as glicosil hidrolases em *H. grisea*. Neste trabalho, foram realizadas análises quantitativas por RT-PCR em tempo real para vários transcritos de *H. grisea*. O perfil transcricional de oito genes codificadores de enzimas lignocelulolíticas (*cbh1.1*, *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *bgl4* e *xyn1*) e de dois fatores de transcrição (*pacC* e *creA*) foi avaliado na presença de glicose ou de bagaço de cana-de-açúcar em condições de pH ácido e alcalino. A análise por qRT-PCR revelou uma indução forte e precoce de quase todos os genes de enzimas lignocelulolíticas, de uma maneira sinérgica quando o fungo foi cultivado com a fonte de carbono complexa e em condições alcalinas (pH 8,0). A única exceção foi *egl4*, que foi induzido por pH ácido. Um padrão oposto para a expressão dos dois fatores transcricionais foi observado. Enquanto *pacC* foi induzido em condições alcalinas e fortemente reprimido na presença de glicose, *creA* foi induzido por glicose e reprimido em condições alcalinas. Os dados de perfil de transcrição, combinados com a análise da ligação *in vitro* de PacC e CreA aos promotores dos genes analisados, apóiam a repressão por carbono, mediada por CreA, e a via de regulação por pH, mediada por PacC em *H. grisea*. Além disso, ensaios de mobilidade eletroforética (EMSA) com o promotor de *pacC* mostraram que, *in vitro*, PacC e CreA competem pelo mesmo sítio de ligação. Tomados em conjunto, estes dados corroboram as hipóteses de que PacC possa ser o mediador da regulação influenciada pelo pH e de que a repressão por glicose, possivelmente atribuída a CreA, é capaz de sobrepujar a ação indutória do pH alcalino. Temos ainda evidências de que CreA também esteja envolvido na repressão de PacC, estabelecendo uma interação entre os dois sistemas regulatórios.

O foco do segundo capítulo desse trabalho foi a produção e caracterização de Xyr1 (regulador de xilanases 1), que é o principal fator transcricional que atua na regulação da expressão dos genes codificadores de xilanases em *Trichoderma reesei*. Os resultados apresentados mostraram a bem sucedida produção heteróloga da versão completa da proteína Xyr1, algo até então inédito entre reguladores de xilanases em fungos filamentosos. Nossas

análises empregando técnicas de interação DNA-proteína e géis nativos indicaram que Xyr1 pode naturalmente formar homodímeros em solução. Contudo, a dimerização não é fundamental para a interação com o DNA, o que implica em uma dinâmica complexa de ligação ao promotor do gene *xyn1*. São possíveis as formas de monômero, dímero e interação com ambos os motivos do sítio palindrômico. A capacidade de dimerização do fator fortalece a proposição de modulação adicional da atividade de Xyr1 por meio de possíveis interações proteína-proteína com outros fatores transcricionais, sendo candidatas as proteínas Ace1 e Ace2. O papel de modificações pós-traducionais tem sido apontado como crucial na regulação mediada por Xyr1. Mostramos que a fosforilação possivelmente está envolvida na regulação da atividade de Xyr1, sendo necessária para a interação DNA-proteína *in vitro*, mas sem afetar a formação de dímeros. Apresentamos ainda indícios de modulação alostérica de Xyr1 que depende tanto da interação com o DNA quanto, possivelmente, com carboidratos, o que torna mais complexo este modelo de regulação.

Palavras chave: *Humicola grisea var. thermoidea*, *Trichoderma reesei*, regulação transcricional, glicosil hidrolases.

Abstract

Environmental pH is an important signal in fungal physiology, acting at transcriptional regulation of several genes. In filamentous fungi and yeasts, the PacC zinc-finger transcription factor regulates gene expression in response to changes of external pH. The production of enzymes involved in plant cell wall breakdown is regulated mainly at the transcriptional level. Nonetheless, the involvement of the pH-related regulatory pathway in the lignocellulolytic enzymes expression has not been extensively studied. We have demonstrated that the thermophilic deuteromycete *Humicola grisea* var. *thermoidea* is a potent cellulases producer, presenting a considerable potential for agricultural wastes bioconversion processes. Previous results of our group support the existence of a pH regulatory pathway in *H. grisea* var. *thermoidea*. In this work, we have performed a time course transcription analysis of several *H. grisea* genes by quantitative real time RT-PCR. Eight enzyme genes (*cbh1.1*, *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4*, *bgl4* and *xyn1*), and two transcription factors genes (*pacC* and *creA*) were analyzed in the presence of simple (glucose) or complex (sugarcane bagasse) carbon source, in acid and alkaline medium conditions. The qRT-PCR analyses revealed an early and strong induction of almost all glycoside hydrolase genes transcription, in a synergistic way, when the mycelia were grown in the presence of the complex carbon source, under alkaline conditions (pH 8.0). The only exception was *egl4*, which was acid-induced. An opposite pattern was observed for the expression of the two transcription factors. While *pacC* was induced in alkaline conditions and strongly repressed in presence of glucose, *creA* was induced by glucose and repressed in alkaline conditions. The transcriptional profile data combined with the analysis of the *in vitro* binding of PacC and CreA transcription factors to the promoters support the CreA-mediated carbon repression and the PacC-related pH regulation of *H. grisea* cellulase and xylanase encoding genes. Moreover, electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) employing the upstream regulatory sequences of *pacC* showed that an *in vitro* interaction occurs between the proteins PacC and CreA on the *pacC* upstream regulatory sequence, with both factors competing for the same binding site. Taken together, this data corroborate our previous evidences, supporting the existence of a pH transcriptional regulatory pathway in *H. grisea*, mediated by PacC. Moreover, PacC is probably transcriptionally auto-regulated and may be subject to the carbon repression mechanism mediated by CreA.

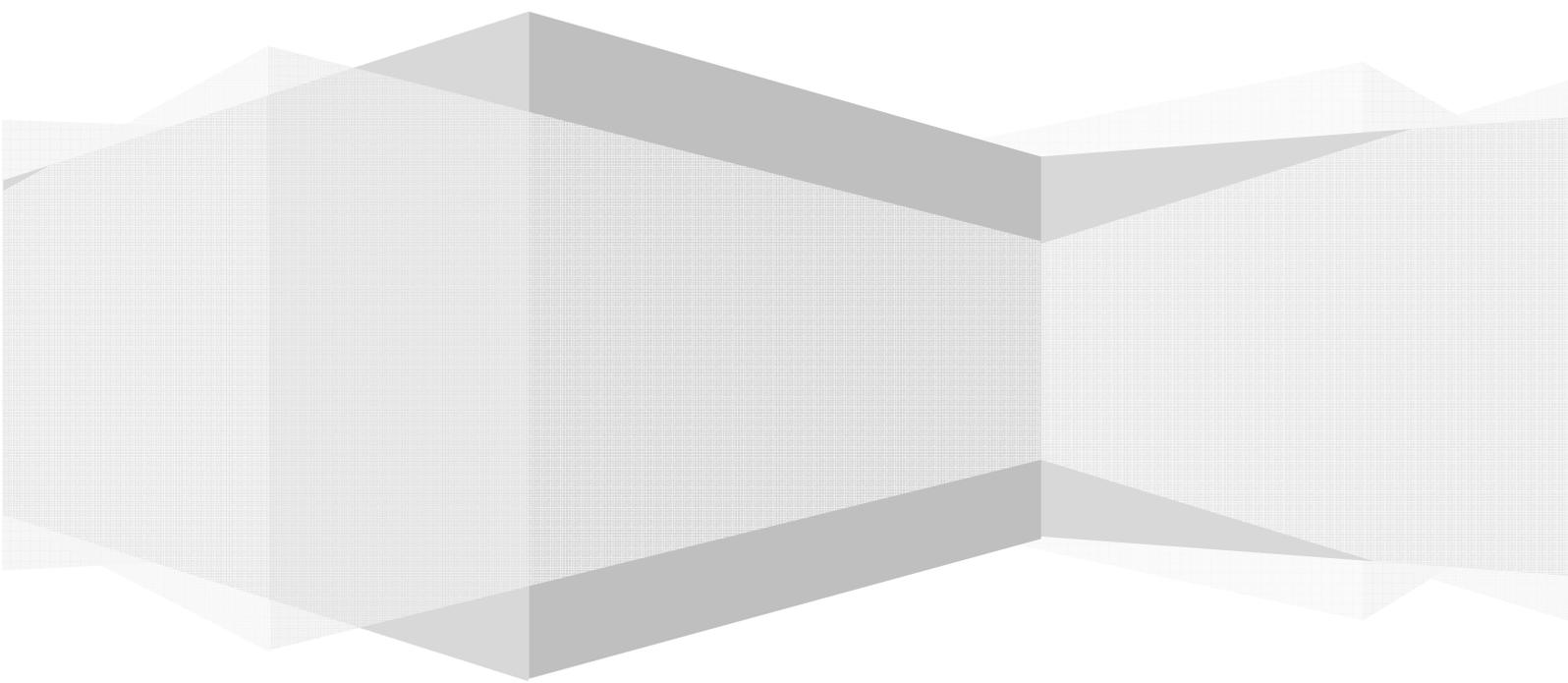
The second chapter of this work describes the production and characterization of Xyr1 (xylanase regulator 1), which is the main transcription factor that acts regulating the expression of xylanase encoding genes in *Trichoderma reesei*. The results showed the successful heterologous production of the full version of Xyr1, something never previously described for xylanases regulators in filamentous fungi. Our analyses employing techniques of DNA-protein

interactions and native gels indicated that Xyr1 can form homodimers in solution. Nevertheless, dimerization is not essential for the interaction with DNA, suggesting a complex binding dynamics to the *xyn1* promoter region (as monomer, dimer and interacting with both palindromic binding sites). The dimerization capacity of Xyr1f strengthens the proposition of an additional modulation for this factor activity, probably by protein-protein interactions with other transcription factors, such as Ace1 and Ace2. A crucial role for post-translational modifications was proposed for gene regulation mediated by Xyr1. We initially showed that phosphorylation has a possible role in the regulation of Xyr1 activity, being necessary for the DNA-protein interactions *in vitro*, but not affecting the dimer formation. Additionally, we present evidence suggesting an allosteric modulation of Xyr1, dependent on interactions, both with DNA and carbohydrates, which adds an additional degree of complexity to this regulatory model.

Key words: *Humicola grisea var. thermoidea*, *Trichoderma reesei*, transcriptional regulation, glycoside hydrolases.

Capítulo 1

*Investigação do mecanismo de regulação
transcricional mediada pelo pH ambiental em
Humicola grisea var. thermoidea*



1. Introdução

1.1 A biomassa vegetal

A biomassa vegetal é composta principalmente por: celulose, hemicelulose e lignina. Adicionalmente, pequenas quantidades de outros compostos, tais como cinzas, proteínas e pectina também podem ser encontradas nos resíduos lignocelulolíticos, embora sua composição varie conforme a natureza da fonte de biomassa (Sánchez, 2009). A produção anual de biomassa na natureza é estimada em torno de 200 bilhões de toneladas (Lin & Tanaka, 2006). Com o crescimento populacional, a aceleração da economia mundial e o aumento da demanda energética, temos um considerável aumento no acúmulo de rejeitos agrícolas e das indústrias têxtil e de papel, agravando o problema da poluição ambiental por material lignocelulósico (Dashtban et al, 2010). Nesse sentido, a biodegradação da biomassa por fungos e bactérias, visando à obtenção de energia, desempenha um papel estratégico no equilíbrio dos ecossistemas e do ciclo do carbono, impedindo o acúmulo de dejetos na superfície terrestre (Levy, 1987).

Dados como os apresentados acima têm estimulado o desenvolvimento de novos processos tecnológicos para a conversão de resíduos agroindustriais em produtos úteis como adubo, ração animal, papel e fibras têxteis reciclados (Dillon, 2004), aditivos alimentícios ou químicos de aplicação industrial (Scott et al., 2007), sobretudo como fonte de energia renovável, como substitutos de combustíveis fósseis (Antoni et al., 2007; Weber et al 2010). Hahn-Hägerdal e colaboradores (2007) apontam como vantagens da bioconversão de resíduos lignocelulósicos: (a) a grande disponibilidade e capacidade de renovação; (b) a redução na utilização de terras férteis, potencialmente produtoras de alimentos, para monoculturas destinadas unicamente à produção de energia; (c) a menor emissão de gases potencialmente causadores do efeito estufa; e (d) geração de trabalho e renda nas comunidades rurais.

1.2 Estrutura da celulose, xilana e enzimas responsáveis por sua degradação

Micro-organismos lignocelulolíticos convertem a biomassa vegetal por meio da produção e secreção de celulases, hemicelulases e ligninases. A celulose apresenta uma composição química simples, formada por longos polímeros lineares de D-glicose, unidos por ligações glicosídicas β -1,4. A estrutura física da celulose, entretanto, é bastante complexa, pois cadeias paralelas se agrupam por meio de numerosas ligações de hidrogênio e forças de van der Waals, formando microfibrilas rígidas e insolúveis. Estas microfibrilas, por sua vez, reúnem-se em fibras de alto grau de cristalinidade, entremeadas por regiões amorfas (revisto por Béguin & Aubert, 1994). Três enzimas atuam de forma sinérgica para a degradação da celulose: a) as endoglicanases (EC 3.2.1.4), que clivam as ligações glicosídicas β -1,4 ao longo das cadeias de celulose, preferencialmente, em regiões amorfas; b) as exoglicanases ou celobiohidrolases (EC 3.2.1.91), que liberam celobiose (um dímero de D-glicose) das extremidades geradas pelas endoglicanases, particularmente nas regiões cristalina da celulose; e c) as beta-glicosídeos (EC 3.2.1.21), que liberam D-glicose e pequenas cadeias de oligossacarídeos a partir de resíduos de celobiose e celodextrina (revisto por Sánchez, 2009).

Ao contrário da celulose, a xilana é um heteropolímero ramificado. Sua estrutura inclui unidades de D-xilose, ligadas por ligações glicosídicas β -1,4, com ramificações de resíduos de arabinofuranose, ácido glucorônico e ácido ferúlico. A degradação da xilana ocorre principalmente pela ação de endoxilanases (EC 3.2.1.8), que clivam as ligações internas β -1,4, gerando xilooligosacarídeos que são degradados a resíduos de xilose pelas beta-xilosídeses (EC 3.2.1.37) (revisto por Polizeli et al., 2005).

1.3. A regulação transcricional mediada pelo pH ambiental

A adaptação a alterações do ambiente é algo crucial a todo microrganismo. Isso pode ocorrer pela variação do padrão de expressão de seus genes, desencadeando uma resposta adaptativa nas vias metabólicas intracelulares, ou pode se refletir na síntese de moléculas de exportação capazes de modificar o meio ambiente circundante (Espeso et al., 1993). A forma mais efetiva de se proteger as macromoléculas localizadas na membrana plasmática, ou além, é garantir que a sua síntese ocorra apenas no pH apropriado ao seu funcionamento (Nahas et al., 1982; van den Hombergh et al., 1996).

Diversos fungos filamentosos e leveduras têm a expressão de determinados genes regulada pelo pH ambiente, em um mecanismo dependente do sistema PacC (revisto por Peñalva & Arst, 2004). Tal sistema foi inicialmente descrito para o ascomiceto *Aspergillus nidulans*, organismo no qual essa via regulatória tem sido amplamente estudada do ponto de vista bioquímico, genético e molecular. PacC é uma proteína capaz de, em resposta a mudanças de pH do meio, ativar diferencialmente genes que devam ser expressos, por exemplo, em ambiente básico e de reprimir aqueles que devam ser expressos preferencialmente em condições ácidas. O desencadeamento de tal resposta é dependente de uma via de transdução de sinal da qual participam os produtos dos genes *palA*, *palB*, *palC*, *palF*, *palH* e *pall*. Um modelo proposto até 2009 para a ativação de PacC é mostrado na **Figura 1**.

Ao longo dos últimos quinze anos diversos estudos têm procurado elucidar o papel individual de cada componente dessa via de transdução de sinal. Em *A. nidulans*, a proteína PacC apresenta características típicas de fatores transcricionais. A região de ligação ao DNA é formada por três domínios em “dedos-de-zinco” da classe Cys₂His₂, que reconhecem o motivo de ligação consensual 5'-GCCARG-3' nos promotores dos genes alvo (Tilburn et al., 1995). Quando o fungo

cresce em condições ácidas, a proteína PacC assume, predominantemente, uma conformação fechada que impede seu processamento proteolítico (Espeso et al., 2000). Sob condições alcalinas, PacC assume uma conformação “aberta”, sensível a ação de proteases. Segundo Diéz e colaboradores (2002), a ativação funcional de PacC requer duas etapas de proteólise em sua região C-terminal (**Figura 1**). A primeira clivagem, dependente de pH alcalino, parece ser efetuada pelo produto do gene *palB*, uma cisteína protease (Denison et al., 1995; Peñas et al., 2007). Evidências mais recentes apontam o complexo do proteassoma 26S como o responsável pelo segundo passo de hidrólise de PacC, que independe do pH no qual o fungo é cultivado (Hervás-Aguilar et al., 2007).

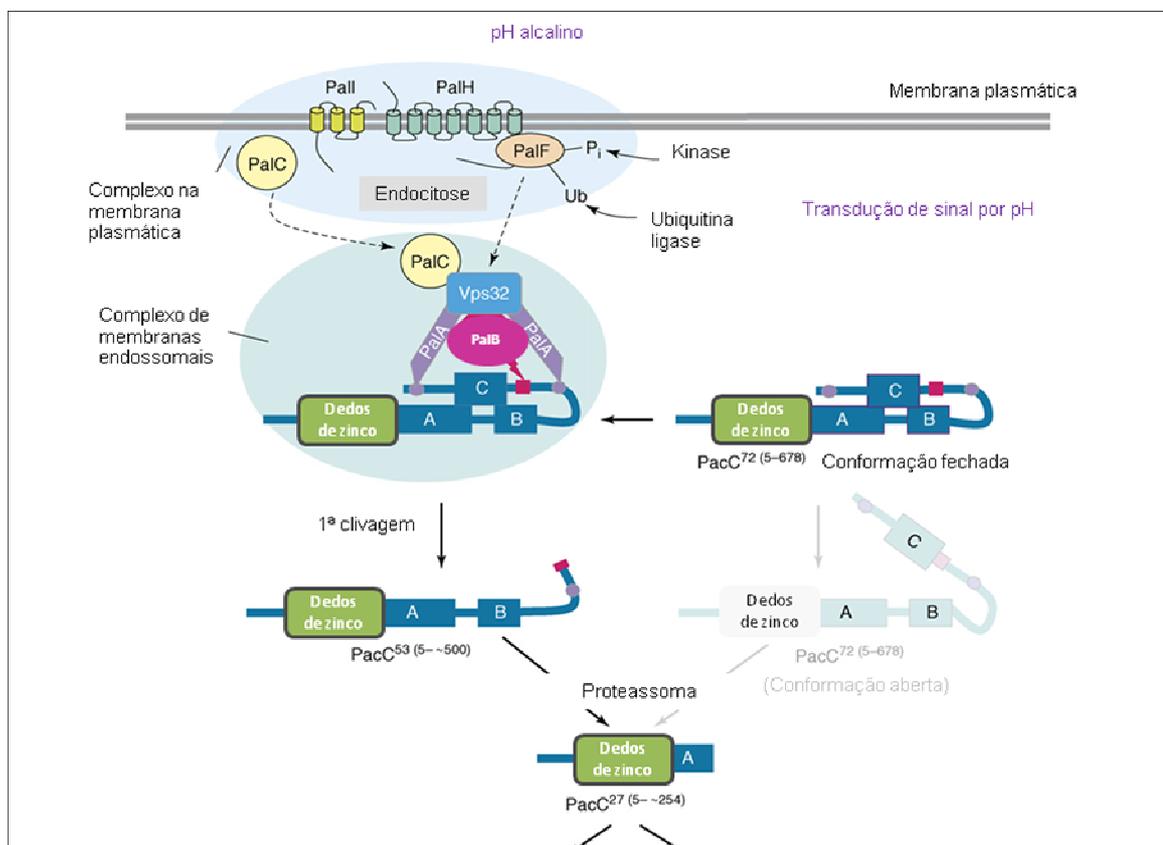


Figura 1. Resumo da regulação pelo pH em *A. nidulans*. Sob condições ácidas, PacC é mantida em uma conformação fechada e inacessível a proteases. Em condições alcalinas, o sinal de pH alcalino ambiente é transmitido a partir do complexo na membrana plasmática, por um processo que envolve, provavelmente, endocitose de PalH e/ou PalI com a participação de PalC para o complexo de membranas endossomais, onde, PacC associado a PalA sofre proteólise por PalB, que remove a porção C-terminal para formar PacC⁵³. PacC⁵³ é acessível à protease de processamento, quase certamente sendo o proteassoma, que remove mais ~245 resíduos de aminoácidos de uma forma pH-independente para formar o ativador PacC²⁷. Sob condições ácidas, vestígios de PacC podem existir na conformação aberta acessível para a protease de processamento, ignorando o requisito para o sinal de pH. (Adaptado de Peñalva & Arst, 2004)

Outros dados apontam ainda para a modulação da expressão de *pacC* em resposta à disponibilidade de fontes de fosfato e de carbono no meio de cultivo (Trevisan et al., 2011). Alterações na concentração de fosfato inorgânico e no pH também levaram ao aparecimento de mais de uma forma do mRNA de *palB* por mecanismo de *splicing* alternativo. A manutenção dos íntrons I e /ou III gera uma protease PalB provavelmente inativa. Como PacC ativo ocorreu nas mesmas condições nas quais PalB está inativa, os autores levantam a probabilidade da existência de uma via de ativação alternativa. Contudo, não pode ser descartada a possibilidade de atividade para PacC não processado proteolicamente (**Figura 1**).

PalH é apontada como o sensor de membrana responsável pela percepção do pH extracelular alcalino, possivelmente em cooperação com Pall (Herranz et al., 2005). A fosforilação e ubiquitinação da arrestina PalF, que é dependente de pH alcalino, leva à endocitose do complexo PalF-PalH, transduzindo o sinal captado no nível de membrana para os componentes internos da via (Herranz et al., 2005). O papel de Pall ainda não está totalmente elucidado, mas há evidências de que esta proteína auxilia na localização de PalH na membrana plasmática (Calcagno-Pizarelli et al., 2007).

PalA e PalC são proteínas que interagem com complexos multiprotéicos para o transporte intracelular de vesículas em direção ao corpo multivesicular (Negrete-Urtasun et al., 1997 e 1999; Tilburn et al., 2005; Galindo et al., 2007). PalA faz a ligação entre PacC e esta via de tráfego intracelular. Tal dado é relevante, uma vez que Penãs e colaboradores (2007); Galindo e colaboradores (2007); e Rodríguez-Galan e colaboradores (2009) demonstraram ser provável que a primeira etapa de processamento de PacC envolva o complexo formado por PalA, PalB e PacC, que ocorreria ancorado a membranas endossomais.

No entanto, evidências mais recentes mostraram que o processamento de PacC ocorreria preferencialmente junto à membrana plasmática da célula (Galindo et al., 2012). Mesmo associado

a proteínas de complexos multiprotéicos envolvidas no transporte intracelular de vesículas, esse processamento provavelmente não envolve a endocitose do complexo PalF-PalH. PalH permaneceria como um sensor na membrana e PalF, ubiquitinilado, recrutaria as demais proteínas envolvida no mecanismo que culmina na clivagem de PacC.

Homólogos ao sistema PacC de *A. nidulans* já foram caracterizados para os fungos filamentosos *Aspergillus niger* (MacCabe et al., 1996), *Penicillium chrysogenum* (Suárez & Peñalva, 1996), *Acremonium chrysogenum* (Schmitt et al., 2001), *Sclerotinia sclerotiorum* (Rollins & Dickman, 2001), *Fusarium verticillioides* (Flaherty et al., 2003), *Fusarium oxysporum* (Caracuel et al., 2003), *Ustilago maydis* (Aréchiga-Carvajal & Ruiz-Herrera, 2005), *Aspergillus giganteus* (Meyer et al., 2005), *Trichophytum rubrum* (Ferreira-Nozawa et al., 2006), *Paracoccidioides brasiliensis* (Poças-Fonseca et al., 2008) e no fungo polimórfico *Wangiella dermatitidis* (Wang & Szaniszló, 2009). Nesses micro-organismos, PacC tem sido relacionado a diferentes processos biológicos, como a produção de metabólitos secundários, a enzimas e a patogenicidade em plantas e animais. Nas leveduras *Yarrowia lipolytica* (Blanchin-Roland et al., 2005), *Sacharomyces cerevisiae* (Hayashi et al., 1998) e *Candida albicans* (Davis, 2003), o sistema homólogo à PacC está envolvido, respectivamente, na produção/secreção de proteases; esporulação e meiose; e na patogenicidade.

1.4 O pH e a regulação transcricional de enzimas do complexo lignocelulolítico

A produção de enzimas envolvidas na degradação da lignocelulose é regulada principalmente no nível transcricional (revisto por Aro et al., 2005). Entretanto, são poucos os dados disponíveis a respeito do envolvimento da via PacC na regulação de genes que codificam essas enzimas em resposta a alterações no pH. Uma correlação entre alterações de pH e a

produção de hidrolases é bastante plausível, uma vez que tais enzimas geralmente apresentam limites restritos de pH para uma atividade ótima.

O gene da beta-xilosidase *xlnD* de *A. nidulans* apresenta, em sua região promotora, sítios para ligação de PacC. No entanto, Pérez-González e colaboradores (1998) não conseguiram demonstrar que PacC atua de fato na regulação transcricional desse gene. Curiosamente, os genes das endoxilanasas *xlnA* e *xlnB* deste mesmo fungo apresentam padrões opostos de expressão: *xlnA* é expresso exclusivamente em pH alcalino, enquanto *xlnB* é expresso em condições ácidas, ambos regulados por PacC (MacCabe et al., 1998). Em *Penicillium purpurogenum*, a expressão dos genes *xynA* e *xynB* é claramente regulada pelo pH, apesar da inexistência de sítios de ligação para PacC no promotor de *xynB* (Chávez et al., 2002). Tanaka e colaboradores (2006) demonstraram que o gene *xynII* de *Aureobasidium pullulans* tem sua expressão aumentada em mais de 22 vezes quando o fungo é crescido em pH alcalino.

1.5 A repressão por carbono

A disponibilidade de distintas fontes de carbono representa mais uma variável ambiental a qual os micro-organismos devem se adaptar. Um dos mecanismos regulatórios nesta adaptação é a repressão por carbono. Neste mecanismo, a presença de fontes de carbono rapidamente metabolizáveis, como D-glicose ou frutose, promove a repressão da síntese de enzimas relacionadas ao catabolismo de fontes alternativas de carbono, como a celulose. Segundo Ruijter e Visser (1997), sob o ponto de vista da fisiologia celular, a existência de tal mecanismo regulatório é vantajosa na medida em que a fonte de carbono energeticamente mais favorável é consumida, não havendo gasto desnecessário de energia na síntese de enzimas que degradam substratos complexos. Estes mesmos autores ressaltam que esse mecanismo regulatório pode ser

desencadeado por diversas fontes de carbono, mas, como a D-glicose é uma das fontes mais repressoras, o termo “repressão por glicose” também é utilizado, embora se refira a um caso específico da repressão por carbono. Outra terminologia empregada para se referir à “repressão por carbono” é “repressão catabólica por carbono”, com a sigla CCR na língua inglesa. Essa segunda expressão não está necessariamente correta, uma vez que implica na participação de catabólitos no mecanismo de repressão, o que ainda não é claro. Mesmo assim, a terminologia CCR ainda é muito utilizada na literatura científica.

Em diversos fungos filamentosos, a repressão por glicose é mediada por homólogos da proteína CreA/CREI (Dowzer & Kelly, 1989; Strauss et al., 1995; Takashima et al., 1998). CreA é um fator transcricional cujo domínio de ligação ao DNA é composto por dois domínios em “dedos-de-zinco”, também da classe Cys2His2, que reconhecem o motivo de ligação consensual 5'-SYGGRG-3' em *A. nidulans* (Cubero & Scazzocchio, 1994). O sítio funcional de ligação para CreA/CRE1 geralmente consiste na presença de pelo menos dois motivos 5'-SYGGRG-3' espaçados por alguns pares de bases (Portnoy et al. 2011).

Os genes codificadores das glicosil hidrolases, que são enzimas fundamentais no metabolismo de fontes alternativas de carbono, estão entre os alvos da repressão por CreA (Mach et al., 1996; Ilmén et al, 1996; Orejas et al., 1999). Tal regulação pode ocorrer diretamente pela ligação de CreA aos promotores de genes alvo e também pode ocorrer indiretamente pela repressão de ativadores transcricionais, como XlnR de *A. nidulans* (Tamayo et al., 2008). Ainda não foi proposto um modelo claro para o mecanismo de repressão por carbono mediado por homólogos de CreA/CREI, mas há indícios que apontam a fosforilação do fator como requisito para sua atividade regulatória (Cziferszky et al., 2003). Há ainda indícios de auto-regulação transcricional do fator em *A. nidulans* (Strauss et al., 1999), além do remodelamento de cromatina como possível mecanismo de repressão por CreA (Garcia et al., 2004).

1.6 *Humicola grisea* como modelo de estudo

O fungo termofílico *H. grisea* var *thermoidea* produz um conjunto de enzimas hidrolíticas que apresenta uma vasta gama de atividades, que inclui, por exemplo: trealase (Zimmermann et al., 1990), glicoamilase (Campos & Felix, 1995), celulases (Azevedo et al., 1990, Poças-Fonseca et al., 1997, Poças-Fonseca et al., 2000; Nascimento et al., 2010) e xilanasas (Da-Silva et al., 1994). Em vista disso, *H. grisea* apresenta considerável potencial para bioconversão de resíduos agroindustriais (De-Paula et al., 2003; Rossi et al., 2007), também podendo ser empregado como doador de genes para expressão heteróloga de enzimas (De-Faria et al., 2002; Benoliel et al., 2010) e para complementação de coquetéis enzimáticos já existentes (Takashima et al., 1999b).

Vários genes relacionados ao complexo hidrolítico de *H. grisea* já foram clonados e caracterizados molecularmente: *cbh1.1* (Azevedo et al., 1990), *cbh1.2* (Poças-Fonseca et al., 1997), *egl1* (Takashima et al., 1996), *egl2* (Takashima et al., 1997), *egl3* e *egl4* (Takashima et al., 1999a), *xyn1* (Ikura et al., 1997), *xyn2* (De-Faria et al., 2002) e *bgl4* (Takashima et al., 1999b). No entanto, apesar do potencial biotecnológico de *H. grisea*, pouco se sabe sobre a regulação da expressão gênica neste fungo.

Muitos esforços têm sido direcionados visando o melhoramento de micro-organismos para maior produção de enzimas (revisto por Elkins et al., 2010). No entanto, a pesquisa sobre mecanismos biológicos “básicos”, como a regulação da expressão de genes e da produção de enzimas lignocelulolíticas, tem, muitas vezes, sido negligenciada em prol de abordagens experimentais, em princípio, mais diretamente “aplicáveis” na escala produtiva. Tal visão tem levado a gargalos insolúveis há vários anos, como o insucesso em se obter uma maior produção e/ou atividade enzimática pelo mero aumento do número de cópias de um determinado gene, bem como a sobrecarga do aparato de secreção protéica (Azevedo & Poças-Fonseca, 2002).

A identificação e caracterização de novos elementos que atuem em *cis* ou em *trans* na regulação da função promotora em genes de celulasas e xilanasas são imprescindíveis para uma compreensão refinada dos mecanismos de expressão diferencial de genes ao longo do processo de hidrólise da lignocelulose. Estudos sobre mecanismos que regulam a transcrição de genes de interesse industrial contribuem para o desenvolvimento de estratégias visando uma maior produção de enzimas específicas e uma otimização de bioprocessos já estabelecidos. Além disso, tais estudos impulsionam o desenvolvimento de novas estratégias para a expressão heteróloga de hidrolases e de outras proteínas de interesse industrial, como a engenharia de promotores fortes com diferentes elementos regulatórios induzíveis.

Neste contexto, o sistema celulolítico de *H. grisea* se torna um modelo bastante atraente para estudos da regulação da expressão gênica, uma vez que diferentes variáveis, como fonte de carbono, nitrogênio, temperatura, osmolaridade e, até mesmo, a estrutura física do substrato na natureza, parecem influenciar tal processo. A regulação transcricional mediada pelo pH necessita ser profundamente investigada, face a sua importância em outros fungos e face a evidências experimentais de nosso grupo de pesquisa, que apontam sua ocorrência em *H. grisea*. Nossos experimentos, por exemplo, mostraram perfil protéico diferencial em pHs variados e a identificação de um fragmento genômico homólogo a *pacC* (Poças-Fonseca et al., 2009).

Este trabalho representa um aprimoramento nos estudos de regulação da expressão gênica de glicosil hidrolases do fungo termofílico *H. grisea*, objeto de estudo de nosso grupo de pesquisa há quase vinte anos.

2. Objetivo e Metas

2.1 Objetivo

Investigar o mecanismo de regulação transcricional mediado pelo pH ambiental em *H. grisea* var. *thermoidea*, com ênfase em seu papel na expressão de genes codificadores de glicosil hidrolases e em uma possível relação deste sistema regulatório com a repressão por carbono.

2.2 Metas propostas

1. Clonagem e caracterização do gene homólogo a *pacC* de *H. grisea*;
2. Análise dos perfis de expressão de *pacC*, *creA* e de genes de glicosil hidrolases em resposta a alterações no pH do meio de cultivo e na presença de diferentes fontes de carbono;
3. Análise estrutural das regiões regulatórias de diferentes genes de glicosil hidrolases: investigação *in silico* de possíveis elementos regulatórios;
4. Produção heteróloga em *Escherichia coli* das regiões correspondentes aos domínios de ligação ao DNA das proteínas PacC e CreA para experimentos de interação DNA-proteína com os promotores de *pacC*, *creA* e dos genes de glicosil hidrolases.
5. Integração dos dados obtidos na proposição de um modelo regulatório para a expressão de glicosil hidrolases em *H. grisea*.

3. Metodologia

3.1 Condições de cultivo de *H. grisea*

O fungo *H. grisea* foi rotineiramente mantido em cultura e esporulando, em meio semi-sólido contendo flocos de aveia (Quaker) 4% (p/v) a 42 °C. Para indução enzimática, 10^6 esporos/mL foram inoculados por 24 h (42 °C/120 RPM) em 50 mL de meio mínimo de Pontecorvo (MM) (Pontecorvo et al., 1953), pH 6.8 (não tamponado), enriquecido com extrato de levedura 0,25% (p/v), peptona 0,1% (p/v) e suplementado com D-glicose (GLI) 1% (p/v). O micélio crescido foi então filtrado, lavado com água destilada estéril e transferido para nova alíquota de 50 mL de MM, suplementado com GLI 1% (p/v) ou bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (BCA) 0,1% (p/v) como únicas fontes de carbono. O valor de pH do meio de cultivo foi ajustado para 5,0 ou 8,0 (tamponamento com citrato de sódio 100 mM). As culturas foram incubadas por 0,5, 2, 6, e 18 h (42 °C/120 RPM).

Para o ensaio de mudança de ambiente ácido para alcalino, o micélio filtrado e lavado foi previamente cultivado por 2 h (42 °C/120 RPM) em 50 mL de MM, pH 5.0 com GLI 1% (p/v) e então transferido para outra alíquota de 50 mL de MM com GLI 1% (p/v) ou BCA 0,1% (p/v) e então incubado por mais 2 h (42 °C/120 RPM). Para cada condição de cultivo e período de incubação, o micélio foi coletado para extração de RNA e determinação de peso seco. Amostras dos sobrenadantes de cultivo também foram coletadas. O consumo de D-glicose nos sobrenadantes de cultivo foi medido pelo ensaio colorimétrico da glicose oxidase/peroxidase utilizando o *kit Glucose* (Biosystems). A concentração de proteínas nos sobrenadantes foi estimada pelo método de Bradford (1976), utilizando-se albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Ácido tricloroacético (TCA) foi adicionado a 1,0 mL de cada sobrenadante para uma concentração final de 10% (v/v) e incubadas a 4° C durante 1 h. O material precipitado foi lavado uma vez com 0,25 mL de acetona

gelada, ressuspendido em 25 µL de tampão de amostra 1X (Tris-HCl a 100 mM, SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 2% (p/v), glicerol 2% (v/v), pH 6,8) e submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 12% (SDS-PAGE). Nenhuma variação nos valores de pH dos meios tamponados foi observada ao longo do cultivo.

3.2 Clonagem do gene *pacC*

Anteriormente em nosso grupo, um fragmento de DNA com aproximadamente 2,9 kb, correspondente ao gene *pacC* de *H. grisea*, havia sido selecionado de uma biblioteca genômica previamente construída no sistema *Lambda DASH II* (Stratagene). Um fragmento adicional de 630 pb, correspondente à região 5' não codificadora a montante do gene (5' UP), foi obtido por meio da técnica *Single Oligonucleotide Nested-PCR* (SON-PCR) (Antal et al., 2004), utilizando-se DNA genômico como molde e os oligonucleotídeos reversos descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Gene	Número de acesso no GenBank	Aplicação	Seqüência (5' - 3') ^b	
			F	R
<i>cbh1.1</i>	(X17258.1)	PCR em tempo real	GGTCTCAGCCGCTATCCTG	CCTCGCCGTTGATGAACTT
		Amplificação do 5' UP	<u>GTCTAGAG</u> CACATCACTGGCAAAGCTA	<u>TTCTAGAT</u> TTTGAAGGAGGGTGACTGAT
<i>cbh1.2</i>	(U50594.1)	PCR em tempo real	CTCATGGCCAACCAGAACA	CGCTGTTGATACCGCACTC
		Amplificação do 5' UP	<u>GTCTAGAC</u> AGGCACATCCAAGAAACC	<u>TTCTAGACT</u> TGAAAGACTGCTGCTGAG
<i>egl1</i>	(D63516.1)	PCR em tempo real	AGTACGGCGTCACCACCAAC	GTGGAGCATCTCATAGCGGC
		Amplificação do 5' UP	<u>TTCTAGA</u> ATTCGGTTCGTC AACGTC	<u>GTCTAGAG</u> GTTGTTGAGCTGGTGCG
<i>egl2</i>	(D84470.1)	PCR em tempo real	AGAACGGCAAGGTTGGACTG	TCCTGGAGGTGGTTGAGCAT
		Amplificação do 5' UP	<u>CTCTAGAT</u> GCTCCCAACTTCTTCTCT	<u>GTCTAGAG</u> GTAATAGTGTTCAAGGGGAA C
<i>egl3</i>	(AB003107.1)	PCR em tempo real	ATGGGCTGTGAACGACGACT	GGACCGGATGTGAAGGTGAG
		Amplificação do 5' UP	<u>TTCTAGAC</u> AGCTCGTTTGAAACCTCT	<u>ATCTAGACT</u> TGATCGGAGTTGAGACG
<i>egl4</i>	(AB003108.1)	PCR em tempo real	GCTTTGACTGGTGC GTTTCC	CACA ACTTCTCCCATCGTCTG
		Amplificação do 5' UP	<u>GTCTAGAG</u> CCACATGGTTTGCTTTCAT	<u>GGTCAGGGG</u> GAGCTGCATCTAGAG
<i>bgl4</i>	(AB003109.1)	PCR em tempo real	AAGTACCCCGACTCGATGC	TGCCGTAGAAGTCGTTGGA
		Amplificação do 5' UP	<u>GTCTAGA</u> AAACACGCGGGAGAATG	<u>ATCTAGAT</u> GGGCTAACGGGGGAAG
<i>xyn1</i>	(AB001030.1)	PCR em tempo real	GCGTCTTTGGCACC GACTAC	GTCCGTCTGGCTTGGTTGT
		Amplificação do 5' UP	<u>GTCTAGAT</u> CCCTCAATAGCCAGATGCT	<u>TTCTAGAC</u> CTGTCTTTGTTGCTGTTGT
<i>pacC</i>	(EU684545.1)	SON-PCR		TGAGTCTGCTGCTGGGTCT e TGAGTCTGCTGGCCTTGAG
		PCR em tempo real	TTGACCTGCCAGT GGAACA	CGCACTTGTGAGGCTTGAG
		Clonagem do DBD	<u>GGATCC</u> ACTCCCTCGACTGGTGCTC	<u>CTCGAG</u> GGTAGGCGGCGCTGAGAG
		Amplificação do 5' UP	<u>CTCTAGAT</u> TTTGCATCTGTTGGAGGAA	TGCGGGAAGTCCGACATCTAGAC
		EMSA (sonda 1) ^a	CCCTCAGCCCCACGCTCTTGCCCCACG	TGTGCGTGCGGGGCCGTGGGGCCAAGAC

	EMSA (sonda 2) ^a	GCCCCGCACGCACA GAGAAGGGCCCCAGGGAAGGTT	GCGTGGGGCTGAGGG AACCTTCCCTGGGGCCCTTCTC
	EMSA (sonda 3) ^a	CCAAGAACTCTTGGCCTTGGCGCGCCTTT G	CAAAGGCGCGCCAAGGCCAAGAGTTCTT GG
	EMSA (sonda 4) ^a	GCACCGGCCAAGTCTCCGTTTCTCCTCGAC CGTCCTTGGCATTCCC	CGGGAATGCCAAGGACGGTCGAGGAGAAA CGGAGACTTGGCCGGTGC
<i>creA</i> (AB003106.1)	PCR em tempo real	TCTGTCGTACCCAACGTC	ATAAGGGGCACGGCTGTAA
	DBD cloning	<u>GGATCCTCGGCGTCGTCCGAGCAG</u>	<u>GTCGACTGCTGGTGATGGCCCTTGTG</u>
	Amplificação do 5' UP	<u>TCTAGATGGCCATAATCAACGGAGAC</u>	<u>TCTAGATGATCGCCCTCCCGGAT</u>
	EMSA (sonda 5) ^a	AACCTGCCCTGGCCAGCCCA	TGGGCTGGCCAGGGCAGGTT
<i>act</i> (AB003111.1)	PCR em tempo real	TGCCCATCTACGAGGGTTT	CGCTCAGCAAGGATCTTCA

^a Os oligonucleotídeos F utilizados para EMSA foram sintetizados com e sem a marcação fluorescente 5'-FAM. ^b As regiões sublinhadas indicam a introdução de sítios de restrição enzimática.

3.3 Extração de RNA, transcrição reversa e análise por PCR em tempo real

Os micélios coletados foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até o momento da extração. Cerca de 100 mg de cada amostra de micélio congelado foram macerados na presença de nitrogênio líquido com a utilização de almofariz e pistilo até a obtenção de um pó fino. O RNA das amostras foi extraído pela utilização do reagente *Trizol* (Invitrogen) e a síntese do cDNA foi realizada com 2 µg de RNA total tratado com DNase I (Promega) e com a enzima *SuperScript III* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. As PCRs em tempo real foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). As reações de amplificação foram feitas em volume final 10 µL, contendo 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 5 µL do *Fast SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) e 2 µL do molde de cDNA (em diluição 1:3). Os oligonucleotídeos empregados na análise foram descritos na **Tabela 1**. O programa de PCR em tempo real consistiu de 40 ciclos a 95 °C por 3 s e 60 °C por 20 s. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Reações sem cDNA funcionaram com controles negativos. A especificidade dos produtos de PCR foi confirmada pela análise da curva de dissociação de cada produto de amplificação. A análise da expressão relativa foi realizada pelo método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001), empregando-se o gene da actina (*act*) como controle

interno constitutivo. Os dados foram apresentados como índices de mudança nos valores de expressão (*fold change*) para cada gene. A análise de variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey foram utilizados para identificar diferenças significativas entre os grupos experimentais. A distribuição normal do conjunto de dados foi comprovada pelo teste de Shapiro-Wilk com auxílio do programa *SigmaPlot* (Systat Software Inc).

3.4 Análise *in silico* das regiões 5' UP

A procura por possíveis elementos de ligação em *cis* nas regiões 5' UP dos genes de interesse (**Tabela. 1**) foi realizada com a ferramenta *Transcription Element Search System* (TESS) (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>). Tal análise restringiu-se à busca das seqüências consenso de ligação a PacC 5'-GCCARG-3' (Tilburn et al., 1995; Espeso et al., 1997) e CreA 5'-SYGGRG-3' (Cubero & Scazzocchio, 1994).

3.5 Produção das proteínas de fusão

A produção dos domínios de dedos-de-zinco das proteínas PacC e CreA fusionados a glutational S-transferase (GST) foi inicialmente realizada pela amplificação das regiões codificadoras dos domínios de ligação ao DNA (DLD) de *pacC* e *creA*, com subsequente clonagem no vetor pGEM-T (Promega). As PCRs foram realizadas a partir de moldes de cDNA, empregando-se a preparação enzimática *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e os oligonucleotídeos listados na **Tabela 1**. Os fragmentos *Bam* HI/*Xho* I (391 pb) de *pacC* e *Bam* HI/*Sal* I (254 pb) de *creA* foram subclonados no vetor de expressão pGEX-4T2 (GE Healthcare). Os vetores

resultantes foram transformados por choque térmico (Sambrook & Russel, 2001) na linhagem de *Escherichia coli* BL21(DE3) (Novagen) e os clones positivos selecionados em placas de LB-ágar (peptona de caseína 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), ágar bacteriológico 1,4% (p/v) e pH 7,0) com 100 µg/mL de ampicilina. Os clones transformantes foram crescidos em 30 mL de meio LB com 100 µg/mL de ampicilina até OD₆₀₀ = 0,5 (37°C, 200 RPM). As culturas foram então transferidas para 300 mL do mesmo meio LB, novamente crescidas até OD₆₀₀ = 0,5 (37°C, 200 RPM) e, então, induzidas por IPTG 1 mM por 3h, a 37°C sob constante agitação (200 RPM). As proteínas recombinantes GST::PACC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ e GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ foram purificadas nas colunas de afinidade GSTrap FF (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante. A concentração das proteínas foi estimada pelo método de Bradford (1976).

3.6 Ensaio de *pull-down* para DNA

As sequências de DNA genômico correspondentes às regiões 5' UP dos genes em estudo foram amplificadas com a *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) e com os oligonucleotídeos listados na **Tabela 1**. Os produtos de amplificação foram purificados com o *GFX PCR and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare). As reações de ligação foram realizadas à temperatura ambiente, por 30 min, com 2 µg de cada fragmento de DNA e 5 µg de GST::PACC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ ou GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ em uma mistura consistindo de KCl 0,1 M, ZnCl₂ 2,5 µM, espermidina 4 mM e 2 µg de poli [d(I-C)]. As reações de ligação foram, então, incubadas com 10 µL da matriz glutationa-sefarose 4B (Amersham Biosciences) por mais 30 min à temperatura ambiente, seguindo-se três lavagens com PBS (500 x *g*, temperatura ambiente). Os materiais precipitados e sobrenadantes obtidos após a última lavagem foram submetidos a um tratamento a 65 °C por 1 h com proteinase K (PK) (100 µg/mL) em 100 µL do tampão PK 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7,8, EDTA 5 mM e SDS 0,5%

(p/v)). As proteínas foram extraídas por tratamento com fenol/clorofórmio e o DNA recuperado foi precipitado com etanol. Um quarto do volume do DNA recuperado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5 %. Controles negativos foram realizados empregando-se 5 µg de GST purificada no lugar das proteínas de fusão.

3.7 Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) – versão I

Sondas consistindo de fragmentos de DNA fita dupla foram obtidas pelo anelamento de oligonucleotídeos sintéticos marcados com fluorescência (FAM) com suas seqüências complementares (**Tabela 1**). 500 ng de cada oligonucleotídeo foram aquecidos a 95°C por 5 min em 30 µL do tampão de anelamento 1X (0,2 M Tris-HCl, pH 7,7) e vagarosamente resfriadas até atingirem a temperatura ambiente. A formação dos complexos DNA-proteína foi realizada pela incubação das proteínas de fusão com 30 ng da sonda (20 min, temperatura ambiente) em uma mistura consistindo de KCl a 0,1 M, ZnCl₂ a 2,5 µM, espermidina 4 mM e 1 µg de poli [d(I-C)] em um volume final de 20 µL. Para os ensaios de competição, sondas não marcadas (tipo selvagem e versões mutadas) foram empregadas em excesso molar de 100 e 200X. A formação dos complexos foi analisada por eletroforese em TBE 0,25X (Tris-borato a 22,5 mM e EDTA 0,5 mM) em géis de poliacrilamida não desnaturantes 8% ou 15%. Os géis foram documentados e analisados no equipamento Typhoon 9210 (GE Healthcare).

4. Resultados e Discussão

4.1 Análise da seqüência de *pacC*

Experimentos de *Southern blot* anteriormente realizados em nosso grupo, empregando-se sonda homóloga, mostraram que *pacC* ocorre em cópia única no genoma do fungo (dados não mostrados). A análise comparativa de seqüências genômicas e de cDNA do gene *pacC* de *H. grisea* revelou a existência de fase aberta de leitura (ORF) de 2111 pb, que contém dois íntrons (98 e 93 pb) (**Figura 2a**). Esta ORF codifica um polipeptídeo predito de 639 resíduos de aminoácidos, o que daria origem a uma proteína de aproximadamente 67,5 kDa.

A utilização da ferramenta *ScanProsite* (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) permitiu a identificação, na seqüência de resíduos de aminoácidos deduzida de *PacC*, de três distintos motivos do tipo Cys2His2 (resíduos 99 a 124, 135 a 159 e 165 a 187, **Figura 2a**), denominados “dedos-de-zinco” (Evans & Hollenberg, 1988). Domínios do tipo “dedo-de-zinco” são estruturas freqüentemente presentes em fatores transcricionais, constituindo um domínio de ligação ao DNA (DLD). Estas estruturas são geralmente compostas por 25 a 30 resíduos de aminoácidos e contêm duas cisteínas e duas histidinas posicionadas nas extremidades, de modo a fazerem a coordenação tetraédrica de um átomo de zinco (**Figura 3a e 3b**) (Berg, 1988). Já a análise por meio da ferramenta *MOTIF Search* (<http://motif.genome.jp/>) identificou na seqüência uma região rica em glutamina (resíduos 44 a 63) (**Figura 2a**). Regiões ricas em glutamina estão presentes em fatores de transcrição de diversos organismos e são domínios que possuem papel fundamental na ativação transcricional (Gerber et al., 1994).

A realização de alinhamentos múltiplos de seqüência indicou que a proteína predita de *H. grisea* mostrou considerável similaridade com homólogos de *PacC* identificados em outros fungos como *Magnaporthe grisea* (73,8 %) (Dean et al., 2005), *Neurospora crassa* (72 %) (Galagan et al., 2003), *Fusarium oxysporum* (69,7 %) (Caracuel et al., 2003), *Aspergillus niger* (61,3 %) (MacCabe et

al., 1996) e *Aspergillus nidulans* (60,1 %) (Tilburn et al., 1995). Conforme esperado, o DLD é a região que apresenta maior similaridade, em particular, a similaridade de 92,1 % compartilhada com o DLD de PacC de *A. nidulans* (**Figura 3a**). Especialmente o terceiro “dedo-de-zinco”, muito conservado entre homólogos de PacC e que, em *A. nidulans*, inclui em si um sinal de localização nuclear (KKHVKT), cujas duas primeiras lisinas são essenciais para endereçamento da proteína para o núcleo (Fernandéz-Martínez et al., 2003).

Outras regiões de interesse aparecem bastante conservadas entre os homólogos de PacC em *H. grisea* e *A. nidulans*. A primeira é uma região compreendida entre os resíduos 496 e 521 (**Figura 2a**). Denominada *signaling protease box* em *A. nidulans*, essa é a região envolvida na primeira clivagem proteolítica de PacC, com especial destaque para o resíduo de leucina na posição 498 (conservada como Leu-516 em *H. grisea*), cuja substituição por serina impede o processamento do fator transcricional (Diéz et al., 2002). Flanqueando esta região, pudemos observar a presença de dois motivos YPSL (posições 483-486 e 632-635), que correspondem diretamente às regiões YPRL e YPTL nas posições 455 e 662 em *A. nidulans*. Estes dois motivos são encontrados em todos os homólogos de PacC (consenso YPXL/I) e, em *A. nidulans*, são especificamente reconhecidos por PalA que recruta PacC formando um complexo protéico junto com PalB e PalC, culminando na primeira clivagem e na remoção de ~180 resíduos de aminoácidos da porção C-terminal da proteína (Vicent et al., 2003).

Tomados em conjunto, esses dados comparativos indicam fortemente que a proteína de *H. grisea* provavelmente não só reconhece e é capaz de se ligar à seqüência consenso 5'-GCCARG-3' (Espeso et. al., 1997), como também poderia compartilhar do mesmo mecanismo de processamento com seu homólogo em *A. nidulans*.

a

gttgggagctctcccatatggctcgacctgcaggcgtgcgactagtgatttgcattctgttggaggaactggt -559
cttctccccctttttgcatctcctgtgtgctcactttgcaccggcccaagtgtgcagaatcaccgccaga -487
aatccagacgcaaacgcgaaactgtcttccgagcttgcaccggccaagtctccgtttctcctcgaccgtcc -415
ttggcattcccgttttttgagcgcgagctctgcaccgtccgagcctcccaagaactcttggccttggcgcg -343
ccttggcaagcagccattgaagttctgggcaagtcttgggagaagggccccaggggaaggttgcagcaca -271
gccaatcagactctgacaacctgacgctgagtcagccgaccaatcacgtcgcttgccctcagccccacgct -199
cttggccccacggccccgcacgcacacacaaaaaccctcacgtgaaaccacgtgattttttctctttct -127
tcctctcacggaactttccgcttcttcccctcaccaccgactttttaccgactttttcccgaacatcaccc -55
M S E L
accacaccgcccgaactgccaagccaagcgaagccaagcacgtgacgtgatcacg ATG TCG GAA CTT 4
P A D Q G Q A A Q A S A P A T N D N 12
CCC GCA GAC CAA GGC CAA GCC GCC CAG GCT TCG GCG CCG GCG ACC AAT GAC AAT 66
G A A A P N A T T T N V A S T V A S 40
GGC GCT GCT GCC CCG AAT GCC ACG ACG ACC AAC GTC GCC TCG ACG GTT GCG TCG 120
T T A Q G Q Q T Q Q A Q Q T Q Q Q T 58
ACG ACC GCT CAA GGC CAG CAG ACT CAA CAG GCC CAG CAG ACC CAG CAG CAG ACT 174
Q Q V Q Q A V A T S A S P V T A S T 76
CAG CAG GTC CAG CAG GCC GTC GCG ACG TCG GCA TCT CCC GTC ACT GCA TCC ACC 228
D A T P T P S T G A P T S T S S T G 94
GAT GCC ACT CCG ACT CCC TCG ACT GGT GCT CCC ACC AGC ACC TCC AGC ACC GGT 282
Q D E G L I C R W E D C R E S F V S 112
CAG GAT GAG GGT CTG ATC TGC CGC TGG GAG GAC TGC CGC GAA TCT TTC GTC TCT 336
A E A L Y 117
GCC GAG GCT CTC TAC gtaagtcgctgacaatcatggcgaactgaaacatttttgcctttgacctttgc 402
E H L C E R 123
aacccaactttcatttccgacgaagacactgactctttgctctccag GAG CAT CTT TGT GAG CGC 467
H V G R K S T N N L Q L T C Q W N N 141
CAT GTT GGT CGC AAG AGC ACC AAC AAC CTG CAG TTG ACC TGC CAG TGG AAC AAC 521
C R T T T V K R D H I T S H I R V H 159
TGC CGC ACC ACC ACC GTC AAG CGT GAC CAC ATC ACC TCC CAC ATC CGC GTG CAT 575
V P L K P H K C D N C G K S F K R P 177
GTG CCC CTC AAG CCT CAC AAG TGC GAC AAC TGC GGC AAG AGC TTC AAG CGC CCT 629
Q D L K K H I K T H A D D P N S M A 195
CAA GAC TTG AAG AAG CAC ATC AAG ACC CAT GCA GAT GAC CCC AAC AGC ATG GCT 683
A R A H H D P N A A L S A A Y R P A 213
GCT CGC GCC CAT CAC GAC CCC AAC GCC GCT CTC AGC GCC GCC TAC CGC CCG GCT 737
P G P R 217
CCC GGC CCG AGG C gtaagttttttcttttctccctttgtcatttccgttttcccactttcttttcttc 804
P P T G F Y N Q
ccttccgctcacggtaaatcaatttgctaacttctgtcag CC CCC ACT GGC TTC TAC AAC CAG 866
N P G A A P F H P Q G P T G Y Y A A 243
AAC CCC GGC GCC GCG CCC TTC CAT CCT CAA GGT CCG ACC GGC TAC TAT GCC GCT 920
P P G A P V Y S G A V Y Y P Q Q A P 261
CCG CCG GGC GCC CCG GTC TAC AGC GGT GCC GTT TAC TAC CCG CAG CAG GCT CCC 974
Q M G A P R A D Y G H Q A H M G H Q 279
CAG ATG GGT ACC CCC CGT GCC GAT TAT GGC CAC CAA GCC CAT ATG GGC CAT CAA 1028
P A G S A F A D A R K R D I D N L N 297
CCT GCC GGA AGT GCG TTC GCC GAT GCC CGC AAA CGC GAC ATT GAC AAC TTG AAT 1082
E W F G S V K R A Q I D P R S Y S Q 315
GAG TGG TTC GGT AGT GTT AAG CGA GCC CAG ATT GAT CCC CGT TCC TAT TCC CAA 1136
I G R S L M P L H S A V S F H A G G 333
ATC GGT CGA TCC CTG ATG CCC CTG CAC TCG GCC GTC AGC TTC CAC GCT GGC GGT 1190
G L A A E Y I Q P P H T L A G N T N 351
GGT CTG GCC GCT GAA TAC ATC CAG CCT CCG CAC ACA CTG GCT GGC AAC ACC AAT 1244
P L T Q H Y S L P P M P N V R T K E 369
CCG CTT ACC CAG CAT TAC TCG CTT CCC CCG ATG CCG AAT GTG CGT ACC AAG GAG 1298

D L Q Q L D Q M L E Q M E Q T I H L 387
GAT CTG CAG CAG CTC GAT CAG ATG CTG GAG CAG ATG GAG CAA ACA ATC CAC CTC 1352
G A S P T T H Y P H V D M R G S P T 405
GGA GCC TCG CCC ACG ACC CAC TAC CCT CAT GTC GAT ATG CGC GGT TCC CCC ACC 1406
T A S A P Y G Q R S V D G A Y A A 423
ACG GCC TCG GCT CCC TAC GGT CAG CGC TCC TCG GTT GAC GGT GCC TAC GCC GCC 1460
A A V S A A Q V V S P V S A G A H S 441
GCC GCA GTT TCG GCC GCC CAA GTC GTG TCC CCC GTT AGC GCC GGC GCA CAC TCC 1514
N G G S P A I T P P S S A M S Y T S 459
AAT GGT GGC AGC CCC GCC ATC ACC CCG CCC TCG AGC GCC ATG TCG TAC ACG TCG 1568
G G S P T T S S A N L S P S S R H S 477
GGT GGT TCG CCG ACC ACT TCT TCT GCC AAC TTG TCT CCT TCG TCG CGC CAC AGC 1622
S T S V S **Y P S L** P S R P N L P F P 495
TCG ACT TCG GTC TCG TAC CCC AGC CTG CCG AGC CGC CCC AAC CTG CCG TTC CCG 1676
Q A A T L G S S F A H S E R R L S G 513
CAG GCG GCC ACC CTC GGT TCG TCG TTT GCT CAT AGC GAG CGC CGT CTC TCG GGC 1730
G M L Q R A S G M G T R H S D G D R 531
GGC ATG CTT CAG CGC GCC TCC GGC ATG GGC ACC CGC CAC TCG GAT GGA GAC CGT 1784
S P T P R A S E H N A A V G S P S E 549
TCC CCG ACT CCT CGC GCA TCG GAG CAC AAC GCG GCC GTT GGC TCG CCC TCG GAA 1838
G G A E S G N E T E N Y D P Q Q A L 567
GGC GGC GCC GAG TCC GGC AAT GAG ACC GAG AAC TAC GAC CCC CAG CAG GCT CTC 1892
R T L T T L H N W V R L R L A N Q D 585
CGC ACC CTT ACG ACC CTC CAC AAC TGG GTG CGC CTT CGC CTC GCG AAC CAG GAC 1946
Y E D D S G Q A G T S A S A A G A R 603
TAC GAG GAC GAT TCG GGC CAG GCT GGC ACG TCG GCC AGC GCC GCC GGC GCC CGC 2000
E N D N V V D N S R I D P L L H G D 621
GAG AAC GAC AAT GTC GTG GAC AAC AGC CGC ATC GAT CCC TTG CTG CAC GGC GAC 2054
Q A G R G D T R V N **Y P S L** P P M T 639
CAG GCG GGA CGG GGT GAC ACT CGT GTC AAC TAT CCG TCG CTC CCG CCG ATG ACT 2108
* 640
TAG gaagaactcaacaggtcgtggcagtcgggggttctatgggtttttacaactggtataacgggtatagcg 2178
gttaacgggttttacggggttgatgggatggatgggtttgggatgggaaaaaaaaaggaaatgacaacatggac 2250
gggaaatgaggactttgtttcgtcatggctttcagatggctcatggctgggttgatattttctttcggcggt 2322
gtcttttattattcctgtttgagtttctacctacggggtgttgataccttaccttgcaacatgtctgagtt 2394
gagaggaccgagctggcggttttctttcgttttctcgtctgctgcgctctccgtttctccgtttctccgttatctt 2466
ccagttcgttcggttgctcggtttgttgctcgtctgcttttgcgctcgccccgcccttgggatgcatccattc 2538
atggattttccttttcttcaagaggaagaaactctccttgcgacgcgaagtggggcaggcattgaacc 2610
ggactggactggaagctggacgcatgtccttcagcagcgggaacggttgagagcagcagcattatacatgga 2682
tcatgagcagcctggcggttagatcatgggcatggaaatgcaaatgcaaatgcaaatggaaatgaaacccga 2754
tttgattgaaacctcgtgtgcttccatcatcatctccatgggtgaggtaatatcgtaatgtcccctaag 2826
tacggacgtaggaggtacctggaccggacctactacgcgtacttaatcctcctccctccgcccccgctccatt 2898
acac 2902

b

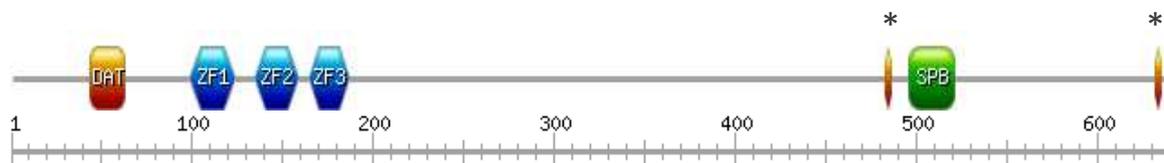


Figura 2. Seqüência do gene *pacC* de *H. grisea*. (a) A ORF predita de 2111pb é interrompida pela presença de dois íntrons. As seqüências não-codantes estão representadas em letra minúscula. Em amarelo, está destacada a região rica em glutamina, referente à possível região de ativação transcricional. Em azul, estão destacados os possíveis motivos “dedos-de-zinco”, formando o domínio de ligação ao DNA. Em verde, o *signaling protease box*, onde ocorre possível clivagem proteolítica por um homólogo de PalB. Flanqueando esta região, há dois motivos YPSL (em laranja), passíveis de reconhecimento por um homólogo de PalA. A seqüência de nucleotídeos foi depositada no GenBank com o número de acesso EU684545.1. As posições são relativas ao códon de iniciação da tradução (ATG). (b) Representação esquemática de PacC de *H. grisea*. DAT: domínio de ativação transcricional, ZF1-3: motivos em “dedos-de-zinco”, SPB: *signaling protease box*. Os asteriscos indicam os motivos YPSL.

relacionado com o controle da expressão de uma endoglicanase (*egl1*) e de *cbh1.2* (*exo1*). Neste mesmo trabalho, a análise de acumulação dos transcritos de *egl1* e *cbh1.2* por *Northern blotting* revelou que tais genes são claramente mais expressos quando o fungo é crescido em celulose microcristalina (Avicel). Por outro lado, quando apenas D-glicose estava disponível como fonte de carbono, tais genes foram reprimidos, ao passo que *creA* foi substancialmente mais expresso.

Em outro trabalho (Takashima et al., 1999c), a análise por *Northern* revelou que, ao longo de 36 h, diversos genes de celulasas (*egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4* e *cbh1.2*) também foram altamente induzidos por Avicel, sendo os mensageiros detectados a partir de 12h. De-Paula e colaboradores (1999) mostraram que, na presença de bagaço de cana-de-açúcar, o mRNA de *cbh1.1* apresenta um pico de acumulação em 6 h. Esses estudos confirmam a influência que as fontes de carbono têm na regulação transcricional em *H. grisea* e mostram que o sistema celulolítico do fungo responde de forma diferencial, ao menos temporalmente, de acordo com a fonte de carbono utilizada. No entanto, apesar de informações úteis terem sido obtidas, a análise por *Northern blotting* é menos sensível que abordagens baseadas em PCR, portanto mRNAs produzidos em períodos de indução anteriores aos analisados podem não ter sido detectados.

Em nosso trabalho, os perfis de acumulação dos RNAs mensageiros de oito genes codificadores de glicosil hidrolases e de dois fatores transcricionais foram acompanhados ao longo de 18 h de cultivo de *H. grisea* crescido em duas fontes de carbono e duas condições de pH do meio de cultura (**Tabela 2**). A exposição do fungo ao bagaço de cana-de-açúcar explodido a vapor (BCA) como única fonte de carbono, quando em comparação ao uso de D-glicose, resultou nos maiores níveis de acumulação de transcritos para todos os genes de celulasas e para o de xilanase.

Tabela 2. Análise por PCR em tempo real, da acumulação dos transcritos de genes de glicosil hidrolases e fatores transcricionais de *H. grisea*.

Gene	Período de cultivo (h)	D-glicose		Bagaço de cana-de-açúcar	
		pH 5,0	pH 8,0	pH 5,0	pH 8,0
<i>cbh1.1</i>	0,5	1,74 ± 0,05 ^a	1,68 ± 0,05 ^a	16,27 ± 1,75	74,33 ± 9,90
	2	1,82 ± 0,60 ^a	1,80 ± 0,02 ^a	53,31 ± 4,99	345 ± 103,35
	6	2,16 ± 0,30 ^a	2,00 ± 0,05 ^a	127 ± 14,60	38,5 ± 8,59
	18	9,57 ± 1,33 ^a	10,20 ± 1,44 ^a	11,02 ± 1,59 ^a	30,49 ± 4,72
<i>cbh1.2</i>	0,5	3,64 ± 0,51 ^a	3,58 ± 0,25 ^a	3,34 ± 0,62 ^{ab}	2,14 ± 0,10 ^b
	2	4,56 ± 1,47 ^a	4,55 ± 0,38 ^a	6,15 ± 0,58 ^a	10553,92 ± 2,147,12
	6	10,28 ± 0,51 ^a	10,53 ± 0,82 ^a	3297,59 ± 328,56	5671,75 ± 651,42
	18	44,46 ± 7,05 ^{ab}	40,98 ± 4,21 ^a	78,81 ± 12,48 ^b	304,96 ± 26,48
<i>egl1</i>	0,5	3,92 ± 0,45 ^a	3,49 ± 0,23 ^a	18,04 ± 1,22	0,52 ± 0,04
	2	1,89 ± 0,65 ^{ab}	1,37 ± 0,44 ^a	3,89 ± 0,50 ^b	452,07 ± 116,33
	6	1,69 ± 0,16 ^a	1,54 ± 0,20 ^a	291,26 ± 43,35 ^b	179,52 ± 40,65 ^b
	18	4,13 ± 1,00 ^a	4,39 ± 0,70 ^a	13,32 ± 3,38 ^{ab}	7,07 ± 1,88 ^b
<i>egl2</i>	0,5	0,40 ± 0,06 ^{ab}	0,44 ± 0,05 ^a	0,27 ± 0,02 ^{ab}	0,72 ± 0,10 ^a
	2	0,28 ± 0,09 ^a	0,21 ± 0,02 ^a	0,22 ± 0,01 ^a	23,37 ± 8,30
	6	0,21 ± 0,04 ^a	0,18 ± 0,06 ^a	118,18 ± 21,73	500,42 ± 49,14
	18	0,23 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,03 ^a	1,67 ± 0,73 ^a	25,82 ± 6,24
<i>egl3</i>	0,5	0,47 ± 0,06 ^a	0,23 ± 0,11 ^a	0,54 ± 0,08 ^a	1,57 ± 0,48 ^a
	2	0,36 ± 0,09 ^{ab}	0,50 ± 0,01 ^a	0,18 ± 0,05 ^b	23,55 ± 7,34
	6	0,21 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,04 ^a	5,38 ± 1,02	10,41 ± 1,2
	18	0,60 ± 0,10 ^a	0,69 ± 0,02 ^a	0,62 ± 0,05 ^a	1,14 ± 0,23 ^a
<i>egl4</i>	0,5	2,30 ± 0,38 ^a	0,04 ± 0,02 ^b	2,37 ± 0,34 ^a	0,01 ± 0,00 ^b
	2	3,01 ± 0,55	0,21 ± 0,01 ^a	5,72 ± 0,21	0,78 ± 0,22 ^a
	6	2,30 ± 0,14 ^a	0,14 ± 0,07 ^b	3,60 ± 0,37	1,27 ± 0,55 ^{ab}
	18	4,34 ± 0,97 ^{ab}	1,69 ± 0,30 ^a	5,07 ± 0,72 ^b	0,27 ± 0,08
<i>bgl4</i>	0,5	10,01 ± 3,25 ^a	10,41 ± 0,48 ^a	38,07 ± 5,91	262,33 ± 20,12
	2	14,64 ± 1,23 ^a	10,22 ± 1,04 ^a	14,46 ± 2,90 ^a	297,71 ± 90,75
	6	13,13 ± 1,06 ^a	12,09 ± 0,45 ^a	35,36 ± 4,13	187,54 ± 31,80
	18	10,58 ± 1,80 ^a	9,36 ± 0,19 ^a	7,41 ± 1,07 ^a	125,45 ± 17,34
<i>xyn1</i>	0,5	1,17 ± 0,11 ^a	1,12 ± 0,05 ^a	3,27 ± 0,28	19,42 ± 2,13
	2	0,93 ± 0,20 ^a	0,82 ± 0,01 ^a	3,46 ± 0,86	709,81 ± 182,41
	6	1,12 ± 0,16 ^a	1,44 ± 0,12 ^a	65,17 ± 6,04	255,36 ± 42,46
	18	0,48 ± 0,07 ^a	0,40 ± 0,01 ^a	3,23 ± 0,23	9,43 ± 2,15
<i>pacC</i>	0,5	0,70 ± 0,17 ^a	0,88 ± 0,49 ^a	1,58 ± 0,28 ^a	1,27 ± 0,15 ^a
	2	1,49 ± 0,35 ^a	1,39 ± 0,22 ^a	1,30 ± 0,08 ^a	1,00 ± 0,39 ^a
	6	1,10 ± 0,07 ^a	1,81 ± 0,60 ^a	0,99 ± 0,16 ^a	1,37 ± 0,09 ^a
	18	0,76 ± 0,11 ^a	1,38 ± 0,11 ^b	0,83 ± 0,12 ^a	1,77 ± 0,22 ^b
<i>creA</i>	0,5	15,60 ± 6,70 ^a	3,48 ± 1,57 ^a	8,29 ± 1,57 ^a	0,36 ± 0,03 ^a
	2	30,34 ± 6,24	2,51 ± 0,29 ^{ab}	5,31 ± 1,14 ^a	1,45 ± 0,26 ^b
	6	95,43 ± 12,17	44,21 ± 13,09	4,20 ± 0,47 ^a	6,10 ± 1,20 ^a
	18	18,65 ± 4,99	4,06 ± 0,84	1,11 ± 0,06 ^a	0,74 ± 0,24 ^a

Os dados são apresentados como valores de *fold change* ± erro padrão da média de três repetições, em comparação com os valores de expressão observados no período de cultivo de 0 h (*fold change* = 1). Letras iguais denotam que não houve diferença estatística entre os dados comparados no mesmo período de incubação ($P < 0,05$).

Tomando em consideração as condições de pH empregadas, um padrão pôde ser distinguido para sete dos oito genes de hidrolases analisados. *cbh1.1*, *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *bgl4* e *xyn1* apresentaram um notável e paralelo aumento nos níveis de mRNA quando o fungo foi crescido em BCA em pH 8,0. Nesta condição, a acumulação dos transcritos não foi apenas maior como também alcançou níveis máximos mais precocemente do que em pH 5,0. Isso foi observado como picos de acumulação em 2 h, excetuando-se *egl2*, com máximo alcançado em 6 h, e *bgl4*, que apresentou a resposta de indução mais rápida (0,5 h) e manteve um alto nível de mRNA ao longo das 18 h de cultivo. Quando D-glicose foi empregada como fonte de carbono, nenhuma diferença de acúmulo foi observada para estes sete genes nos pHs 5,0 e 8,0. Contudo, um padrão divergente foi observado para *egl4*, cujo mensageiro preferencialmente acumulou em condições acídicas.

Esta análise de expressão dos genes de celulasas e de xilanase de *H. grisea* reforça não apenas as propriedades indutoras do bagaço de cana-de-açúcar, mas também fornece evidências do mecanismo subjacente. O padrão de acumulação de transcritos de glicosil hidrolases, que atingem um pico máximo para depois decaírem, já foi reportado para outros fungos, tais como *T. reesei* (Verbeke et al. 2009) e *Polyporus arcularius* (Ohnishi et al. 2007). Assim, a acumulação tardia dos mRNAs observada nos estudos de *Northern blotting* com *H. grisea* anteriormente poderia acontecer devido a síntese *de novo*. Essa suposição corrobora uma refinada regulação da transcrição e do *turnover* de mRNAs. Uma vez que a estabilidade dos transcritos de celulasas varia de horas a minutos em diferentes fungos (Messner & Kubicek, 1991; Yagüe et al. 1997). Futuras análises no modelo de *H. grisea*, empregando-se compostos repressores da transcrição e tradução, assim como a avaliação de tempos de cultivo mais longos, podem elucidar o papel da estabilidade dos mRNAs e a possibilidade da síntese *de novo* durante a produção das hidrolases.

Diferenças na capacidade de indução da fonte de carbono empregada representam outra

possibilidade que explica as diferenças nos padrões de expressão dos genes de celulases encontradas em nosso estudo. Diferentes respostas de indução para a expressão de genes de celulases e de xilanases já foram descritas para *T. reesei* em razão da fonte de carbono utilizada (Margolles-Clark et al., 1997). Em *H. grisea*, Poças-Fonseca e colaboradores (2000) demonstraram que o emprego de várias fontes de carbono solúveis e insolúveis também resultaram em diferentes padrões de expressão para *cbh1.1* e *cbh1.2*. Enquanto o transcrito de *cbh1.2* foi detectado em todas as condições utilizadas, *cbh1.1* é induzido apenas em resposta à presença de fontes de carbono complexas e insolúveis, como o BCA.

Com a utilização de Avicel como fonte de carbono (Takashima et al., 1999c), quatro genes de endoglicanases (*egl1*, *egl2*, *egl3* e *egl4*) de *H. grisea* apresentaram um padrão similar de indução, em pH 7,0, com acumulação dos transcritos iniciando em 24 h e estendendo-se até 36 h. No entanto, no presente trabalho, a utilização de BCA (e pH alcalino) levou a um pico tardio dos níveis de mRNA de *egl2* (6 h), quando em comparação com os transcritos dos outros genes de endoglicanases (2 h). Adicionalmente, é relevante notar que o trabalho conduzido por Takashima e colaboradores (1999c) não avaliou a abundância dos mRNAs em períodos posteriores a 36 h e, portanto, a possibilidade de decaimento nos níveis dos transcritos em períodos subseqüentes de cultivo não pode ser desconsiderada. Já outro estudo de nosso grupo (De-Paula et al., 1999), como mencionado anteriormente, mostra uma detecção precoce do mRNA de *cbh1.1* em 6 h, com decaimento em 12 h, não ocorrendo detecção nos tempos subseqüentes de cultivo. Assim como De-Paula e colaboradores (1999), nós também utilizamos BCA como fonte de carbono e o padrão observado para o transcrito de *cbh1.1* vai de encontro aos nossos resultados, embora apenas no ambiente ácido (**Tabela 2**). No presente estudo, a indução de *cbh1.1* foi antecipada em pH alcalino; posteriormente, será discutido o papel do pH do meio de cultivo na indução dos genes de hidrolases .

Diferenças nas cinéticas de sacarificação do substrato fornecem uma explicação razoável para o fato de BCA antecipar a resposta de expressão dos genes de hidrolases em *H. grisea* em relação à Avicel. A taxa de hidrólise enzimática da celulose é diretamente afetada pelo seu grau de cristalinidade (Jeoh et al., 2007), de forma que substratos mais cristalinos tendem a apresentar uma menor taxa de degradação. Desta forma, o alto grau de cristalinidade da celulose encontrada no Avicel presumivelmente torna a bioconversão mais lenta e, conseqüentemente, a liberação de produtos solúveis que poderiam funcionar como indutores. Por outro lado, o BCA que utilizamos representa um substrato mais complexo (celulose 47,7%, hemicelulose 8,9% e lignina 34,3%; Golvea et al., 2009) e seguramente conta com regiões de menor grau de cristalinidade, estando, assim, mais acessível à degradação enzimática. Adicionalmente, os pré-tratamentos impostos ao bagaço de cana-de-açúcar, como a explosão a vapor e a moagem em moinho de bolas, provavelmente levaram a uma formação antecipada de oligossacarídeos indutores de glicosil hidrolases (Ramos, 2003). Além disso, independentemente da fonte de carbono complexa empregada, a diminuição dos níveis de mRNA após o máximo atingido parece ser devida ao rápido consumo dos açúcares indutores formados ao longo do processo de hidrólise, como observado por Verbeke e colaboradores (2009).

Dados a respeito do consumo de D-glicose, peso seco dos micélios e conteúdo de proteínas nos sobrenadantes de cultivo também foram coletados durante as 18 h de cultivo (**Figura 4**). Os resultados indicam um acelerado consumo de D-glicose quando *H. grisea* foi cultivado em pH alcalino, resultando em um maior acúmulo de massa miceliana (**Figuras 4a e 4b**). A D-glicose produzida nas culturas com BCA não pôde ser quantificada provavelmente devido ao seu rápido consumo após liberação a partir da lignocelulose (**Figura 4a**). A utilização de BCA em pH 8,0 levou a uma maior secreção de proteínas nos sobrenadantes de cultivo, com destaque para CBH1.2 (**Figuras 4c e 5**). Isso representa uma condição de cultivo otimizada para *H. grisea*, visando a

produção de enzimas para aplicações biotecnológicas, especialmente aquelas que requerem pH alcalino, como a formulação de detergentes, o branqueamento do papel e a sacarificação de biomassa vegetal pré-tratada em ambiente alcalino (revisto por Horikoshi, 1999).

A concentração de D-glicose também foi medida depois das 24 h de pré-crescimento dos micélios, antes da sua transferência para os meios de indução. Tal resultado indicou que todo o carboidrato havia sido consumido ao longo dessas 24 h (dados não mostrados). A medida dos valores de pH dessas mesmas pré-culturas indicou que, sem tamponamento do meio, *H. grisea* espontaneamente aumentou o pH do meio de cultivo, de 6,8 para 7,8 ($\pm 0,2$). Essa alcalinização do meio de cultura por *H. grisea* já havia sido reportada anteriormente por nosso grupo (De-Paula, 1999).

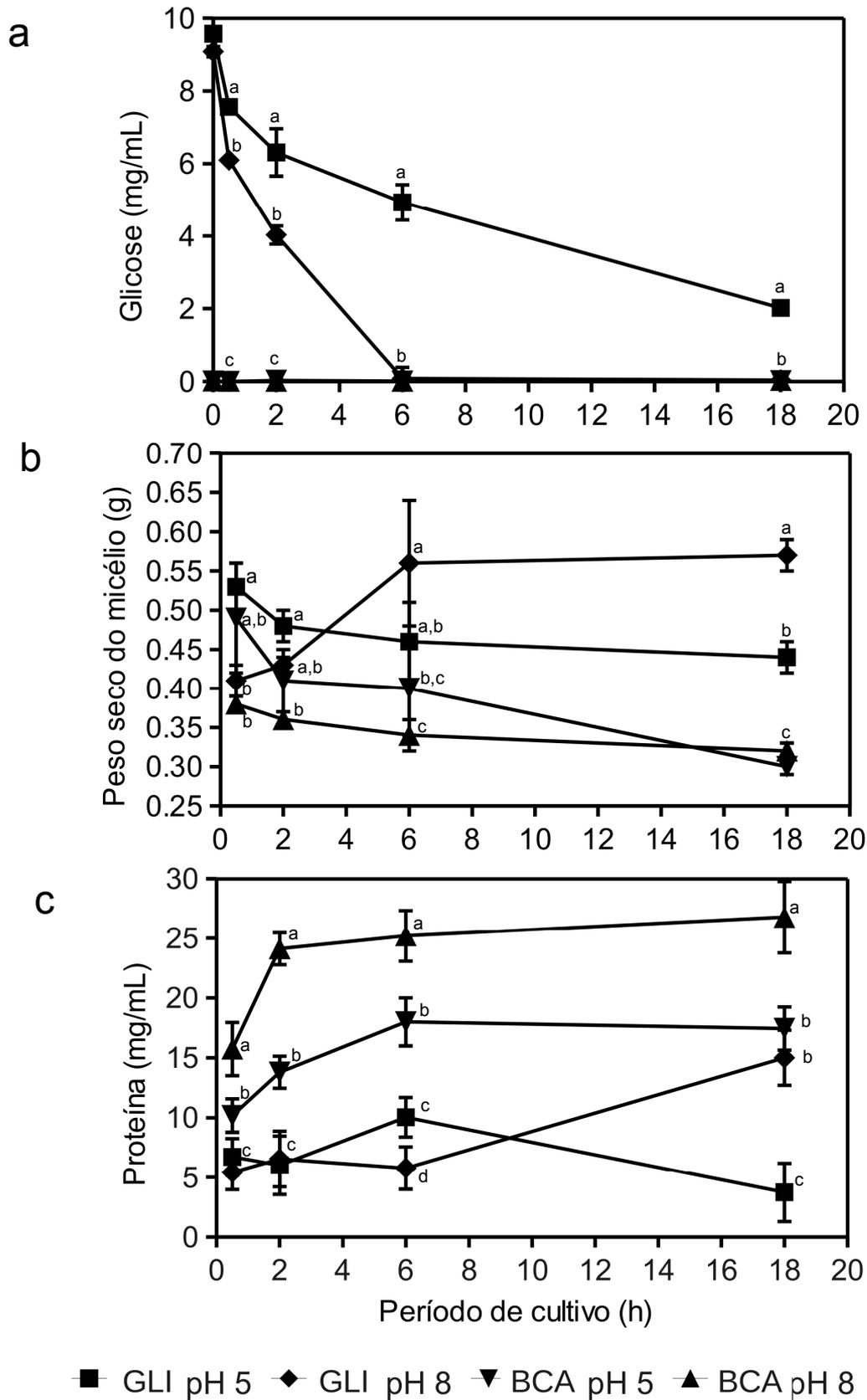


Figura 4. Cultivo de *H. grisea* na presença de 1% de glicose (GLI) ou 0,1% de bagaço de cana-de-açúcar (BCA) e em diferentes condições de pH. (a) consumo de glicose, (b) peso seco do micélio e (c) teor de proteína total secretado para os sobrenadantes de cultura. As barras de erro indicam \pm desvio padrão da média das três repetições. Letras iguais denotam que não houve diferença estatística entre os dados comparados no mesmo período de incubação ($P < 0,05$)

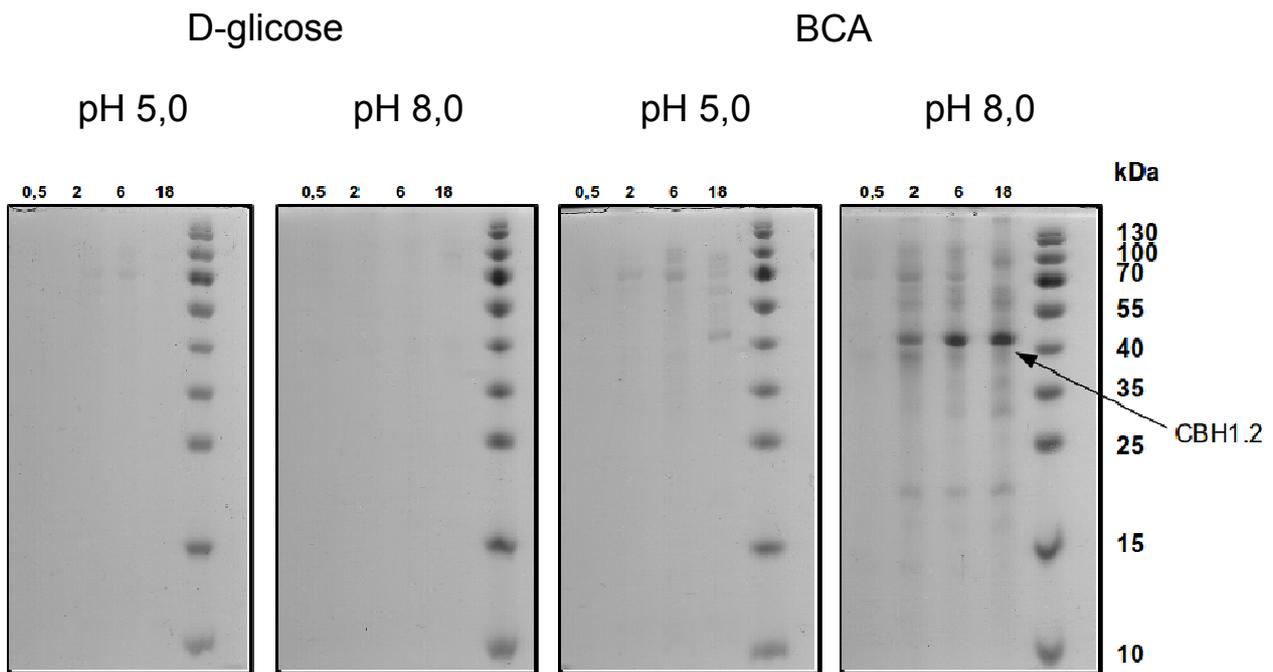


Figura 5. Gel de poliacrilamida desnaturante a 12% corado com azul de Coomassie de 1 mL dos sobrenadantes de cultivo de *H. grisea*, precipitados com TCA, após 0,5, 2, 6 e 18h de indução. A banda de proteína que se destaca corresponde a CBH1. 2 (50 KDa), conforme identificada por De-Paula e colaboradores (2003).

Além dos genes codificadores das enzimas hidrolíticas, também foram avaliados os perfis de expressão dos genes relacionados aos fatores de transcrição PacC, que atua na regulação mediada pelo pH, e CreA, mediador da repressão por carbono (**Tabela. 2**). Ao longo das 18 h de cultivo, não foi observada diferença significativa na acumulação dos transcritos de *pacC*. A literatura científica indica que o sistema PacC é auto-regulado em vários fungos (Tilburn et al., 1995; MacCabe et al., 1996; Rollins and Dickman, 2001; You et al., 2007). Levando isso em consideração, assim como o incremento nos valores de pH no período de 24 h do pré-crescimento do micélio, inferimos que a transcrição de *pacC* já havia alcançado um estado de equilíbrio antes da transferência dos micélios para os meios de indução, o que poderia explicar a manutenção dos níveis de mRNA ao longo das 18 h de cultivo. Por sua vez, os transcritos de *creA* acumularam na presença de D-glicose e ainda mais em ambiente ácido, com um pico em 6 h de cultivo.

A manutenção dos níveis de transcritos de *pacC* motivou a investigação do perfil de expressão deste gene durante a mudança de pH do meio (**Figura 6a**). Após uma prévia incubação na presença de glicose e pH 5,0 por 2 h, os micélios foram transferidos para novos meios, contendo glicose ou BCA, pH 5,0 ou 8,0 e incubados por mais 2 h. Neste ensaio, o mRNA de *pacC* atingiu o maior acúmulo em ambiente alcalino, corroborando o papel do pH ambiente em sua regulação. Como essa maior acumulação do transcrito ocorreu na presença de BCA e como não foi observada diferença de expressão quando glicose foi empregada, existe a possibilidade que a repressão por carbono influencie a regulação de *pacC*. O padrão de acumulação do mRNA de *creA* também foi avaliado neste ensaio (**Figura 6b**) e apresentou um padrão similar àquele observado ao longo das 18 h de cultivo (**Tabela 2**).

Analisados em conjunto, nossos dados dos perfis transcricionais indicam que uma fonte de carbono complexa como BCA, assim como o pH do meio de cultivo, influenciam de forma significativa na regulação da transcrição nos genes de celulasas e de xilanase em *H. grisea*. Nossos dados indicam fortemente que *H. grisea* é sujeito à repressão por glicose, como anteriormente proposto (Takashima et al. 1998b; De-Paula et al. 1999). O padrão oposto do perfil de transcrição de *creA* em comparação com os demais genes indica que CreA seja o mediador do processo de repressão por glicose.

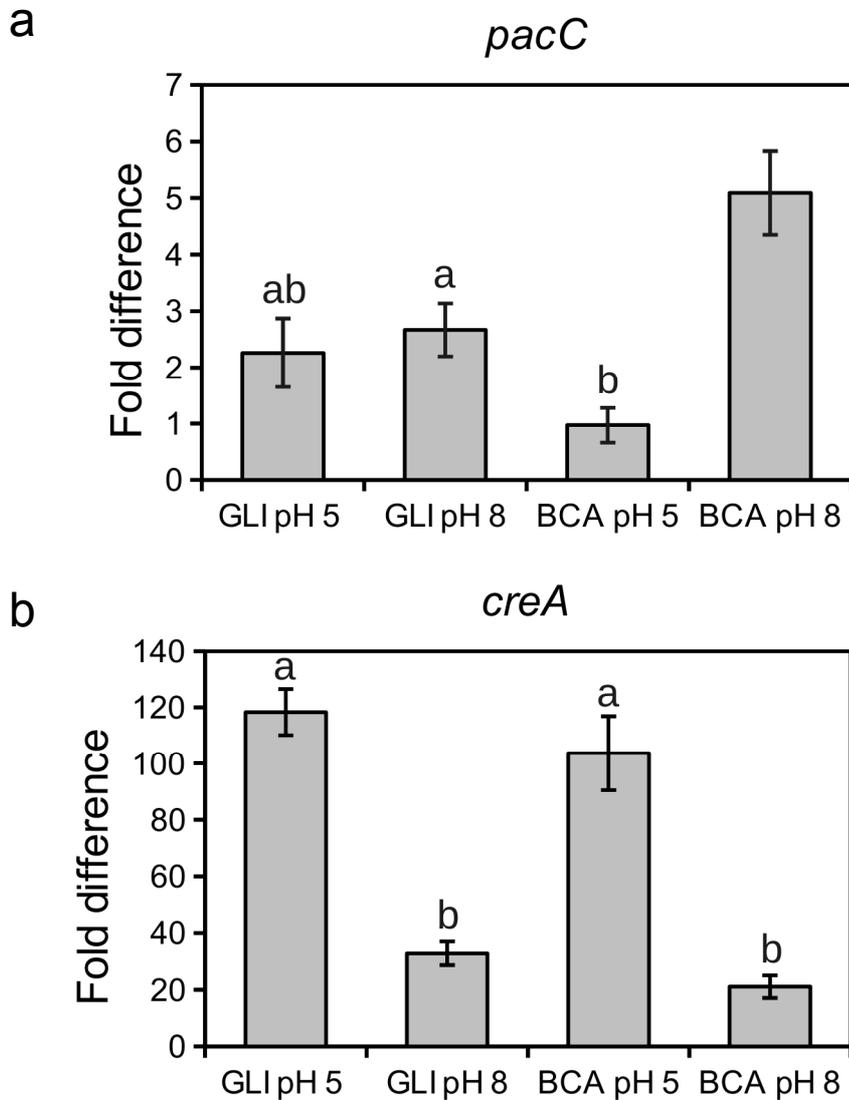


Figura 6. Análise por PCR em tempo real da acumulação dos transcritos de (a) *pacC* e (b) *creA* após a mudança de pH ácido para alcalino. Os micélios de *H. grisea* foram produzidos pela incubação direta de esporos no meio enriquecido de Pontecorvo por 24 h. Os micélios foram filtrados, lavados e pré-cultivados em MM com 0,1% GLI e incubados por 2 h. Posteriormente, estes micélios foram transferidos para novas alíquotas de MM com 1,0% GLI ou 0,1% BCA, em diferentes valores de pH (5,0 e 8,0) e incubados por mais 2 h. Os valores de *fold change* são apresentados em comparação com os níveis de mRNA dos micélios cultivados por 24 h em meio enriquecido de Pontecorvo (*fold change* = 1). As barras de erro indicam \pm erro padrão da média de três repetições. Letras iguais denotam que não houve diferença estatística ($P < 0,05$).

Apesar de *H. grisea* estar sujeito à repressão por carbono, a utilização de glicose como fonte de carbono não levou a um completo estado de repressão dos genes analisados, uma vez que todos os transcritos puderam ser detectados. Por outro lado, a falta de glicose, por si só, não foi suficiente para disparar a indução de glicosil hidrolases, com conseqüente acumulação de mRNAs. Isso é corroborado pelo fato de não haver diferenças entre os padrões dos transcritos quando o fungo foi cultivado em glicose com dois valores distintos de pH (**Tabela 2**).

Essas observações dão suporte à proposta de que, em *H. grisea*, indutores sejam requeridos para ativar a transcrição dos genes de glicosil hidrolases quando da ausência de fonte de carbono prontamente metabolizável. Isso vai de encontro com o que já é descrito para *T. reesei* (revisto por Kubicek et al., 2009). Neste fungo, mesmo em condições de repressão, assume-se a existência de um nível basal de expressão de genes de celulasas e hemicelulasas (El-Gogary et al. 1989; Carle-Urioste et al. 1997). As enzimas resultantes dessa expressão basal podem dar início à degradação de polissacarídeos complexos, permitindo uma rápida liberação de pequenas quantidades de oligossacarídeos indutores que vão impulsionar a biosíntese de mais hidrolases. Vários oligossacarídeos têm sido propostos com candidatos a indutores, especialmente os celooligossacarídeos (revisto por Aro et al., 2005). A sofrorose, um dissacarídeo potente indutor de celulasas (Hrmová et al. 1991; Ilmén et al. 1997), provavelmente é produzida a partir de celobiose por enzimas com atividade de beta-glicosidase (revisto por Aro et al., 2005).

Em *H. grisea*, pequenas quantidades de celobiose foram capazes de induzir a expressão de *cbh1.1* e *cbh1.2* (Poças-Fonseca et al., 2000). Como as beta-glicosidades podem atuar sobre a celobiose, clivando-a e liberando glicose ou gerando sofrorose por transglicosilação, o produto do gene *bgl4* de *H. grisea* poderia ser importante para a manutenção dos níveis de concentração de oligossacarídeos, de maneira a promover a indução de glicosil hidrolases dependendo da fonte de carbono disponível. Em nosso estudo, o perfil de transcrição de *bgl4* dá suporte a esta suposição,

uma vez que *bgl4* apresentou a mais rápida resposta de indução e manteve seu alto patamar de acumulação de mRNA ao longo de todo o período de cultivo (**Tabela 2**). O requerimento de beta-glicosidases para a rápida indução do sistema celulolítico já foi descrito anteriormente (Fowler & Brown, 1992; Mach et al. 1995).

Ressalta-se ainda o acúmulo alcançado pelo mRNA de *cbh1.2* (**Tabela 2**), cujo produto já foi relatado como a principal proteína secretada por *H. grisea* sob condições de indução para glicosil hidrolases (BCA) (De-Paula et al. 2003). Isso torna o promotor de *cbh1.2* interessante para aplicações biotecnológicas.

O pH do meio de cultura também foi relevante para o perfil de expressão dos genes estudados, especialmente o pH alcalino como adjuvante na presença de uma fonte de carbono complexa. Alguns exemplos da influência do pH na regulação da expressão de hemicelulases estão disponíveis. A expressão dos genes *xynA* e *xynB* de *Penicillium purpurogenum* é estritamente condicionada a um pH neutro (Chávez et al., 2002). Em *A. nidulans*, *xlnA* e *xlnB* apresentam padrões opostos de expressão: enquanto *xlnA* é expresso em pH alcalino, *xlnB* só é expresso em condições ácidas (McCabe et al., 1998). O transcrito de *xynII* de *Aureobasidium pullulans* atingiu um acúmulo 22 vezes maior em pH 8,0 do que em pH 2,7 (Tanaka et al., 2006). Extensivamente estudada em *A. nidulans*, a regulação transcricional dependente do pH tem como principal mediador o fator de transcrição PacC (Tilburn et al. 1995). Embora o sistema PacC esteja diretamente relacionado à regulação transcricional de algumas hemicelulases de *A. nidulans* (MacCabe et al., 1998; Gielkens et al., 1999), nossos dados ainda não permitem fazer tal associação para as glicosil hidrolases de *H. grisea*. Partimos então para a análise *in silico* do que é conhecido das regiões 5' não codificadoras a montante dos genes de interesse (5' UP).

4.3 Análise in silico das regiões 5' UP

No intuito de se obter informações adicionais sobre a regulação dos genes em estudo, foi realizada uma varredura de possíveis sítios de ligação de PacC e de CreA nas regiões 5' UP (**Tabela 3**). A seqüência consenso de ligação de PacC, 5'-GCCARG-3' (Tilburn et al., 1995; Espeso et al., 1997) foi observada em todos os genes de hidrolases, assim como em *pacC* e *CreA*, sendo *egl3* a única exceção. O motivo consensual 5'-SYGGRG-3', ao qual se liga CreA (Cubero & Scazzocchio, 1994), foi encontrado em todos os genes analisados, com exceção de *creA*. De uma forma geral, essa análise *in silico* reforça não só a hipótese de participação direta dos fatores PacC e CreA na regulação dos genes codificadores das hidrolases, como também a auto-regulação de *pacC* (oito motivos 5'-GCCARG-3' encontrados) e aponta ainda para uma possível regulação cruzada entre os dois fatores transcricionais.

Tabela 3. Possíveis sítios de ligação para PacC e CreA nas regiões 5' UP dos genes de *H. grisea*.

Gene	Tamanho conhecido da região 5' UP (pb)	Sítios de ligação para PacC 5'-GCCARG-3'	Sítios de ligação para CreA 5'-SYGGRG-3'
<i>cbh1.1</i>	1618	4	12
<i>cbh1.2</i>	1158	3	8
<i>egl1</i>	562	2	5
<i>egl2</i>	1277	1	2
<i>egl3</i>	607	-	4
<i>egl4</i>	849	1	6
<i>bgl4</i>	288	1	2
<i>xyn1</i>	1020	2	7
<i>pacC</i>	630	8	4
<i>creA</i>	242	1	-

No entanto, é importante notar que a porção conhecida das regiões 5' UP empregadas na análise variam muito em tamanho (de 242 a 1618 pb). Por isso, é possível que nem todos os sítios de ligação tenham sido detectados, especialmente nas seqüências menores como *creA* (242 pb) e *bgl4* (288). Neste contexto, vale ressaltar que a porção conhecida da região 5' UP de *egl3* não apresenta possíveis motivos de ligação a PacC, embora a expressão deste gene pareça ser

influenciada pelo pH (**Tabela 2**).

4.4 Análise *in vitro* da ligação de PacC e CreA a elementos em *cis*

Ensaio de *pull-down* empregando-se os DLDs de PacC e CreA permitiram recuperação de fragmentos de DNA correspondentes a várias regiões 5' UP (**Figura 7**). O emprego da proteína recombinante GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ resultou na recuperação de fragmentos dos promotores de todos os genes de hidrolases, assim como de um fragmento correspondente à região regulatória de *pacC*. Essa interação *in vitro* de CreA com as regiões regulatórias dos genes em estudo, juntamente com a presença de vários motivos de ligação 5'-SYGGRG-3' em todas as essas sequências (**Tabela 3**), sugerem o envolvimento direto de CreA na regulação de tais genes. Como esperado, a proteína recombinante GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ não foi capaz de se ligar a um fragmento do promotor de seu próprio gene, uma vez que não foi identificado um motivo de ligação. No entanto, conforme discutido anteriormente, a porção conhecida da região 5' UP de *creA* possui apenas 242 pb; assim, a existência de possíveis motivos de ligação à CreA à montante desses 242 pb não pode ser descartada. Esta hipótese é plausível, uma vez que em outros fungos, como *A. nidulans* e *Sclerotinia sclerotiorum*, há indícios de que CreA regule sua própria expressão (Strauss et al., 1999; Vautard-Mey & Fèvre, 2003).

A utilização de GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ nos ensaios de *pull-down* também permitiu a recuperação de vários fragmentos de promotores dos genes de interesse, o que também reforça uma possível participação deste fator na regulação de sua expressão. Nesta perspectiva, PacC atuaria como ativador para a maioria dos genes de hidrolases de *H. grisea* e como um repressor para *egl4*. Entretanto, duas exceções foram observadas (*creA* e *egl3*, **Figura 7**). A análise da região 5' UP de *creA* revelou a presença de um provável sítio de ligação a PacC (5'-GCCAGG-3'). Contudo, o *pull-down* do fragmento de promotor não ocorreu. No caso de *egl3*, o *pull-down* não ocorreu em

virtude da inexistência de motivos de ligação a PacC. No entanto, os padrões de expressão de *creA* e *egl3* foram claramente influenciadas pelo pH do meio de cultivo (**Tabela 2**). Desta forma, uma potencial regulação mediada por PacC poderia ocorrer diretamente, por meio de elementos *cis* ainda não descobertos, ou poderia ocorrer indiretamente, como resposta à ação de outros produtos gênicos cuja expressão seja influenciada por PacC. Uma terceira possibilidade, que igualmente explica a falha na recuperação de fragmentos de promotores e que leva em consideração os perfis dos transcritos de *creA* e *egl3*, é a existência de um mecanismo de regulação relacionado ao pH, independente do fator PacC. Diferentemente de CreA, o DLD de PacC é capaz de se ligar a região 5' UP de seu próprio gene, corroborando uma possível auto-regulação.

As análises de *pull-down* não indicam quais são os elementos em *cis* que interagem diretamente com as proteínas de fusão a GST. No entanto, mostram a capacidade de ligação ao DNA dos DLD de PacC e CreA, o que foi confirmado pelo emprego de controles negativos com GST purificada.

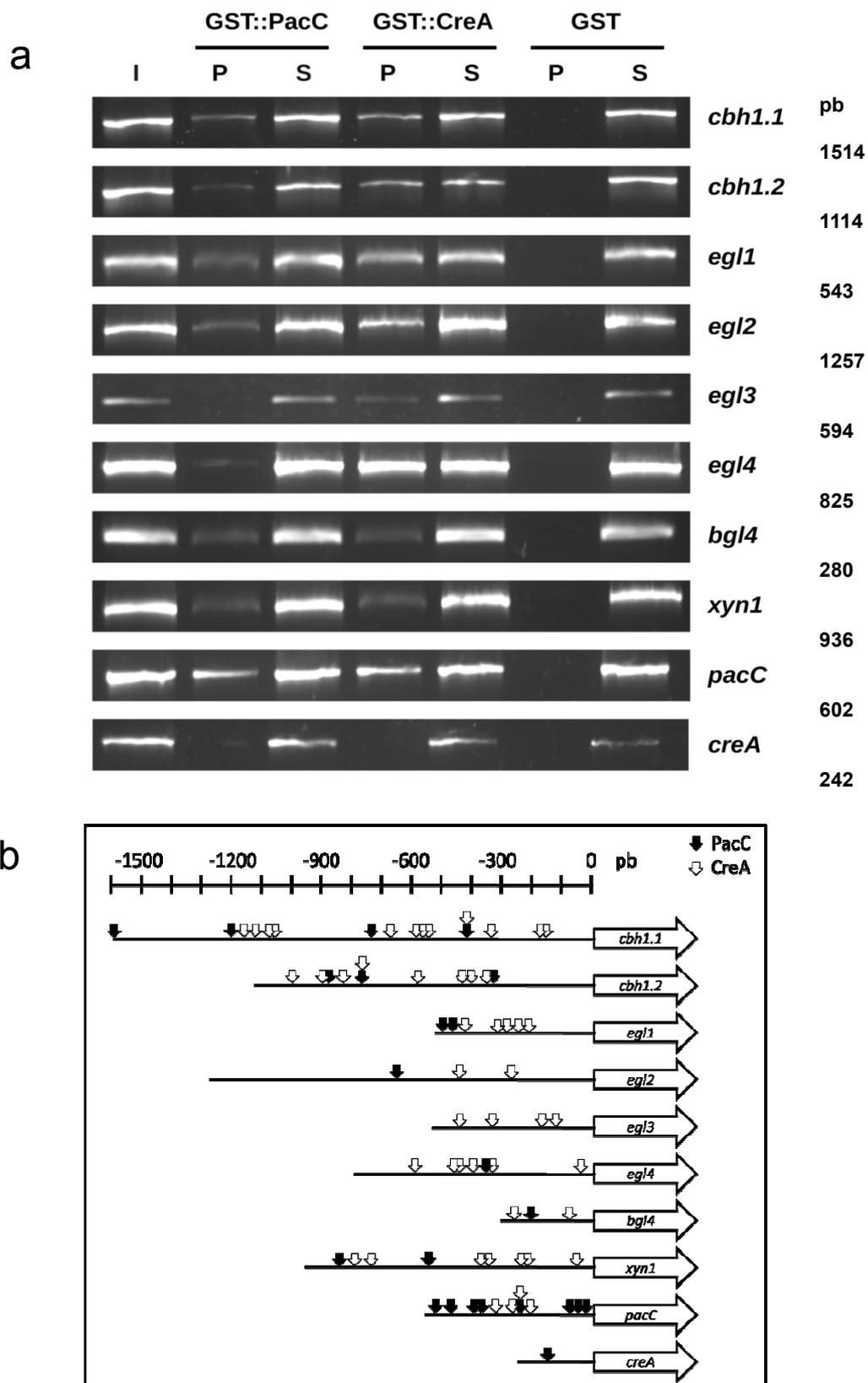


Figura 7. (a) Ensaio de *pull-down* para ligação *in vitro* de PacC e CreA nas regiões 5' UP de genes de *H. grisea*. As colunas estão indicadas como se segue: (I) *input* de DNA, antes do *pull-down*; (P) fragmentos de DNA recuperados dos precipitados após o *pull-down*; (S) fragmentos de DNA recuperados dos sobrenadantes. O tamanho dos fragmentos amplificados está indicado à direita **(b)** Diagrama dos promotores dos genes analisados com o posicionamento dos possíveis sítios de ligação.

Com o objetivo de investigar mais aprofundadamente a proposição de auto-regulação de PacC, o envolvimento do mesmo na expressão de *creA* e a possível participação de CreA na regulação de *pacC*, foram realizados ensaios de retardos de mobilidade eletroforética (EMSA). Tais ensaios visaram à detecção de complexos DNA-proteína entre os fragmentos de DNA dupla fita marcada com fluorescência (sonda) e as proteínas de fusão GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ e GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾.

Empregando-se sondas que correspondem a fragmentos da região 5' UP de *pacC* (**Figura 8a**), foi possível demonstrar que GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ se liga com especificidade a todos os cinco motivos de ligação testados (**Figura 8b**). Para a sonda 4, que possui dois motivos de ligação a PacC, notou-se uma aparente diferença de intensidade entre os complexos formados. Essa diferença indica que a proteína interagiu preferencialmente com o sítio número 2, embora tenha sido observada a formação de dois complexos DNA-proteína. O ensaio de competição utilizando uma versão da sonda 4, não marcada com fluorescência e contendo o sítio 2 mutado, aboliu a formação do segundo complexo (**Figura 8b**), mas não a ligação ao sítio 1. Este fato está de acordo com o observado em análises de interação de PacC em um sítio 5'-GCCAAG-3' no promotor do gene *ipnA* de *A. nidulans* (Espeso et al., 1997). Os autores demonstraram que a presença de uma base T, imediatamente precedendo o motivo de ligação, aumenta a afinidade de ligação de PacC ao elemento em *cis*. Em nosso caso, uma base T também precede o sítio 2 na sonda 4 (**Figura 8a**).

A sonda 5 apresenta um sítio de ligação a PacC, cuja seqüência se encontra na região 5' UP de *creA*. No entanto, o emprego de GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ juntamente com esta sonda não resultou na formação de um complexo de interação DNA-proteína (**Figura 8c**). Isso confirma o dado experimental de que o DLD de PacC não foi capaz de recuperar o fragmento do promotor de *creA* no ensaio de *pull-down* (**Figura 7**).

a

Sonda 1 (-215 a -173 em *pacC*)

5' -CCCTCAGCCCCACGCGTCTTGGCCCCACGGCCCCGCACGCACA-3'
 3' -GGGAGTCGGGGTGCAGCAACCGGGGTGCCGGGGCGTGCCTGT-5'

①
②
③
④

Sonda 2 (-301 a -278 em *pacC*)

5' -GAGAAGGGCCCCAGGGAAGGTT-3'
 3' -CTCTTCCC GGGTCCCTTCCTT-5'

①

Sonda 3 (-366 a -337 em *pacC*)

5' -CCAAGAATCTTGGCCTTGGCGCGCCTTTG-3'
 5' -GGTCTTGTGAGACCGGACCGCGCGGAAAC-5'

①
②

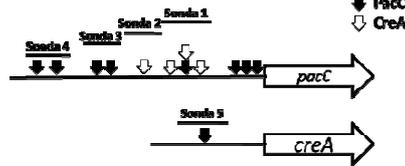
Sonda 4 (-449 a -404 em *pacC*)

①
PacC
 5' -GCACCGGCCAAGTCTCCGTTTCTCCTGACCGTCTTGGCATTC-3'
 3' -CGTGGCCGGTTCAGAGGCAAAGAGGAGCTGGCAGGAACCGTAAGGG-5'

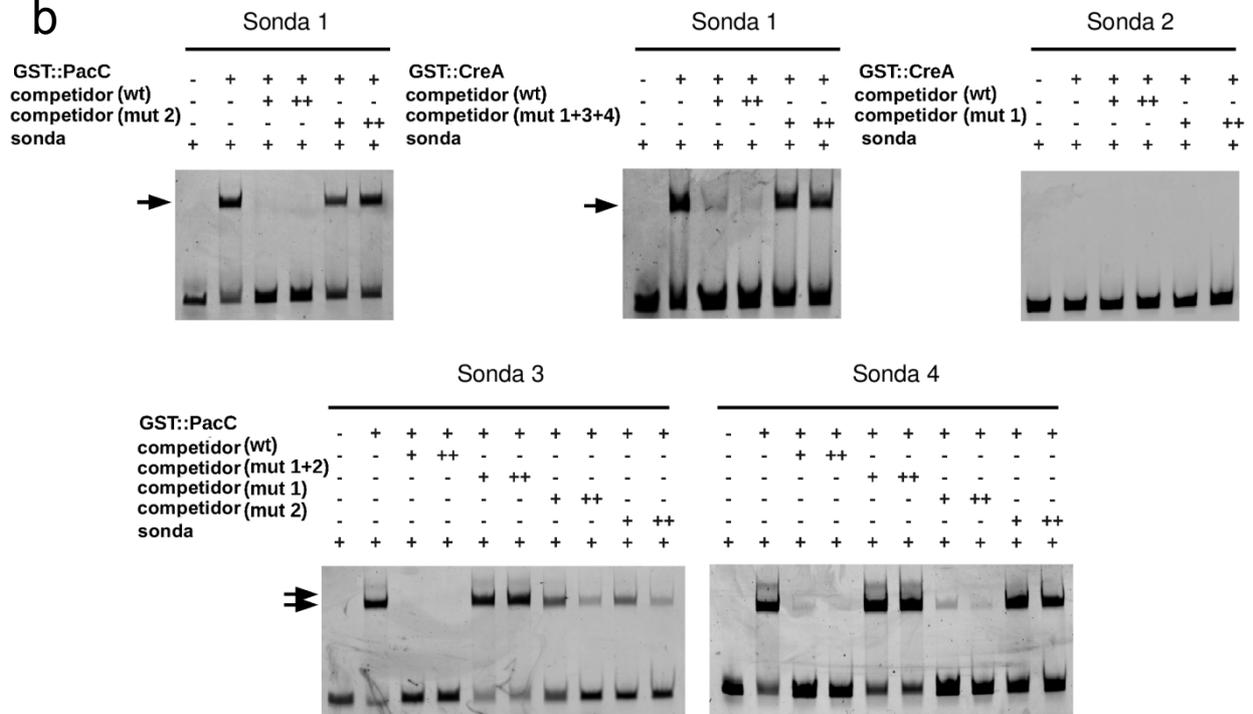
②
PacC

Sonda 5 (-137 a -118 em *creA*)

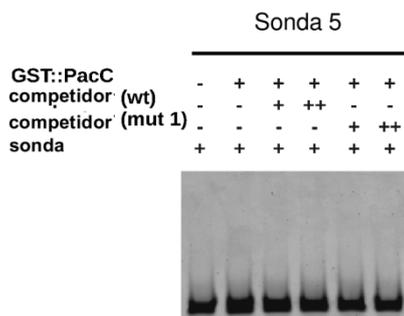
①
PacC
 5' -AACCTGCCCTGGCCAGCCCA-3'
 3' -TTGGACGGGACCGGTTCGGGT-5'



b



c



d

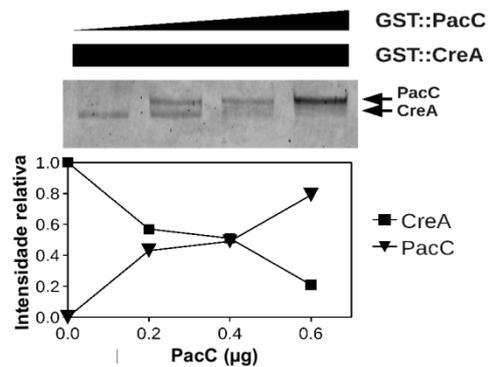


Figura 8. Ensaios de EMSA para as regiões 5' UP de *pacC* e *creA*. (a) Representação esquemática das sondas empregadas. Os sítios de ligação foram numerados e representados em negrito para ligação a PacC ou sombreado para ligação a CreA. As sequências das sondas de 1 a 4 estão contidas na região regulatória de *pacC*, enquanto a sonda 5 corresponde a uma parte da região 5' UP de *creA*. As posições são relativas ao códon de iniciação da tradução (ATG). Os EMSAs foram realizados em géis de poliacrilamida não desnaturantes 8%, com 0,5 µg de GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ ou GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ e as sondas fluorescentes para (b) *pacC* ou (c) *creA*. Sondas não marcadas, do tipo selvagem (wt) e mutantes (mut), foram utilizadas como competidores específicos em excesso molar de 100X e 200X. Os sítios de ligação mutados estão indicados conforme a numeração. Mutações que abolem a ligação de PacC foram realizadas mediante a inserção de um "T" na posição ocupada pelo segundo "C" e pelo quarto "A" no motivo 5'-GCCARG-3' (Espeso et al., 1997). Por sua vez, como mutações nos sítios de ligação a CreA, um "A" foi escolhido para substituir o terceiro e quarto "Gs" no motivo 5'-SYGGRG-3' (Cubero & Scazzocchio, 1994). As setas indicam os complexos DNA-proteína formados. A especificidade da ligação foi observada pela capacidade dos competidores não marcados em impedir a formação dos complexos. (d) O ensaio de competição na sonda 1 foi realizado em gel de poliacrilamida não desnaturante 15%, com 0,5 µg de GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ e quantidades crescentes de GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ (0; 0,2; 0,4 e 0,6 µg). As intensidades relativas dos complexos formados foram estimados por análise densitométrica.

A utilização de GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ nos ensaios de EMSA demonstrou atividade de ligação desta proteína recombinante a três dos quatro sítios de ligação a CreA presentes na região 5' UP de PacC (**Figura 8b**). A formação de apenas um complexo DNA-proteína entre a sonda 1 e GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ inicialmente indicou a ligação em apenas um dos três sítios presentes nesta sonda. Entretanto, os ensaios de competição empregando sondas não marcadas e contendo mutações nos sítios de ligação a CreA revelaram que os três motivos em conjunto parecem contribuir para a formação do complexo. A utilização de um competidor contendo uma base A substituindo as bases G na terceira e quarta posições em todos os motivos 5'-SYGGRG-3' não impediram a formação do complexo DNA-proteína, o que indica a especificidade de ligação para um dos três sítios, mas não se pode saber qual. A participação dos três sítios na formação do complexo foi confirmada pela utilização de diferentes versões de competidores: com as substituições de G para A nos sítios 1, 3 e 4 individualmente; ou em combinação dos sítios 1 e 3, 3 e 4 ou 1 e 4, cobrindo assim, todas as possibilidades de configurações (dados não mostrados). GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ não foi capaz de se ligar ao único sítio de ligação a CreA presente na sonda 2 (**Figura 8b**), cuja sequência também está contida na região 5' UP de *pacC*.

Como pode ser observado para a sonda 1 (**Figura 8a**), a região localizada entre as posições -215 e -173 no promotor de *pacC* contém três motivos de ligação para CreA, sendo que um deles (sítio 3) está sobreposto a um motivo de ligação para PacC (sítio 2). Esta observação motivou a

realização de um teste de ligação utilizando a sonda 1 juntamente com as duas proteínas de fusão (**Figura 8d**). Neste ensaio, PacC foi capaz de impedir a formação do complexo da sonda com CreA, o que mostra claramente que ambas as proteínas competem entre si pela ligação aos sítios sobrepostos.

A presença de sítios de ligação para PacC em quase todas as regiões 5' UP analisadas sugere a participação de PacC na regulação dos genes de hidrolases de *H. grisea*. Contudo, a mera existência de possíveis sítios de ligação não garante regulação direta por PacC. Um exemplo é o gene *xlnD* de *A. nidulans*, cuja seqüência do promotor possui três possíveis sítios de ligação para PacC (Pérez-Ganzáles et al., 1998), embora a transcrição do gene não pareça ser influenciada pelo pH do meio de cultivo.

Arst e Peñalva (2003) propuseram uma série de critérios que devem ser obedecidos para confirmar a regulação mediada pelo pH. Os autores estipularam que a expressão do gene em estudo deve variar, em um organismo selvagem, na medida em que o pH ambiental seja progressivamente alterado. Adicionalmente, isso deve ser confirmado pela utilização de linhagens de fungo mutantes para *pacC* e para os demais genes cujos produtos estão envolvidos na via de sinalização. Embora ainda não existam tais mutantes para *H. grisea*, a existência de um homólogo a *pacC*, a notável influência do pH alcalino no acúmulo dos mensageiros dos genes em estudo e a ligação *in vitro* de GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ às regiões 5' UP dão suporte à hipótese da participação de PacC na regulação dos genes de hidrolases.

Vautard-Mey & Fèvre (2003) mostraram a influência do pH ácido na expressão de *creA* em *A. nidulans* de uma maneira independente de PacC. Nossos resultados indicam que, em *H. grisea*, o efeito do pH sobre a expressão de *creA* também é independente de PacC. Apesar de existir um sítio 5'-GCCARG-3' na região 5' UP de *creA*, GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ não interage com esse motivo de ligação (**Figuras 7a e 5c**). No entanto, a cinética do consumo de glicose (**Figura 4a**) fornece uma

explicação razoável para o acúmulo do transcrito de *creA* em pH 5,0 (**Tabela 2** e **Figura 4b**). Em ambiente alcalino, o consumo de glicose pelo fungo foi muito mais veloz. Assim, a redução nos níveis de glicose, que funciona como indutor para *creA* (Ruijter & Visser, 1997; Takashima et al., 1998), levou a diminuição de seu transcrito em pH 8,0 e o acúmulo em pH 5,0.

A influência do pH sobre o consumo de glicose pode estar relacionada aos valores ótimos de pH para a ação dos sistemas transporte de glicose. Assim, interferência do pH não estaria diretamente ligada a PacC (Peñalva & Arst, 2004). Por outro lado, homólogos de PacC já foram reportados como atuantes na expressão de genes codificadores de transportadores de glicose, como *mstA* em *Aspergillus niger* (vanKuik et al., 2004) e *gtt1* in *Trichoderma harzianum* (Moreno-Mateos et al. 2007). Desta forma, uma influência indireta de PacC na expressão de *creA* poderia ocorrer. Isso também pode explicar a maior expressão de *creA* durante a mudança de pH do meio, mesmo na presença de BCA (**Figura. 6b**). Em 2 h de cultivo em pH 5,0, a glicose é parcialmente consumida (**Figura 4a**). Assim, é possível que a glicose restante da pré-incubação anterior à mudança de pH do meio (2 h em pH 5,0) tenha sido transferida para as culturas subseqüentes.

Se, por um lado, a regulação direta de PacC sobre *creA* parece improvável, a repressão direta de CreA sobre *pacC* parece ocorrer. Nossos resultados sustentam essa hipótese, uma vez que os genes que codificam os dois fatores transcricionais apresentam padrões opostos de acúmulo de seus mRNAs (**Figura 6**) e que CreA foi capaz de se ligar à região regulatória de *pacC* (**Figuras 7 e 8b**). A repressão por glicose, mediada por CreA, da expressão de outros fatores transcricionais já foi reportada na literatura científica. Tamayo e colaboradores (2008) demonstraram que *xlnR*, que codifica um ativador transcricional de xilanases em *A. nidulans*, é reprimido por CreA. O mesmo ocorre com *xyr1*, homólogo de *xlnR* em *T.reesei* (Mach-Aigner et al., 2008).

5. Conclusão

Antes deste trabalho, pouco se sabia sobre a regulação da expressão de genes codificadores de hidrolases em *H. grisea* var. *thermoidea*. Trabalhos anteriores de nosso grupo já haviam demonstrado de forma pontual que *cbh1.1* e *cbh1.2* estão sujeitos a indução por fontes de carbono complexos, empregando abordagens de análise por *Northern blotting* e longos períodos de incubação. Este estudo representou um aprofundamento desse tipo de estudo, apresentando uma abordagem quantitativa mais refinada sobre a expressão precoce de tais genes.

Em conclusão, nossos dados mostram que os genes de celulasas e o gene de xilanase até então descritos em *H. grisea* têm sua expressão fortemente induzida por BCA e pelo pH alcalino. Os nossos resultados reforçam não só as propriedades indutoras do bagaço de cana-de-açúcar em pH alcalino, mas também dão pistas sobre o mecanismo subjacente da indução. O pico de acumulação de mRNA para a maioria dos genes que codificam hidrolases ocorreu em 2h, o que indica uma resposta de indução rápida e paralela para a maioria dos genes estudados. Além disso, PacC parece ser o mediador da regulação influenciada pelo pH e a repressão por glicose observada é possivelmente atribuída a CreA, que é capaz de sobrepujar a propriedade indutória do pH alcalino. Temos ainda evidências de que CreA também esteja envolvido na repressão de PacC, desta forma, estabelecendo uma interação entre os dois sistemas regulatórios.

6. Perspectivas

Como perspectivas futuras desse trabalho, podemos destacar:

- 1- Realização de futuras análises no modelo de *H. grisea*, empregando-se compostos repressores da transcrição e tradução, assim como a avaliação de tempos de cultivo mais longos para elucidar o papel da estabilidade dos mRNAs e a possibilidade da síntese *de novo* durante a produção das hidrolases;
- 2- Realização os ensaios enzimáticos com os sobrenadantes de cultivos de *H. grisea* no intuito de confirmar o efeito direto da regulação transcricional na produção das hidrolases;
- 3- Clonagem e análise funcional dos promotores dos genes em estudo, empregando o sistema de gene repórter *goxA* (glicose oxidase) de *A. niger*;
- 4- Análises por *footprint in vivo* de todos os promotores dos genes de hidrolases de *H. grisea*, além dos promotores dos genes *pacC* e *creA*, para confirmar a funcionalidade dos sítios de ligação ao DNA avaliados no trabalho.

7. Referências Bibliográficas

- Aréchiga-Carvajal, E. T., & Ruiz-Herrera, J. (2005). The RIM101/pacC homologue from the basidiomycete *Ustilago maydis* is functional in multiple pH-sensitive phenomena. *Eukaryot Cell* , 4 (6), 999-1008.
- Aro, N., Pakula, T., & Penttilä, M. (2005). Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* , 29 (4), 719-739.
- Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2003). Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genet Biol* , 40 (1), 1-3.
- Azevedo, M. O., & Poças-Fonseca, M. J. (2002). Recursos Genéticos e Melhoramento-Microrganismos. In: I. T. Melo, M. C. Valadares-Ingliš, L. L. Nass, & A. C. C (Eds.). Jaguariúna: Editora da EMBRAPA Meio Ambiente.
- Azevedo, M. 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* , 136 (12), 2569-2576.
- Benoliel, B., Poças-Fonseca, M. J., Gonçalves, F. A., & Pepe, L. M. (2010). Expression of a Glucose-tolerant beta-glucosidase from *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol* , 160, 2036-2044.
- Berg, J. M. (1988). Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 85 (1), 99-102.
- Blanchin-Roland, S., Costa, G. D., & Gaillardin, C. (2005). ESCRT-I components of the endocytic machinery are required for Rim101-dependent ambient pH regulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* , 151 (Pt 11), 3627-3637.

- Calcagno-Pizarelli, A. M., Negrete-Urtasun, S., Denison, S. H., Rudnicka, J. D., Bussink, H.-J., Múnera-Huertas, T., et al. (2007). Establishment of the ambient pH signaling complex in *Aspergillus nidulans*: PalH assists plasma membrane localization of PalH. *Eukaryot Cell* , 6 (12), 2365-2375.
- Campos, L., & Felix, C. R. (1995). Purification and Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. *Appl Environ Microbiol* , 61 (6), 2436-2438.
- Caracuel, Z., G, M. I., Espeso, E. A., González-Verdejo, C. I., García-Maceira, F. I., & Pietro, A. D. (2003). The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Mol Microbiol* , 48 (3), 765-779.
- Chávez, R., Schachter, K., Navarro, C., Peirano, A., Aguirre, C., Bull, P., et al. (2002). Differences in expression of two endoxylanase genes (*xynA* and *xynB*) from *Penicillium purpurogenum*. *Gene* , 293 (1-2), 161-168.
- 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* , 13 (2), 407-415.
- Cziferszky, A., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (2002). Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J Biol Chem* , 277 (17), 14688-14694.
- Dashtban, M., Schraft, H., & Qin, W. (2009). Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities & perspectives. *Int J Biol Sci* , 5 (6), 578-595.
- Da-Silva, R., Yin, D. K., & Park, Y. K. (1994). Application of thermostable xylanases from *Humicola sp.* for pulp improvement. *Journal of Fermentation and Bioengineering* , 77, 109-111.

- Davis, D. (2003). Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet* , 44 (1), 1-7.
- de Faria, F. P., Te'O, V. S. J., Bergquist, P. L., Azevedo, M. O. & Nevalainen, K. M. H (2002). Expression and processing of a major xylanase (XYN2) from the thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* in *Trichoderma reesei*. *Lett Appl Microbiol* , 34 (2), 119-123.
- Delgado-Jarana, J., Rincón, A. M., & Benítez, T. (2002). Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology* , 148 (Pt 5), 1305-1315.
- Denison, S. H., Orejas, M., & Arst, H. N. (1995). Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *J Biol Chem* , 270 (48), 28519-28522.
- De-Paula, E. H., Pocas-Fonseca, M. J., & Azevedo, M. O. (2003). The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2* gene is the major expressed protein under induction by lignocellulosic residues. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*1 , 19, 1-5.
- De-Paula, E. H., Ramos, L. P., & Azevedo, M. O. (1999). The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugar cane bagasse. *Bioresource Technology* , 68, 35-41.
- Díez, E., Alvaro, J., Espeso, E. A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., et al. (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* , 21 (6), 1350-1359.
- Dillon, A. J. P. (2004). Enzimas como agentes biotecnológicos. In: S. Said, & R. C. L (Eds.), *Enzimas como agentes biotecnológicos* (pp. 241-269). Ribeirao Preto: Legis Summa Ltda.
- Dowzer, C. E., & Kelly, J. M. (1989). Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr Genet* , 15 (6), 457-459.

- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D. E., & Dorry, H. e. (1989). Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. Proc Natl Acad Sci U S A , 86 (16), 6138-6141.
- Elkins, J. G., Raman, B., & Keller, M. (2010). Engineered microbial systems for enhanced conversion of lignocellulosic biomass. Curr Opin Biotechnol , 21 (5), 657-662.
- Ely Nahas, E., Terenzi, H. F., & Rossi, A. (1982). Effect of Carbon Source and pH on the Production and Secretion of Acid Phosphatase (EC 3.1.3.2) and Alkaline Phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. J Gen Microbiol, 128: 2017-2021.
- Espeso, E. A., Roncal, T., Díez, E., Rainbow, L., Bignell, E., Alvaro, J., et al. (2000). On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. EMBO J , 19 (4), 719-728.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. EMBO J , 12 (10), 3947-3956.
- Espeso, E. A., Tilburn, J., Sánchez-Pulido, L., Brown, C. V., Valencia, A., Arst, H. N., et al. (1997). Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. J Mol Biol , 274 (4), 466-480.
- Ferreira-Nozawa, M. S., S, H. C., Ono, C. J., Fachin, A. L., Rossi, A., & Martinez-Rossi, N. M. (2006). The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. Med Mycol , 44 (7), 641-645.
- Flaherty, J. E., Pirttilä, A. M., Bluhm, B. H., & Woloshuk, C. P. (2003). PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. Appl Environ Microbiol , 69 (9), 5222-5227.

- Fowler, T., & Brown, R. D. (1992). The *bgl1* gene encoding extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol Microbiol* , 6 (21), 3225-3235.
- Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Rodríguez-Galán, O., Vincent, O., Arst, H. N., Tilburn, J., et al. (2007). PalC, one of two Bro1 domain proteins in the fungal pH signalling pathway, localizes to cortical structures and binds Vps32. *Traffic* , 8 (10), 1346-1364.
- Galindo, A., Calcagno-Pizarelli, A. M., Arst, H. N. Jr & Peñalva, M. Á. (2012). An ordered pathway for the assembly of fungal ESCRT-containing ambient pH signalling complexes at the plasma membrane. *J Cell Sci* , 125(7), 1784-1795.
- García, I., Gonzalez, R., Gómez, D., & Scazzocchio, C. (2004). Chromatin rearrangements in the *prnD-prnB* bidirectional promoter: dependence on transcription factors. *Eukaryot Cell* , 3 (1), 144-156.
- Golveia, E. R., Nascimento, R. T., Souto-Maior, A. M., & M., G. J. (2009). Validação de Metodologia para a caracterização química do bagasso de cana-de-açúcar. *Química Nova* , 32(6), 1500-1503.
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M. F., Lidén, G., & Zacchi, G. (2006). Bio-ethanol--the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* , 24 (12), 549-556.
- Hayashi, M., Ohkuni, K., & Yamashita, I. (1998). Control of division arrest and entry into meiosis by extracellular alkalinisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* , 14 (10), 905-913.
- Hervás-Aguilar, A., Rodríguez, J. M., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2007). Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. *J Biol Chem* , 282 (48), 34735-34747.

- Hrmová, M., Petráková, E., & Biely, P. (1991). Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme systems in *Aspergillus terreus* by homo- and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. *J Gen Microbiol* , 137 (3), 541-547.
- 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* , 61 (9), 1593-1595.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M. L., & Penttilä, M. E. (1997). Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* , 63 (4), 1298-1306.
- Jeoh, T., Ishizawa, C. I., Davis, M. F., Himmel, M. E., Adney, W. S., & Johnson, D. K. (2007). Cellulase digestibility of pretreated biomass is limited by cellulose accessibility. *Biotechnol Bioeng* , 98 (1), 112-122.
- Kubicek, C. P., Mikus, M., Schuster, A., Schmoll, M., & Seiboth, B. (2009). Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels* , 2, 19.
- Levy, J. F. (1987). The natural history of degradation of wood. *Phil Trans R Soc Lond* , A, 1-11.
- Lin, Y., & Tanaka, S. (2006). Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol* , 69 (6), 627-642.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* , 25 (4), 402-408.

- MacCabe, A. P., Orejas, M., Pérez-González, J. A., & Ramón, D. (1998). Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J Bacteriol* , 180 (5), 1331-1333.
- MacCabe, A. P., Van, J. P., Tilburn, J., Arst, H. N., & Visser, J. (1996). Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol Gen Genet* , 250 (3), 367-374.
- Mach, R. L., Seiboth, B., Myasnikov, A., Gonzalez, R., Strauss, J., Harkki, A. M., et al. (1995). The *bgl1* gene of *Trichoderma reesei* QM 9414 encodes an extracellular, cellulose-inducible beta-glucosidase involved in cellulase induction by sophorose. *Mol Microbiol* , 16 (4), 687-697.
- 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*. *Mol Microbiol* , 21 (6), 1273-1281.
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., Steiger, M. G., Bauer, G. E., Preis, S. J., & Mach, R. L. (2008). Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol* , 74 (21), 6554-6562.
- Margolles-Clark, E., Ihnén, M., & Penttilä, M. (1997). Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Journal of Biotechnology* , 57, 169-179.
- Messner, R., & Kubicek, C. P. (1991). Carbon Source Control of Cellobiohydrolase I and II Formation by *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* , 57 (3), 630-635.
- Meyer, V., Spielvogel, A., Funk, L., Tilburn, J., Arst, H. N., & Stahl, U. (2005). Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is

not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. *Mol Genet Genomics* , 274 (3), 295-306.

Moreno-Mateos, M. A., Delgado-Jarana, J., Codón, A. C., & Benítez, T. (2007). pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol* , 44 (12), 1355-1367.

Nascimento, C. V., Moreira, F. H., Masui, D. C., Leone, F. A., Peralta, R. M., Jorge, J. A., et al. (2010). Purification and biochemical properties of a glucose-stimulated beta-D-glucosidase produced by *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse. *J Microbiol* , 48 (1), 53-62.

Negrete-Urtasun, S., Denison, S. H., & Arst, H. N. (1997). Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J Bacteriol* , 179 (5), 1832-1835.

Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Diez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. A., et al. (1999). Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol Microbiol* , 33 (5), 994-1003.

Ohnishi, Y., Nagase, M., Ichihyanagi, T., Kitamoto, Y., & Aimi, T. (2007). Transcriptional regulation of two cellobiohydrolase encoding genes (*cel1* and *cel2*) from the wood-degrading basidiomycete *Polyporus arcularius*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 76 (5), 1069-1078.

Orejas, M., MacCabe, A. P., Pérez, J. A., Kumar, S., & Ramón, D. (1999). Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. *Mol Microbiol* , 31 (1), 177-184.

Peñalva, M. A., & Arst, H. N. (2004). Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* , 58, 425-451.

- Peñas, M. M., Hervás-Aguilar, A., Múnera-Huertas, T., Reoyo, E., Peñalva, M. A., Arst, H. N., et al. (2007). Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryot Cell* , 6 (6), 960-970.
- Pérez-González, J. A., van Peij, N. N., Bezoen, A., MacCabe, A. P., Ramón, D. & de Graaff, L. H. (1998). Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans xlnD* gene encoding a beta-xylosidase. *Appl Environ Microbiol* , 64 (4), 1412-1419.
- 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. & M, O. A. (2000). Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Can J Microbiol* , 46 (8), 749-752.
- Pocas-Fonseca, M. J., Lima, B., Brigido, M., Silva-Pereira, I., Felipe, M. S., Radford, A., et al. (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* , 43 (2), 115-120.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A. & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* , 67 (5), 577-591.
- Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sándor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I. S., Seiboth, B., Crom, S. L., & Kubicek, C. P. (2011) The CRE1 carbon catabolite

repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics*, 12:269.

Ramos, L. P. (2003). The chemistry involved in the steam treatment of lignocellulosic materials.

Química Nova , 26(6), 863-871.

Rodríguez-Galán, O., Galindo, A., Hervás-Aguilar, A., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2009).

Physiological involvement in pH signaling of Vps24-mediated recruitment of *Aspergillus* PalB cysteine protease to ESCRT-III. *J Biol Chem* , 284 (7), 4404-4412.

Rollins, J. A., & Dickman, M. B. (2001). pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a

pacC/RIM1 homolog. *Appl Environ Microbiol* , 67 (1), 75-81.

Rossi, M. S., Poças-Fonseca, M. J., & Azevedo, M. O. (2007). Biotechnology: Future Prospects. In: C.

R. Kuhad, & A. Singh (Eds.). I. K. International, New Delhi, India.

Ruijter, G. J., & Visser, J. (1997). Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett* , 151 (2), 103-

114.

Sánchez, C. (2009). Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi.

Biotechnol Adv , 27 (2), 185-194.

Schmitt, E. K., Kempken, R., & Kück, U. (2001). Functional analysis of promoter sequences of

cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol Genet Genomics* , 265 (3), 508-518.

Scott, E., Peter, F., & Sanders, J. (2007). Biomass in the manufacture of industrial products--the use

of proteins and amino acids. *Appl Microbiol Biotechnol* , 75 (4), 751-762.

- 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* , 32 (1), 169-178.
- Suárez, T., & Peñalva, M. A. (1996). Characterization of a *Penicillium chrysogenum* gene encoding a PacC transcription factor and its binding sites in the divergent *pcbAB-pcbC* promoter of the penicillin biosynthetic cluster. *Mol Microbiol* , 20 (3), 529-540.
- Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1999a) Comparison of gene structures and enzymatic properties between two endoglucanases from *Humicola grisea*. *J Biotechnol*, 67, 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* , 50 (2-3), 137-147.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1999c). Isolation and characterization of the actin gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of transcription levels of actin and cellulase genes. *Biosci Biotechnol Biochem* , 63 (6), 1091-1095.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (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* , 62 (12), 2364-2370.
- Takashima, S., Nakamura, A., Hidaka, M., Masaki, H., & Uozumi, T. (1999b). Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochem* , 125 (4), 728-736.

- Takashima, S., Nakamura, A., Masaki, H., & Uozumi, T. (1997). Cloning, sequencing, and expression of a thermostable cellulase gene of *Humicola grisea*. *Biosci Biotechnol Biochem* , 61 (2), 245-250.
- Tamayo, E. N., Villanueva, A., Hasper, A. A., de, L. H., Ramón, 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* , 45 (6), 984-993.
- Tanaka, H., Muguruma, M., & Ohta, K. (2006). Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. *Appl Microbiol Biotechnol* , 70 (2), 202-211.
- Tilburn, J., Sánchez-Ferrero, J. C., Reoyo, E., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2005). Mutational analysis of the pH signal transduction component PalC of *Aspergillus nidulans* supports distant similarity to BRO1 domain family members. *Genetics* , 171 (1), 393-401.
- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., et al. (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* , 14 (4), 779-790.
- Trevisan, G. L., Oliveira, E. H. D., Peres, N. T. A, Cruz, A. H. S., Martinez-Rossi, N. M., & Rossi A. (2011) Transcription of *Aspergillus nidulans* *pacC* is modulated by alternative RNA splicing of *palB*. *FEBS Letters*, 585:3442–3445.
- van den Hombergh, J. P., MacCabe, A. P., van de Vondervoort, P. J., & Visser, J. (1996). Regulation of acid phosphatases in an *Aspergillus niger* *pacC* disruption strain. *Mol Gen Genet* , 251 (5), 542-550.

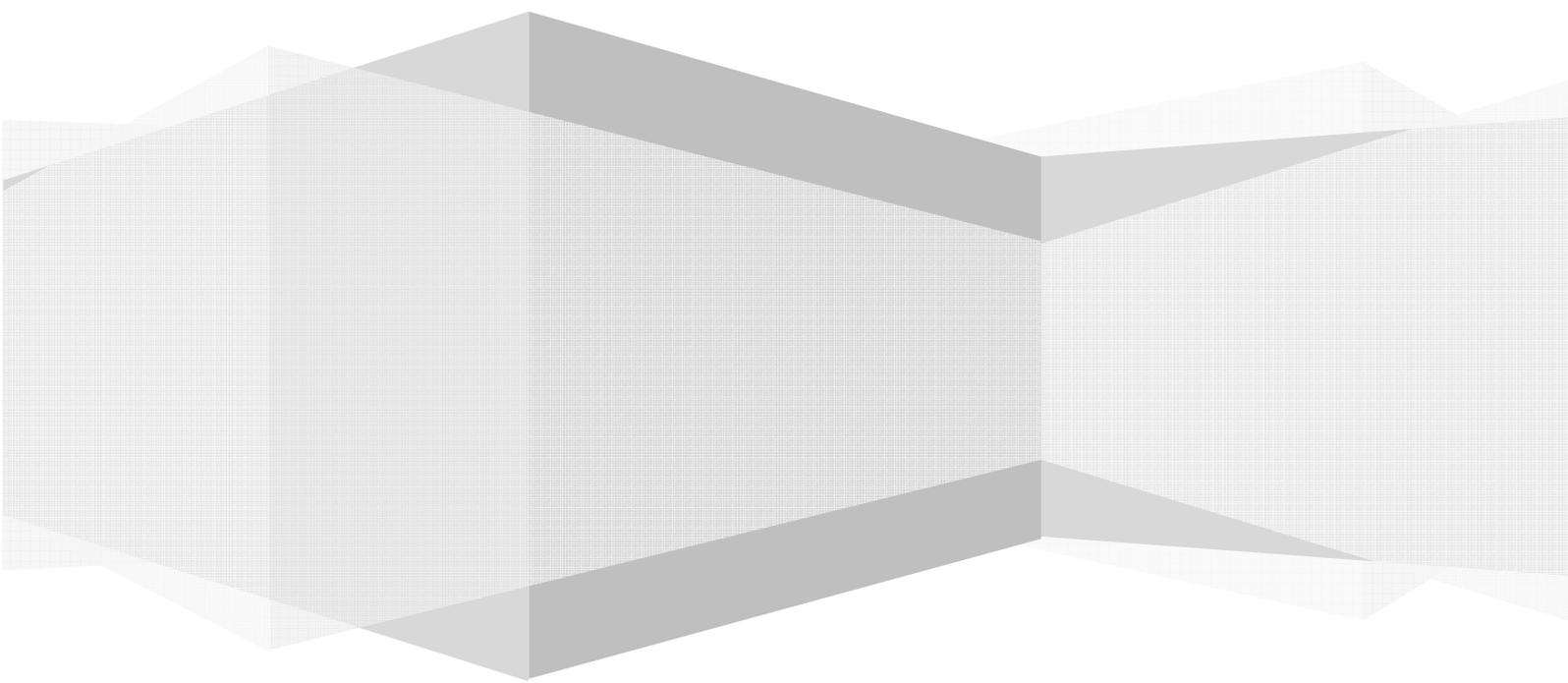
- Vankuyk, P. A., Diderich, J. A., MacCabe, A. P., Hererro, O., G, G. J., & Visser, J. (2004). *Aspergillus niger mstA* encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. *Biochem J* , 379 (Pt 2), 375-383.
- Vautard-Mey, G., & Fèvre, M. (2003). Carbon and pH modulate the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. *Curr Microbiol* , 46 (2), 146-150.
- Verbeke, J., Coutinho, P., Mathis, H., Quenot, A., Record, E., Asther, M., et al. (2009). Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Lett* , 31 (9), 1399-1405.
- Vincent, O., Rainbow, L., Tilburn, J., Arst, H. N., & Peñalva, M. A. (2003). YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Mol Cell Biol* , 23 (5), 1647-1655.
- Wang, Q., & Szanislo, P. J. (2009) Roles of the pH signaling transcription factor PacC in *Wangiella* (*Exophiala*) *dermatitidis*. *Fungal Genet Biol*, 46(9):657-666.
- Weber, C., Farwick, A., Benisch, F., Brat, D., Dietz, H., Subtil, T., et al. (2010). Trends and challenges in the microbial production of lignocellulosic bioalcohol fuels. *Appl Microbiol Biotechnol* , 87 (4), 1303-1315.
- Yagüe, E., Mehak-Zunic, M., Morgan, L., Wood, D. A., & Thurston, C. F. (1997). Expression of CEL2 and CEL4, two proteins from *Agaricus bisporus* with similarity to fungal cellobiohydrolase I and beta-mannanase, respectively, is regulated by the carbon source. *Microbiology* , 143 (Pt 1), 239-244.

You, B.-J., Choquer, M., & Chung, K.-R. (2007). The *Colletotrichum acutatum* gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is a key virulence determinant during fungal pathogenesis on citrus. *Mol Plant Microbe Interact* , 20 (9), 1149-1160.

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* , 1036 (1), 41-46.

Capítulo 2

*Caracterização molecular de Xyr1 – o ativador
global da expressão de hidrolases em
Trichoderma reesei*



1. Introdução

1.1 A degradação de xilana por *Trichoderma*: uma visão geral

Muitas espécies de *Trichoderma* são saprófitas. Estes fungos degradam uma grande variedade de substratos biopoliméricos como a celulose e a hemicelulose, os principais componentes da matéria vegetal. Conforme citado no **Capítulo 1**, hemicelulose é um termo geral que sumariza vários heteropolissacarídeos formados por um esqueleto de D-xilose (xilana) ou manose e D-glicose (mananas e glicanas), com cadeias laterais substituídas de arabinose, galactose, ácido acético ou glicorônico. As hemiceluloses são insolúveis em água, assim, sua hidrólise representa um desafio aos saprófitas. A degradação completa das hemiceluloses requer um grande número de enzimas extracelulares atuando em sinergismo para gerar pequenos oligossacarídeos e, finalmente, os respectivos monômeros (revisto por Polizeli et al., 2005).

Várias das enzimas secretadas por *Trichoderma* apresentam grande interesse industrial, levando a uma ampla gama de aplicações, por exemplo, na indústria de polpa e de papel (Buchert et al., 1998), na indústria têxtil (Galante et al., 1998a) e na produção de rações, alimentos e biocombustíveis (Galante et al., 1998b). Tal fato tem motivado estudos a respeito das propriedades bioquímicas (Zeilinger et al., 1993; Biely et al., 1994), da sua estrutura tri-dimensional, assim como o isolamento e caracterização dos seus respectivos genes (Margolles-Clark et al., 1996a, b, c, d). Nas últimas duas décadas, numerosos genes codificadores de hemicelulases foram clonados de *Trichoderma reesei* (teleomorfo: *Hypocrea jecorina*) e outras *Trichoderma spp.*, mas apenas poucos deles (*xyn1* e *xyn2*, codificando duas endoxilanases) foram estudados em detalhe quanto à regulação de sua expressão. Tais estudos foram realizados sobretudo pelo grupo do Dr. Robert L. Mach, da *Technische Universität Wien* (Mach et al., 1996; Zeilinger et al., 1996; Mach et al., 1998; Aro et al., 2001; Mach & Zeilinger 2003; Würleitner et al., 2003; Stricker et al., 2006; Stricker et al.,

2007; Stricker et al., 2008a; Mach-Aigner et al., 2008; Mach-Aigner et al., 2010).

A compreensão dos diferentes mecanismos regulatórios das glicosil hidrolases pode servir de base para o desenvolvimento de linhagens que expressem coquetéis enzimáticos desenhados para aplicações industriais específicas. Ainda, deve colaborar no desenho de promotores artificiais com mecanismos de ativação/desativação definidos, para serem utilizados na produção heteróloga de proteínas. Além disso, tal conhecimento permitirá uma melhor compreensão de como um microrganismo saprófita é capaz de perceber substratos insolúveis e, posteriormente, induzir a expressão de genes de enzimas hidrolíticas necessárias para a sua degradação.

Nos últimos anos, os principais elementos em *cis* e os fatores de transcrição relacionados com a expressão dos genes *xyn1* e *xyn2* foram identificados e sua caracterização funcional foi iniciada (Aro et al., 2002; Mach & Zeilinger 2002; Würleitner et al., 2003; Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2006). Curiosamente, Xyr1, um importante fator regulatório em *T. reesei*, é indispensável para a expressão de genes de celulasas e xilanases, mas não tem sua expressão afetada por moléculas indutoras (D-xilose, xilobiose ou sofrorse) ou pela fonte de carbono empregada (xilana, D-xilose, celulose ou lactose) (Stricker et al., 2006; Stricker et al., 2007). Embora outros estudos tenham apontado a participação acessória de outros fatores de transcrição (Ace1 e Ace2) na regulação da expressão de genes de xilanases em *T. reesei*, Xyr1 parece ser o receptor e o transmissor do sinal geral da indução (Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2007).

1.2 A regulação da expressão de xilanases: diferentes indutores ativam genes distintos

Os primeiros estudos que estabeleceram as condições de cultura de *T. reesei* capazes de induzir a produção de xilanases indicaram abundante produção quando o fungo era cultivado em meios contendo celulose, xilana ou misturas de polímeros vegetais (revisto por Bisaria & Mishra

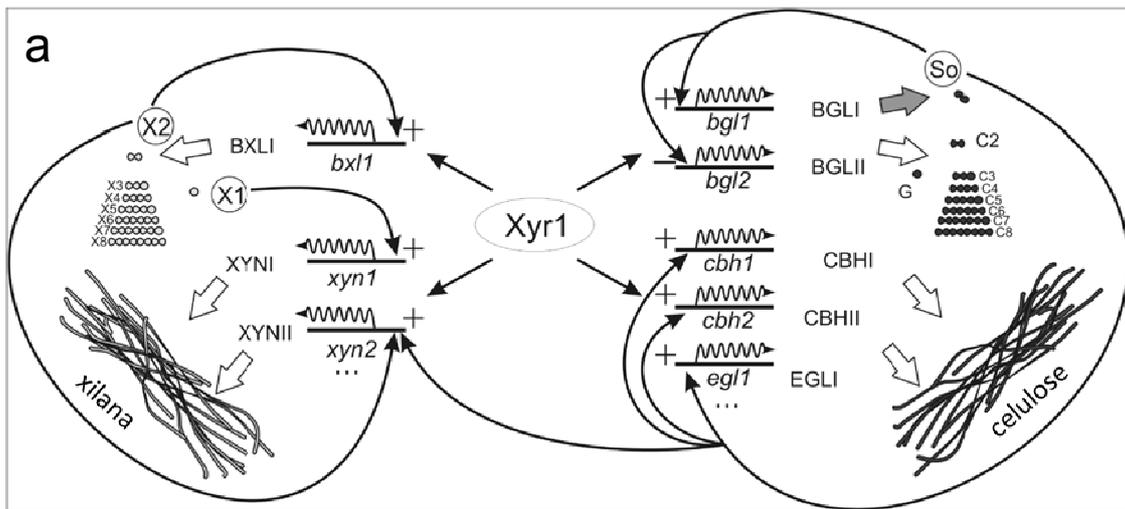
1989; Kubicek, 1993; Zeilinger & Mach, 1998). Uma vez que estes indutores são insolúveis e incapazes de entrar nas células fúngicas, é consensual que oligossacarídeos liberados a partir desses polímeros e/ou respectivos derivados funcionem como as reais substâncias que provocam a indução da expressão dos genes de xilanases.

Enquanto os sistemas xilanolítico e celulolítico de *Aspergillus niger* são estritamente co-regulados por meio da D-xilose como indutor (Hasper et al., 2000), as enzimas que participam nos respectivos complexos hidrolíticos de *T. reesei* não o são. O cultivo de *T. reesei* na presença de celulose ou xilana leva à síntese de duas xilanases específicas (XYNI e XYNII) e de uma endoglicanase específica (EG I) (Senior et al., 1989). O emprego de sofrorse, que é o mais potente composto indutor de celulases em *T. reesei* (Mandels & Reese 1960; Mandels et al., 1962; Sternberg & Mandels 1979), culmina na produção da xilanase XYNII e de EGI, enquanto a utilização de xilobiose resulta na produção de ambas as xilanases (XYNI e XYNII), de uma beta-xilosidase, mas não de EGI (Hrmová et al., 1986; Margolles-Clark et al., 1997). Ainda, ao contrário dos demais genes codificadores de xilanases e celulases de *T. reesei*, *xyn1* é induzido por D-xilose (Mach et al., 1996). Adicionalmente, há evidências de expressão diferencial para os dois genes de xilanases quando D-glicose é utilizada como única fonte de carbono (Mach et al., 1996; Zeilinger et al., 1996). Demonstrou-se que o mRNA de *xyn2* apresenta um nível basal quando o fungo é cultivado em D-glicose. Este nível basal é aumentado na presença de xilana, xilobiose ou sofrorse. A utilização simultânea de D-glicose e xilana levou a uma queda na transcrição de *xyn2* ao nível basal, enquanto sua indução por xilobiose não foi afetada por D-glicose (Würleitner et al., 2003). No entanto, a transcrição de *xyn1*, que é induzida por D-xilose, não é afetada pelo emprego simultâneo de D-glicose e D-xilose, enquanto o uso exclusivo de D-glicose leva à completa repressão de sua expressão (Mach et al., 1996; Rauscher et al., 2006). O modelo postulado para o mecanismo geral de reconhecimento do substrato e os mecanismos de indução dos principais

genes codificadores de xilanases e celulases de *T. reesei* (Stricker et al., 2006) são apresentados na

Figura 1. Esse modelo inclui Xyr1, o ativador global da transcrição.

O modelo engloba todos os genes de glicosil hidrolases que são passíveis de indução pelos produtos de degradação e/ou transglicosilação da xilana e/ou celulose: *xyn1* por D-xilose (Mach et al., 1996), *xyn2* por xilobiose e sofrorose (Zeilinger et al., 1996) e *bxl1* por xilobiose (Margolles-Clark et al., 1997). Os genes de celulases, como *cbh1*, *cbh2* e *egl1* (Ilmén et al., 1996), assim como *bgl1* (Fowler & Brown, 1992) e *bgl2* (Saloheimo et al., 2002), são induzidos por sofrorose. O modelo também indica que, para todos os casos (exceto para *bgl2*), Xyr1 é um fator indispensável (Stricker et al., 2008b).



b

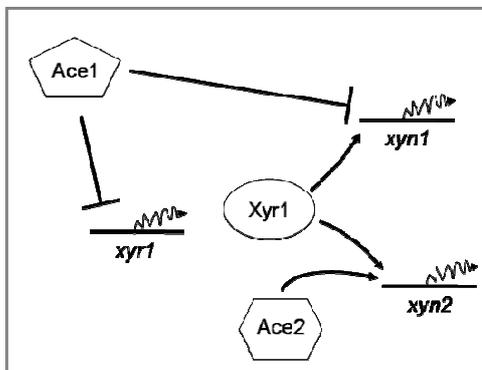


Figura 1. (a) Representação esquemática do papel central de Xyr1 na regulação de genes de enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação de xilana ou celulose. Xyr1 atua como: (i) um ativador transcricional (+), diretamente na expressão de xilanases (como XYNI e XYNII) e celulases (como CBHI, CBHII, EGLI), assim como (ii) na expressão de BXLI, que é responsável pela produção do indutor D-xilose (X1) e de BGLI, que produzirá o indutor sofrorose (SO). As setas brancas indicam a degradação enzimática do respectivo biopolímero até a formação de açúcares oligo ou monoméricos (X1 a X8, G e C2 a C8). A seta cinza indica a reação de transglicosilação catalizada por BGLI e BGLII. O símbolo (-) indica que a expressão de *bgl2* é independente de Xyr1 (adaptado de Stricker et al., 2008b). **(b)** Resumo da inter-relação entre Xyr1, Ace1 e Ace2. Ace1 é repressor de *xyr1* e *xyn1* e antagoniza com Xyr1 ao competir pelo sítio de ligação ao DNA. Ace2 interage com sítios de ligação de Xyr1 no promotor de *xyn2* e sendo necessário para sua expressão basal.

1.3 Fatores transcricionais envolvidos na regulação dos genes de xilanases

A regulação da transcrição dos genes codificadores de hidrolases *xyn1*, *xyn2* (endoxilanases 1 e 2), *cbh1*, *cbh2* (celobiohidrolases 1 e 2) e *egl1* (endoglicanase 1) é estritamente dependente de Xyr1. A regulação transcricional destes genes via Xyr1 não é afetada por substâncias indutoras (D-xilose, xilobiose ou soforose) e é indispensável para a expressão gênica (Stricker et al., 2006). Desse modo, na linhagem mutante de *T. reesei* na qual o gene *xyr1* foi deletado, não foi possível detectar a presença dos mRNAs de *xyn1* (Mach et al., 1996) ou *xyn2* (Zeilinger et al., 1996), mesmo em condições de indução ou de desrepressão. Furukawa et al. (2009) também mostram que a deleção de *xyr1* bloqueia de forma global a transcrição de genes codificadores de celulasas e xilanases, mesmo em condições de indução, como lactose e soforose.

Os promotores dos genes *xyn1* e *xyn2* possuem sítios de ligação a Xyr1. Tais sítios ocorrem com repetições invertidas com um espaçamento de 10 ou 12 bases. No caso da regulação de *xyn1*, acredita-se que a formação de complexos DNA-proteína entre o promotor do gene e o fator transcricional possa depender de um homodímero da proteína Xyr1, sendo que cada unidade faria o contato com uma das repetições invertidas (Rauscher et al., 2006). O mesmo acredita-se acontecer para os sítios de ligação a Xyr1 na região regulatória de *xyn2*. Entretanto, a adição de desoxicolato de sódio (que interfere na interação proteína-proteína, mas não na ligação DNA-proteína (Baeuerle & Baltimore 1988) levou à ligação de Xyr1 como um monômero (Stricker et al., 2006). Desta forma, Xyr1 tende a dimerizar antes de se ligar aos promotores, mas a dimerização não é fundamental para a interação com o DNA.

Tais hipóteses foram formuladas com base em experimentos empregando proteínas recombinantes que representam apenas uma região específica de Xyr1, no caso, o domínio de ligação ao DNA fusionado a um domínio GST (Glutathione S-transferase). A estratégia de purificação

de proteínas recombinantes na forma de proteínas de fusão a GST é amplamente difundida na pesquisa científica; no entanto, o tal domínio GST é capaz de induzir a formação artificial de dímeros e de interferir na habilidade de ligação da proteína recombinante ao DNA (Niedziela-Majka et al., 1998). Diante do exposto, são necessários estudos empregando a proteína Xyr1 completa, mesmo que em versão recombinante, para se investigar em detalhe a dinâmica de interação DNA-proteína e proteína-proteína.

Como mencionado anteriormente, Xyr1 é o ativador essencial para transcrição de *xyn1* e *xyn2* e, direta ou indiretamente, recebe e media todos os diferentes sinais de moléculas indutoras. Nos últimos anos, tem-se demonstrado que ocorre o envolvimento de outras proteínas na regulação da expressão das glicosil hidrolases de *T. reesei*, por exemplo, o complexo Hap2/3/5 e o repressor Cre1 (Mach et al., 1996; Zeilinger et al., 1996; Würleitner et al., 2003; Rauscher, et al., 2006). Os dados também apontam para a participação dos fatores de transcrição Ace1 e Ace2, que são direcionados para a regulação específica de determinados genes, como *xyn1* e *xyn2* (**Figura1b**). Ace1 (ativador de celulases 1) funciona como repressor a *xyn1* e antagoniza com Xyr1 ao competir por um sítio de ligação ao DNA (Rauscher et al., 2006); Ace2 (ativador de celulases 2) interage com sítios de ligação de Xyr1 no promotor de *xyn2* e é necessário para a expressão basal de *xyn2* (Würleitner et al 2003; Stricker et al., 2006). Significante progresso tem sido obtido nos últimos anos na identificação e caracterização de elementos que atuam em *cis* e em *trans* na regulação da expressão de xilanases. As primeiras investigações a respeito das interações entre Xyr1, Ace1 e Ace2 sugerem uma grande gama de mecanismos subjacentes à da regulação mediada por Xyr1: fosforilação, competição, homo e heterodimerização e o recrutamento de outras proteínas regulatórias (Würleitner et al., 2003; Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2006). No entanto, a confirmação dessas modificações e interações como necessárias ao mecanismo regulatório proposto para Xyr1 requer experimentos adicionais.

2. Objetivo e Metas

2.1 Objetivo

Produzir em *Escherichia coli* e caracterizar funcionalmente *in vitro* a versão recombinante de Xyr1, o principal fator transcricional que atua na regulação da expressão dos genes codificadores de xilanases em *T. reesei*.

2.2 Metas propostas

1. Produção heteróloga em *E. coli* da versão completa de Xyr1.
2. Estudar a dinâmica de ligação de Xyr1 recombinante (rXyr1) ao promotor de *xyn1*.
3. Investigar uma possível formação de homodímeros e como isso afetaria a ligação ao DNA.
4. Investigar o papel da fosforilação de rXyr1 na afinidade de ligação ao DNA *in vitro*, assim como nas interações proteína-proteína.
5. Investigar uma possível modulação alostérica em rXyr1.

3. Metodologia

3.1 Clonagem e produção de rXyr1 e rXyr1_{T577A}

Um fragmento de 2945 pares de bases compreendendo o promotor do bacteriófago T7, o operador lac, a região codante de *xyr1* e uma cauda C-terminal de seis histidinas foi quimicamente sintetizado (GeneArt, Invitrogen), com códon otimizado para *Escherichia coli*. Este fragmento foi clonado no vetor de expressão pET28a (Novagen) por meio dos sítios de restrição *Bgl* II e *Not* I. Da mesma forma, uma versão mutante de rXyr1, apresentando a substituição Thr-577-Ala, foi quimicamente sintetizada e clonada no mesmo vetor de expressão. Todas as construções foram checadas quanto ao perfil de restrição e as seqüências confirmadas por seqüenciamento automático (LGC Genomics). Os vetores para as duas versões de rXyr1 foram transformados por choque térmico (Sambrook & Russel, 2001) na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) (Novagen) e os clones positivos selecionados em placas de LB-ágar (peptona de caseína 1% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v), NaCl 1% (p/v), ágar bacteriológico 1,4% e pH 7,0) com 35 µg/mL de kanamicina e suplementado com D-glicose 1%. Os clones transformantes foram crescidos em 30 mL de meio LB com 35 µg/mL de kanamicina e D-glicose 1% até OD₆₀₀ = 0,5 (37°C, 200 RPM). As culturas foram então transferidas para 300 mL do mesmo meio LB, novamente crescidas até OD₆₀₀ = 0,5 (37°C, 200 RPM) e então induzidas com IPTG 0,5 mM por 24h, a 18°C, sob agitação constante (200 RPM).

A purificação das proteínas foi realizada por cromatografia de afinidade ao níquel utilizando-se o kit *His•Bind Resin* (Novagen) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de proteína foram então submetidas à cromatografia de gel filtração empregando-se colunas PD-10 (GE Healthcare) para dessalinização das amostras e troca de tampão para Tris 50 mM, NaCl 200 mM, NaH₂PO₄ 50 mM e glicerol 10% (v/v) (pH 7,5).

A concentração das proteínas foi estimada pelo método de Bradford (1976) e por

espectrofotometria na região do ultravioleta, após centrifugação (10000 x *g*, 10 min) e coleta dos sobrenadantes utilizando o coeficiente de extinção molar $E = 108595 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

3.2 Imunodeteção

Para o experimento de imunodeteção (*Western Blotting*), amostras de 100 ng de rXyr1 e rXyr1_{T577A} foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante 8% (SDS-PAGE). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF empregando-se transferência em tanque com tampão contendo Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v/v) (pH 8,3). A transferência foi realizada durante a noite a 35 mA e 95V. Em seguida, a membrana foi bloqueada por 1h sob agitação à temperatura ambiente em solução TBS (Tris 10 mM e NaCl 150 mM, pH 7,5) com BSA 3% (p/v). Após lavagem com TBS, a membrana foi incubada com soro policlonal de coelho específico contra Xyr1 (Santa Cruz Biotechnology) (1:5000 em TBS e BSA 0,3%) por 1h sob agitação à temperatura ambiente. Após lavagens com TBS e TBST (TBS e Tween 20 0,05%(v/v)), a membrana foi incubada por 1h com soro policlonal anti-IgG de coelho conjugado à HRP (Pierce) como anticorpo secundário (1:10000 em TBST). Os complexos formados foram revelados utilizando-se o *kit ECL Plus Western Blotting Substrate* (Pierce) segundo instruções do fabricante, sendo a membrana exposta a filme para raios-X.

3.3 Teste de solubilidade de rXyr1

Para o teste das soluções tampão empregadas para solubilização de rXyr1, amostras de 500 µL da proteína foram dializadas (MWCO 15000) por 6 horas (4°C) contra 250 mL do tampão

testado (**seção 4.2 em Resultados e Discussão**). Em seguida, as amostras de rXyr1 foram centrifugadas a 10000 x g, 10 min à temperatura ambiente para remoção dos agregados e foram submetidas a SDS-PAGE. Os géis foram documentados empregando-se o sistema de captação de imagens Gel Doc XR+ System (Biorad) e as frações solúveis foram quantificadas por densitometria em comparação a um padrão de albumina sérica bovina (BSA) (Fermentas).

3.4. Ensaio de retardo de mobilidade eletroforética (EMSA) – versão II

Sondas consistindo de fragmentos de DNA fita dupla foram obtidas pelo anelamento de oligonucleotídeos sintéticos marcados em sua extremidade 5' com fluoresceína (FAM) com suas seqüências complementares (**Tabela 1**). Quinhentos ng de cada oligonucleotídeo foram aquecidos a 95°C por 5 min em 30 µL do tampão de anelamento 1X (0,2 M Tris-HCL a 0,2 M, pH 7,7) e vagarosamente resfriadas até atingirem a temperatura ambiente. Posteriormente, tais sondas foram diluídas 10 vezes em Tris 50 mM, NaCl 200 mM, NaH₂PO₄ 50 mM e glicerol 10% (p/v), pH 7,5. A formação dos complexos DNA-proteína foi realizada pela incubação das proteínas de fusão com 1 µL da sonda diluída (10 min à temperatura ambiente) em uma mistura consistindo de Tris 50 mM, NaCl 200 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, glicerol 10% (p/v), pH 7,5 em um volume final de 20 µL. Para os ensaios de competição, sondas não-marcadas foram empregadas em excesso molar de 3, 6 e 9 vezes. A formação dos complexos foi analisada por eletroforese em TBE 0,25X (Tris-borato 22,5 mM e EDTA 0,5 mM) em géis de poliacrilamida não desnaturantes 8%. Os géis foram documentados e analisados no equipamento Typhoon 9410 (GE Healthcare).

Para desfosforilação de rXyr1, 100 ng da proteína foram incubadas durante 15 min a 30 °C com quantidades crescentes de fosfatase alcalina de mucosa intestinal bovina (BIAP, Sigma) em

uma mistura de reação de 15 µL contendo Tris-HCl 5 mM (pH 8,5), MgCl₂ 0,1 mM e ZnCl₂ 0,01 mM.

Para o controle com a fosfatase alcalina inativada, a enzima foi incubada a 65°C por 10 min.

Nos ensaios onde a cauda C-terminal de rXyr1 foi removida, 100 µg de proteína foram tratados com 10 unidades de trombina de plasma bovino (Sigma), por 2h, à temperatura ambiente, em uma mistura de reação de 100 µL contendo Tris 50 mM, NaCl 200 mM, NaH₂PO₄ 50 mM e glicerol 10% (p/v), pH 7,5.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Seqüência (5'-3')	Posição	Gene	Uso
pxyn1.1f ^a	TTGGCAGGCTAAATGCGACATCTTAGCCGGATGCA	-430 to -396	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1r	TGCATCCGGCTAAGATGTCGCATTTAGCCTGCCAA	-396 to -400	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1M1f ^a	TTGGCAGTCTAAATGCGACATCTTAGCCGGATGCA	-430 to -396	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1M1r	TGCATCCGGCTAAGATGTCGCATTTAGACTGCCAA	-396 to -400	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1M2f ^a	TTGGCAGGCTAAATGCGACATCTTAGACGGATGCA	-430 to -396	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1M2r	TGCATCCGICTAAGATGTCGCATTTAGCCTGCCAA	-396 to -400	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1M1M2f ^a	TTGGCAGTCTAAATGCGACATCTTAGACGGATGCA	-430 to -396	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b
pxyn1.1M1M2r	TGCATCCGICTAAGATGTCGCATTTAGACTGCCAA	-396 to -400	<i>xyn1</i>	EMSA, CD ^b

^a Os oligonucleotídeos f utilizados para EMSA foram sintetizados com e sem a marcação fluorescente 5'-FAM. ^b CD = *Circular Dichroism*. ^c As regiões em cinza indicam os putativos sítios de ligação a Xyr1 e sublinhadas, as bases mutadas. As posições dos oligonucleotídeos são relativas ao códon de iniciação da tradução (ATG).

3.5 Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida azul nativo (2D BN-PAGE)

A separação eletroforética de proteínas em gel de poliacrilamida não desnaturante foi realizada conforme os protocolos descritos por Cunha e colaboradores (2011) e Fiala e colaboradores (2011), com modificações. Para a primeira dimensão, em torno de 1 µg de proteína foi suspenso em tampão de amostra não desnaturante 1X (ácido aminocapróico 75 mM, Bis-Tris 50 mM e Azul de Coomassie Brilhante G-250 0,5% (p/v)) e submetido a eletroforese em gel de poliacrilamida (concentrador 5%, separador 8%, 180V, 4°C), omitindo o SDS na formulação do gel. Uma tira deste primeiro gel contendo a proteína de interesse foi incubada em tampão de amostra desnaturante 1X (Tris-HCl 100 mM, SDS 2% (p/v), β-mercaptoetanol 2% (v/v), glicerol 2% (v/v), pH 6,8) por 1h, sob agitação, e submetido a SDS-PAGE (segunda dimensão).

3.6 Caracterização estrutural

Os espectros de CD na região do UV distante (200 a 260 nm) de rXyr1 e rXyr1_{T577A} foram obtidos em um espectropolarímetro Jasco J-815, com controle de temperatura por sistema tipo Peltier PFD 425S. Os espectros foram coletados em intervalos de 1 nm a uma velocidade de 50 nm/min. Foram feitas cinco varreduras consecutivas e foi utilizada a média destes espectros. As condições de tampão foram Tris 50 mM, NaCl 200 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, glicerol 10%, pH 7,5 e as leituras feitas a 22 °C com 0,3 µM de proteína em cubeta de quartzo de 0,2 cm. O registro e tratamento dos dados foram feitos empregando-se o programa *Spectra Manager* (JASCO), com o auxílio do programa *GraphPad Prism* (GraphPad Software, Inc). Os espectros foram corrigidos subtraindo-se a contribuição do tampão na ausência de proteína. Os dados foram apresentados na

forma de elipticidade residual molar $[\theta]$, onde: $[\theta]$, em graus \cdot cm²/dmol = (miligráus \cdot MRW) / (percurso óptico em mm \cdot concentração em mg/mL) e MRW = 109,69. Para estimativa de estrutura secundária, foi utilizado o algoritmo K2D (Andrade et al., 1993).

Os ensaios de interação DNA-proteína foram realizados empregando-se as mesmas sondas de DNA dupla fita descritas no item **3.4**, mas sem a marcação fluorescente. As titulações foram realizadas com 0,3 μ M de proteína, adicionando-se 0 – 0,9 μ M de DNA, com um tempo de equilíbrio de 2 min entre cada varredura, a 22 °C. As aparentes constantes de dissociação (Kd) dos complexos DNA-Proteína foram estimadas seguindo as mudanças de elipticidade residual molar a 222 nm utilizando a equação $Y = (B_{\max}X)/(Kd+X)$, onde B_{\max} representa a fração de complexo formado no ponto de saturação, na mesma unidade que Y (fração ligante) e X representa a concentração de DNA a cada ponto da titulação. A fração ligante foi definida como sendo $Y = ([\theta]_{\text{inicial}} - [\theta]_{\text{observado}})/(\Delta[\theta]_{\text{max}})$. Onde, $[\theta]_{\text{inicial}}$ é a elipticidade residual molar proteina, $[\theta]$, em 222 nm, na ausência de DNA; $[\theta]_{\text{observada}}$ é $[\theta]$ observada a cada ponto da titulação e $\Delta[\theta]_{\text{max}} = [\theta]_{\text{inicial}} - [\theta]$, no ponto de saturação. Os valores de Kd foram obtidos por regressão não-linear empregando-se a equação acima descrita com auxílio do programa *SigmaPlot* (Systat Software Inc)(**Figura Suplementar S1, ver em Anexos**).

4. Resultados e Discussão

4.1 Produção e purificação de rXyr1 e rXyr1_{T577A}

A proteína rXyr1 e uma versão mutante da mesma foram produzidas por expressão heteróloga na linhagem de *E. coli* BL21(DE3) induzida por IPTG e purificadas por cromatografia de afinidade ao níquel. Uma alíquota de cada proteína foi analisada por SDS-PAGE (**Figura 2a**) e apresentaram grau de pureza >95%, estimado por densitometria. As identidades dos produtos recombinantes foram confirmadas por imunodeteção (**Figura 2b**). Em cooperação com a Dra. Martina Marchetti-Deschmann (Institut für Chemische Technologien und Analytik, Technische Universität Wien), a identidade de rXyr1 foi adicionalmente corroborada por espectrometria de massa (dados não mostrados). O intuito da produção e análise da versão mutante de rXyr1 é verificar o efeito de fosforilação na proteína (maior detalhamento no item 4.4.).

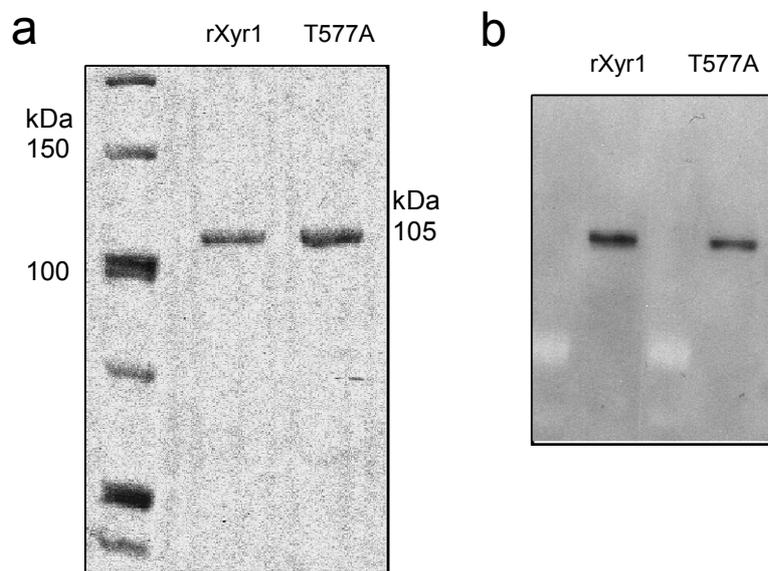


Figura 2. Purificação e identificação de Xyr1 e suas versões mutantes. **(a)** Análise eletroforética em gel de poliacrilamida desnaturante corado com azul de Coomassie de 100 ng de rXyr1 e rXyr1_{T577A}. **(b)** Imunodeteção de rXyr1 e rXyr1_{T577A}.

4.2 Instabilidade de rXyr1 em solução

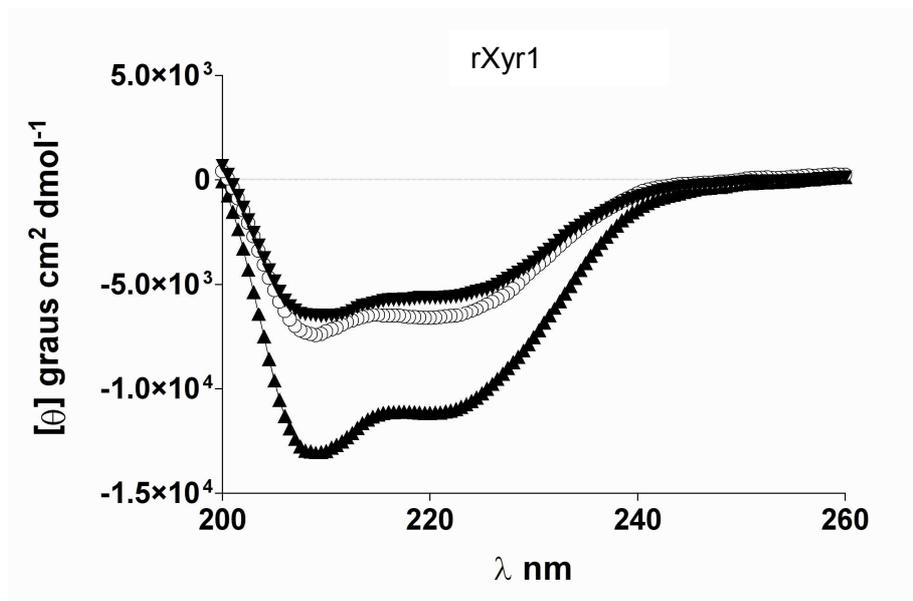
Os primeiros ensaios de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) com as amostras de rXyr1 e sua versão mutante (rXyr1_{T577A}) revelaram uma intrínseca instabilidade dos produtos protéicos. Ao longo de 72 h de armazenamento a 4°C, observou-se diminuição progressiva da elipticidade negativa das amostras em consequência da perda de estrutura secundária (**Figuras 3a e 3b**). Concomitante a essa da perda de estrutura secundária, foram também observadas a agregação e a precipitação irreversível das amostras, fato este confirmado pela inspeção visual de alíquotas de cada uma das proteínas e pela diminuição da concentração (dados não mostrados). Estes resultados foram obtidos em um primeiro momento pós-purificação, quando as proteínas foram dessalinizadas em Tris 10 mM (pH 7,5) para remoção do imidazol, utilizado para a purificação das mesmas.

A agregação e precipitação irreversível de proteínas têm sido reportadas como um problema corriqueiro no emprego de cromatografia de afinidade ao níquel e eluição em tampões contendo imidazol (revisito por Bondos & Bicknell, 2003).

Em um caso que muito se assemelha ao deste trabalho, Hamilton e colaboradores (2003) descreveram o insucesso na produção de fragmentos de anticorpos como proteínas recombinantes usando o mesmo sistema de purificação. Após testarem sem sucesso diversas formulações de tampões envolvendo a adição de detergente (Tween-20), carboidrato (sacarose), aminoácidos (glicina, alanina, ácido glutâmico e arginina), diferentes concentrações de NaCl e compostos como glicerol e polietilenoglicol, os autores só conseguiram manter suas proteínas solúveis conservando o imidazol a uma concentração mínima de 50 mM. Contudo, a remoção de imidazol, no caso deste trabalho, é absolutamente necessária. Tal composto é incompatível com a análise de proteínas por

CD, pois, mesmo em pequenas concentrações (1mM), impõe grande ruído de fundo às amostras por possuir alta absorbância na região do UV distante, especialmente em comprimentos de onda menores que 220 nm (Kelly et al., 2005).

a



b

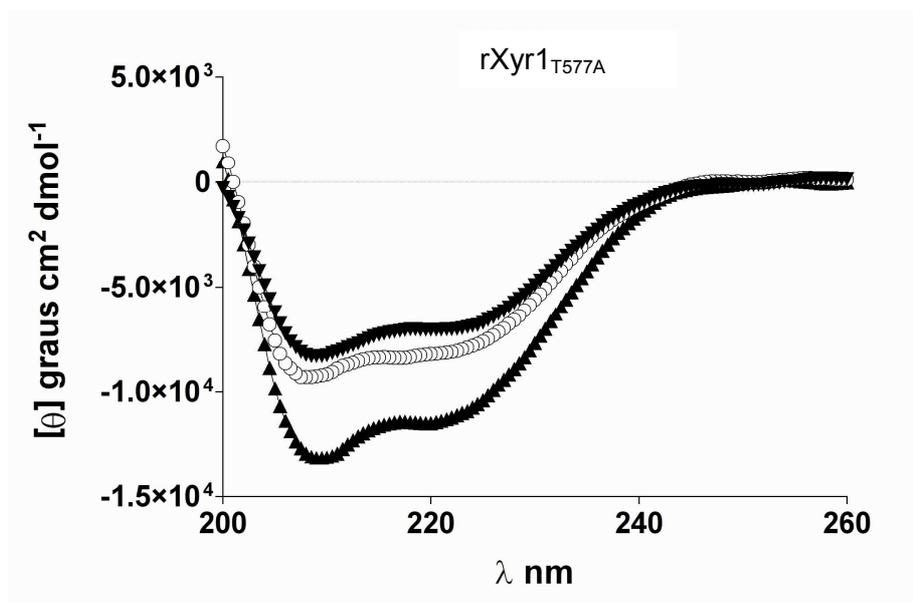


Figura 3. Espectros de CD na região do UV distante (200 – 260 nm) de 0,3 μM rXyr1 (a) e rXyr1_{T577A} (b) em Tris a 10 mM, pH 7.5. Varreduras realizadas em 2h (▲), 48h (○) e 72h (▼).

Outro fator importante é relativa inflexibilidade da formulação dos tampões utilizados em ensaios de CD, que, idealmente, devem evitar compostos com grande absorvância em pequenos comprimentos de onda e que limita uma gama de sais e detergentes (Kelly et al., 2005; Greenfield et al., 2006). Mantendo-se a formulação básica de Tris 50 mM e NaH₂PO₄ 50 mM (pH 7.5), foram testados os seguintes sais como agentes cosmotrópicos: KCl (50 e 100 mM), Na₂SO₄ (50 mM), (NH₄)₂SO₄ (50 e 100 mM) e NaCl (50, 100, 150 e 200 mM, combinados com glicerol 0% e 10%).

Essas formulações de tampões foram testadas em ensaios nos quais rXyr1 foi dializada por 6 horas (4°C). Após diálise, as amostras foram centrifugadas para remoção de agregados, submetidas a SDS-PAGE e as frações solúveis foram quantificadas (**Tabela 2**). A menor perda de proteína por precipitação ocorreu com a formulação Tris 50 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 200 mM e glicerol 10% (pH 7,5). No entanto, esta última formulação de tampão não evitou a precipitação quando a proteína foi estocada por mais de 72h a 4°C (perda em cerca de 80%). Em vista do exposto, a estratégia escolhida foi a utilização de alíquotas recém-preparadas de rXyr1 e sua versão mutante em todos os ensaios apresentados neste trabalho.

Tabela 2. Soluções tampão empregadas para solubilização de rXyr1.

Formulação	Concentração pré-diálise (µg/mL)	Concentração pós-diálise (µg/mL)	Redução
I- 20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 120 mM imidazol, pH 7.9	0,645 ± 0,09	0,578 ± 0,021	10,3%
II- 10 mM Tris pH 7,5	0,578 ± 0,011	0,048 ± 0,019	91,6%
III- 50 mM Tris, 50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,5	0,613 ± 0,012	0,118 ± 0,029	80,7%
IV- 50 mM NaCl	0,623 ± 0,022	0,133 ± 0,011	78,7%
V- 100 mM NaCl	0,623 ± 0,022	0,145 ± 0,010	76,7%
VI- 150 mM NaCl	0,623 ± 0,022	0,154 ± 0,021	75,2%
VII- 200 mM NaCl	0,623 ± 0,022	0,173 ± 0,017	72,2%
VIII- 200 mM NaCl, 10% glicerol	0,633 ± 0,022	0,351 ± 0,025	44,5%
IX- 50 mM KCl	0,553 ± 0,033	0,109 ± 0,022	80,2%
X- 100 mM KCl	0,553 ± 0,033	0,105 ± 0,008	81,0%
XI- 50 mM Na ₂ SO ₄	0,553 ± 0,033	0,128 ± 0,023	76,8%
XII- 50 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	0,553 ± 0,033	0,145 ± 0,010	73,8%
XIII- 100 mM (NH ₄) ₂ SO ₄	0,553 ± 0,033	0,128 ± 0,024	76,8%

Os dados foram representados como média ± desvio padrão (n = 3). A formulação I representa o tampão de eluição utilizado para purificação da proteína na cromatografia de afinidade. Os tampões IV a XIII possuem a formulação básica de 50 mM Tris, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,5.

4.3 Topologia de Xyr1: um paralelo com XlnR

A região codante de *xyr1* de *T. reesei* foi inicialmente clonada por Rauscher e colaboradores (2006) a partir de *screening* em biblioteca genômica da linhagem QM 9414 (ATCC 26921). O produto protéico predito de tal gene (GenBank AF479644) apresenta 934 resíduos de aminoácidos e massa molecular predita de 102 kDa. Uma correção da seqüência empregando-se a linhagem parental tipo selvagem QM 6a (ATCC 13631) revela um produto protéico deduzido de 940 resíduos de aminoácidos (103 kDa) (Robert L. Mach, comunicação pessoal, dados não publicados). Esta segunda seqüência foi escolhida como base para a clonagem em vetor de expressão e a caracterização do fator transcricional.

A análise da seqüência deduzida de resíduos de aminoácidos realizada nesse trabalho, revelou que a proteína predita de *T. reesei* apresentou considerável similaridade com os ativadores transcricionais NcXlnR de *Neurospora crassa* (72%) (Galagan et al., 2003), AoXlnR de *Aspergillus oryzae* (62%) (Marui et al., 2002a) e XlnR de *Aspergillus niger* (65%) (Pel et al., 2007). Esta similaridade foi ainda maior tomando como base a região N-terminal da proteína, o que colocaria Xyr1 como membro da família de fatores transcricionais do tipo Zn(II)₂Cys₆, até então somente encontrada em fungos (Todd & Andrianopoulos, 1997; McPherson et al., 2006).

Nos tópicos a seguir, será apresentada uma análise da topologia de Xyr1, traçando um paralelo com proteínas da família Zn(II)₂Cys₆, especialmente com XlnR de *A. niger*, até então o regulador de xilanases melhor caracterizado funcionalmente.

4.3.1 Domínio de ligação ao DNA

Conforme supracitado, a maior similaridade de Xyr1 com outros homólogos é encontrada na porção N-terminal da proteína, onde se pode observar a seqüência C-X₂-C-X₆-C-X₆-C-X₂-C-X₆-C (resíduos de 98 a 124, **Figuras 4 e 5a**) que formaria um domínio de ligação ao DNA (DLD) do tipo *cluster* binuclear de zinco, Zn(II)₂Cys₆, no qual dois íons de zinco estão coordenados por seis resíduos de cisteína, originando uma estrutura em forma de trevo (**Figura 5b**). Esse tipo de domínio pode ser visto como duas repetições do motivo C-X₂-C-X₆-C separados por seis resíduos de aminoácidos. Cada um destes motivos formaria uma pequena estrutura em α -hélice separados por uma alça, com uma volta associada a um resíduo de prolina (resíduo 113, **Figuras 4 e 5a**), em concordância com o que já é bem descrito para a proteína GAL4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Baleja et al., 1992; Kraulis et al., 1992; Marmorstein et al., 1992), típico representante dessa família de proteínas. Outras peculiaridades desse tipo de DLD incluem a predominância de resíduos básicos (Lys, Arg e His) localizados entre a segunda e terceira cisteínas. Estudos cristalográficos revelaram que são estes resíduos que fazem contato direto com o DNA no caso de GAL4 e PPR1 (Marmorstein et al., 1992; Marmorstein & Harrison, 1994).

a

	1	2	3	4	5	6
Xyr1 (T. ree)	-RIS	RACDQCNQLR	TKCDGLHP-	CAHCI--	EFGLGCEYVRER	
XlnR (A. nig)	RRIS	RACDQCNQLR	TKCDGQHP-	CAHCI--	EFGLTCEYARER	
XlnR (A. ory)	RRIS	RACDQCNQLR	TKCDGQNP-	CAHCIGSEFGLTCEYARER		
XlnR (N. cra)	RRIS	RACDQCNQLR	TKCDGQHP-	CAHCI--	EFGLGCEYIRER	
PUT3 (S. cer)	QRSS	VACLSCRKRHIKCPGGNP-	CQKCV--	TSNAICEYLEPS		
GAL4 (S. cer)	SSIEQ	ACDICRLKCLKSKEKPKCAKCL-	--KNNWECRYSPKT			
PPR1 (S. cer)	SKSRT	ACKRCRLKLIKCDQEFPSCKRCA--	KLEVPCVSLDPA			
	**	*	.	:	**	*
	*	*	.	:	**	*

b

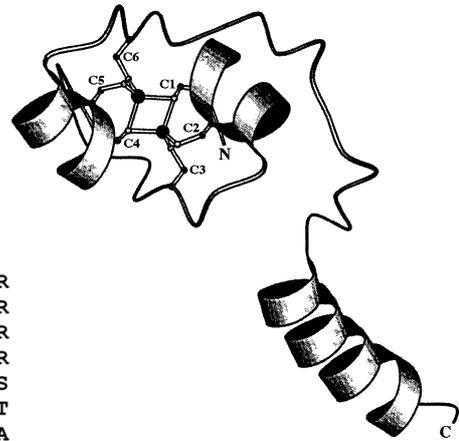


Figura 5. (a) Similaridade da região correspondente ao DLD de Xyr1 (resíduos 98 a 124) com outros membros da família $Zn(II)_2Cys_6$. A.nig, *Aspergillus niger*; A.ory, *Aspergillus oryzae*; N.cra, *Neurospora crassa*; S.cer, *Saccharomyces cerevisiae*; T.ree, *Trichoderma reesei*. Os resíduos de aminoácidos idênticos são representadas por "**", as substituições conservativas são representadas por ":" e as substituições semi-conservativas são representadas por ".". (b) Diagrama estrutural do motivo C-X₂-C-X₆-C-X₆-C-X₂-C-X₆-C, integrante do DLD de GAL4. Os resíduos de cisteína que coordenam os dois íons de zinco (esferas em preto) estão numerados de C1 a C6 (Adaptado de Todd & Andrianopoulos, 1997).

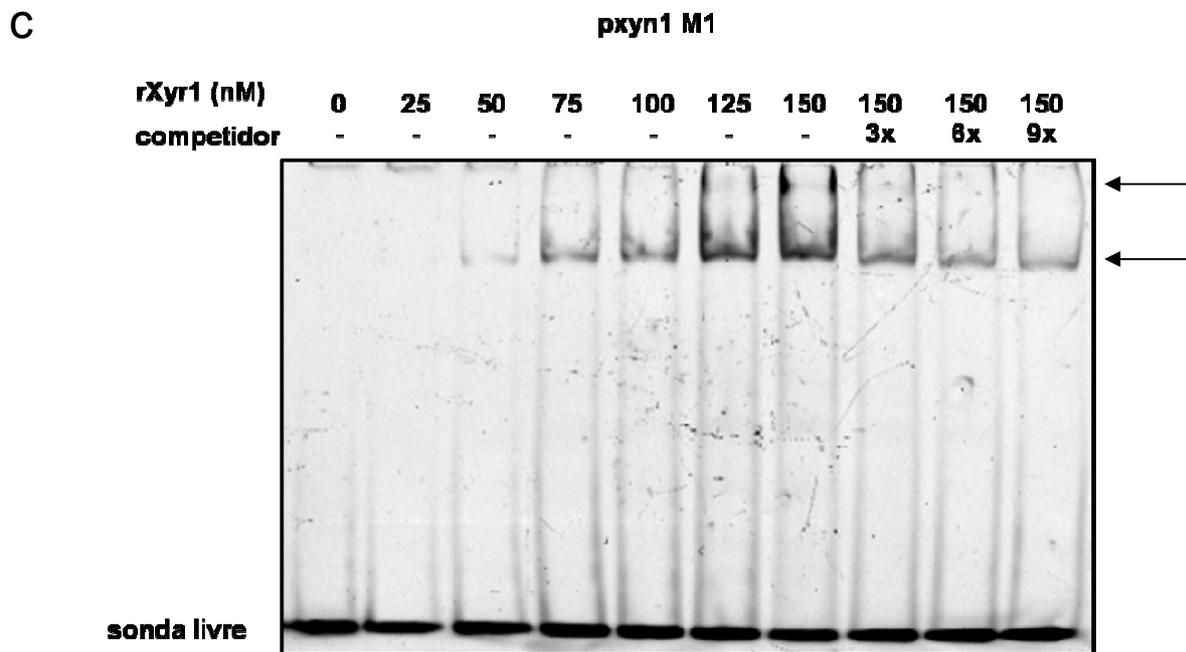
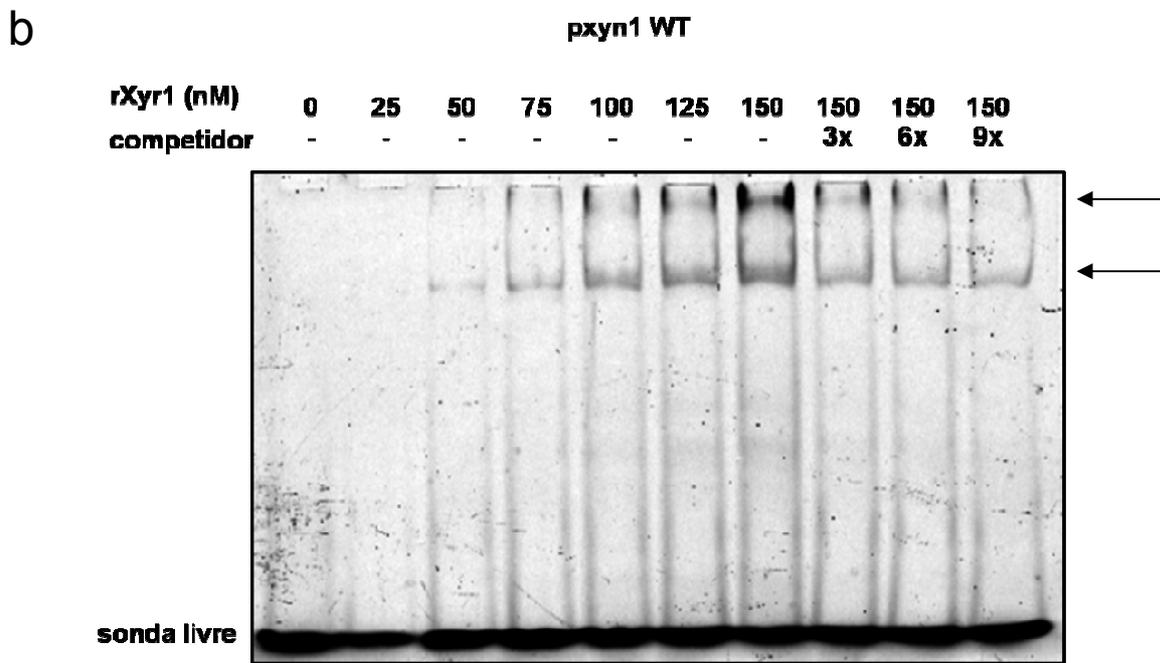
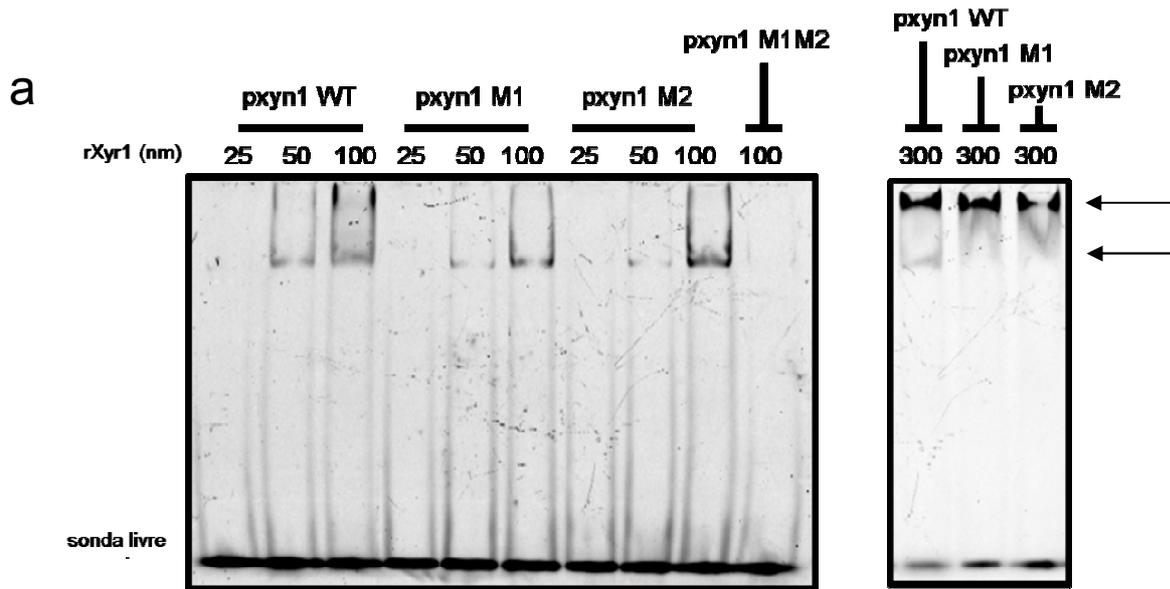
A funcionalidade do DLD de Xyr1 foi evidenciada anteriormente em estudos de interação DNA-Proteína empregando fragmentos das regiões promotoras de *xyn1* (Rauscher et al., 2006), *xyn3* (Furukawa et al., 2008) e de diversos outros promotores de genes codificadores de xilanases e celulasas (Furukawa et al., 2009). Tais estudos utilizaram apenas o DLD de Xyr1 fusionado a GST a fim de determinar o sítio mínimo de ligação ao DNA.

Rauscher e colaboradores (2006) mostram por meio de EMSA que o DLD de Xyr1 reconhece especificamente uma região do promotor do gene *xyn1* onde ocorre uma repetição invertida do motivo 5'-GGCTAA-3' com um espaçamento de 10 pares de bases, podendo se ligar separadamente a cada um dos motivos. Já Furukawa e colaboradores (2008 e 2009) propõem o consenso mínimo de reconhecimento como sendo 5'-GGC(A/T)₄-3', revelado pela análise de DNase I footprint de regiões do promotor de *xyn3* e diversas sondas para EMSA abrangendo pequenas seqüências de

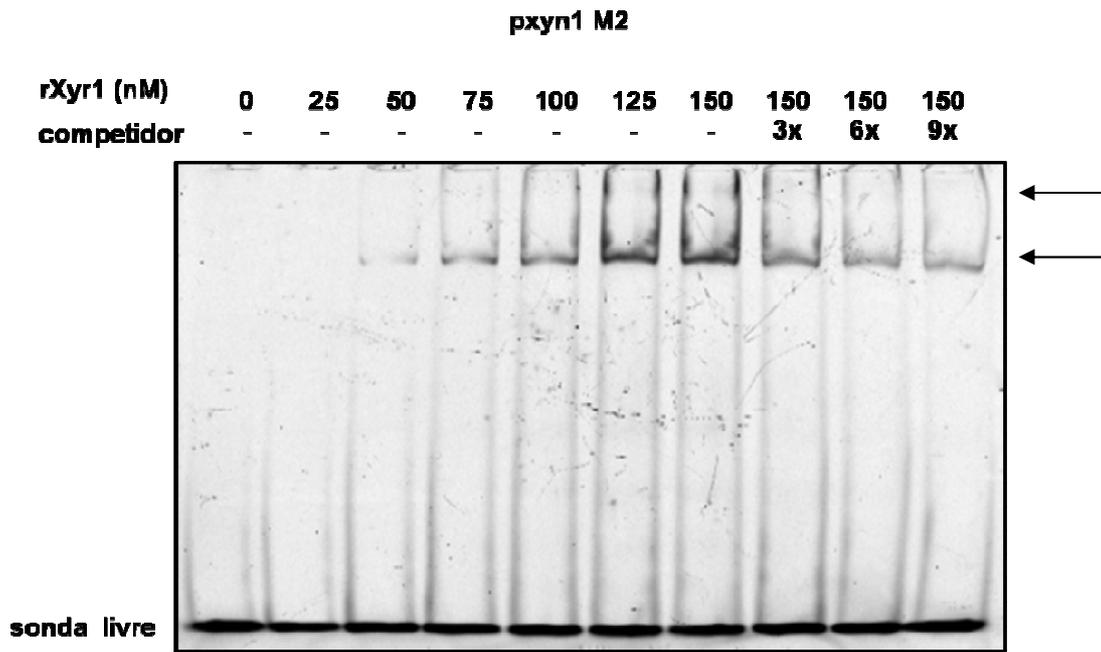
vários promotores (*cbh1-2*, *egl1-5* e *xyn1-3*). Pela simplicidade na produção das proteínas recombinantes, o emprego apenas de DLDs em estudos de interação DNA-proteína é muito útil para a caracterização inicial de elementos em *cis*. No entanto, a demonstração que DLDs e outros domínios regulatórios podem operar de forma independente quando desacopladas, como a clássica utilização de GAL4 no Sistema de Dois Híbridos (Fields & Song, 1989), não implica necessariamente que eles não terão uma interação funcional em seu contexto nativo.

Os ensaios de EMSA realizados com a proteína inteira (**Figura 6**) e empregando diferentes sondas para o promotor de *xyn1* (**Tabela 1**) confirmam a interação da proteína com os dois motivos do sítio de ligação palindrômico. Variando as quantidades de proteína entre 25 a 300 nM, foi possível observar a formação de dois complexos de interação DNA-Proteína quando se empregou a sonda “pxyn1 WT” (**Figura 6a**), na qual os dois motivos de ligação estão presentes, indicando a ocupação dos dois sítios ou possível formação de um dímero. A utilização de sondas nas quais foi introduzida uma mutação na posição G2 para T (5'-GGCTAA-3' para 5'-GTCTAA-3'), tanto no primeiro (pxyn1 M1) quanto no segundo motivo (pxyn1 M2), também revela formação de dois complexos, especialmente quando se empregando 300 nM de proteína (**Figura 6a**). Utilizando as mesmas sondas e o DLD de Xyr1, Rauscher e colaboradores (2006) também observaram a formação de dois complexos DNA-Proteína para a sonda “pxyn1 WT”. No entanto, ao se empregar as versões “M1”, “M2”, apenas um complexo pôde ser observado. Os resultados do presente trabalho, analisados em conjunto com esses dados fortalecem a hipótese de formação de dímero por rXyr1.

Como controle, o emprego da sonda duplo mutante “M1M2” aboliu a formação dos complexos (**Figura 6a**). A especificidade de ligação foi comprovada pelos ensaios de competição usando versões não marcadas com 6-carboxi-fluoresceína (FAM) em excesso molar de 3, 6 e 9 vezes (**Figura 6b; 6c e 6d**).



d



e

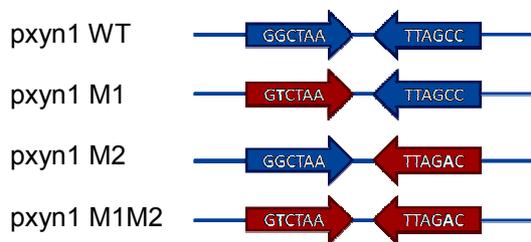


Figura 6. Ensaio de EMSA: ligação de rXyr1 na região promotora de *xyn1*. (a) Interação de quantidades crescentes de rXyr1 com 7,5 nM das sondas “pxyn1 WT”, “pxyn1 M1”, “pxyn1 M2” e “pxyn1 M1M2”. A confirmação da especificidade de ligação foi evidenciada empregando competidores não marcados em excesso molar de 3, 6 e 9 vezes para sonda “pxyn1 WT” (b), “pxyn1 M1” (c) e “pxyn1 M2” (d). (e) Representação esquemática das sondas empregadas. Todas as sondas foram preparadas como DNA dupla fita. As setas indicam os complexos DNA-proteína formados.

A hipótese da formação de dímeros de rXyr1 foi corroborada por ensaios de EMSA empregando-se desoxicolato de sódio (DOC) (**Figura 7a**). DOC é um detergente iônico que interfere na interação proteína-proteína, mas não na ligação DNA-proteína (Baeuerle & Baltimore 1988). O emprego de concentrações crescentes do detergente levou à ligação de rXyr1 como um monômero (**Figura 7a**). No intuito de confirmar que o evento de dimerização não ocorre em função da cauda de histidina C-terminal, utilizada para purificação da proteína recombinante, a remoção desta região foi realizada por clivagem proteolítica com trombina. Conforme mostrado na **Figura 7b**, a formação do dímero empregando-se as sondas “WT” e “M1” não é afetada pela excisão dessa região.

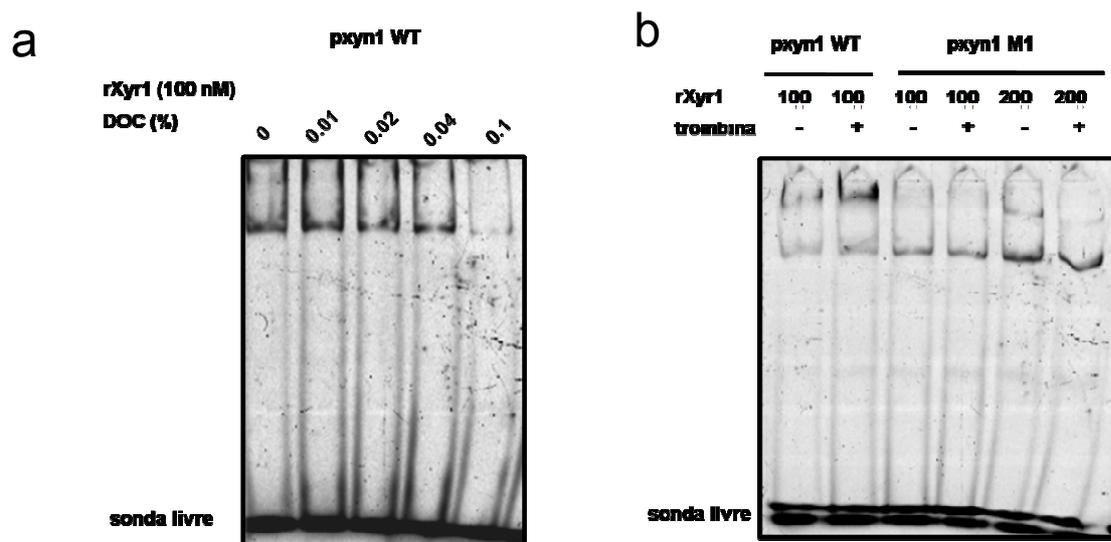


Figura 7. Ensaios de EMSA: ligação de rXyr1 na região promotora de *xyn1*: confirmação da dimerização de rXyr1. **(a)** Emprego de crescentes concentrações de desoxicolato de sódio (DOC) para interferir nas interações proteína-proteína levando rXyr1 a interagir com o DNA apenas como um monômero. **(b)** Efeito da remoção da cauda de histidina C-terminal sobre a dimerização de rXyr1.

A interação de rXyr1 com a região promotora de *xyn1* também foi avaliada por meio de espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD). A coleta dos espectros CD de rXyr1 foi realizada com a proteína sozinha e na presença das diferentes sondas do promotor de *xyn1* (**Tabela 1 e figura 6e**). A análise do espectro da proteína sozinha revelou sugestões a respeito de sua estrutura secundária

(Figura 8). A presença de distintos picos negativos em 208 e 222 nm é indicativa de considerável conteúdo de estruturas em α -hélice (Kelly et al., 2005). O emprego do algoritmo K2D (Andrade et al, 1993) estimou um conteúdo de α -hélice em 35%, de folha- β em 17% e de regiões desordenadas (*random coil*) em 48%, apresentando boa correlação com a predição *in silico* realizada pela ferramenta SOPMA (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html), (32,5 % de α -hélice) (Geourjon & Deléage, 1995).

Na presença dos oligonucleotídeos, é clara a interação DNA-proteína, pois ocorreram modificações no espectro de rXyr1 que puderam ser interpretadas como perda no conteúdo de estrutura secundária da proteína (Figura 8). Essa redução na elipticidade negativa resultou na diminuição de 21-23% no conteúdo de α -hélice com as sondas “WT”, “M1”, “M2” e de 35% com a sonda “M1M2” (Tabela 3).

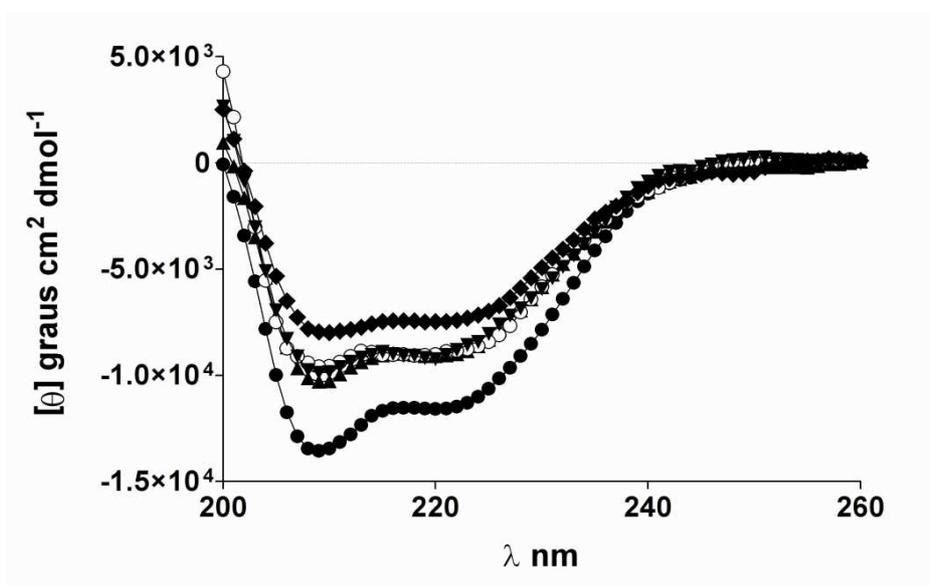


Figura 8. Espectros de CD de rXyr1 na região do UV distante (200 – 260 nm) na ausência e presença de DNA. 0.3 μ M de proteína e complexos DNA-proteína com fragmentos do promotor de *xyn1* (razão molar de 1:1). Proteína sozinha (\bullet), complexo com “pxyn1 WT” (\blacktriangle), “pxyn1 M1” (\circ), “pxyn1 M2” (\blacktriangledown) e “pxyn1 M1M2” (\blacklozenge). A contribuição dos espectros dos oligonucleotídeos foi subtraída.

Tabela 3. Compilação dos dados de CD da interação de rXyr1 com fragmentos do promotor de *xyn1*.

Sonda	Redução do conteúdo de α -hélice	Razão $[\theta_{222}]/[\theta_{208}]$ da proteína sozinha	Razão $[\theta_{222}]/[\theta_{208}]$ do complexo DNA-proteína	Kd (nM)
pxyn1 WT	21%	0,85	0,90	128 \pm 14 ^a
pxyn1 M1	23%	0,85	0,94	475 \pm 79 ^a
pxyn1 M2	23%	0,85	0,90	728 \pm 107 ^a
pxyn1 M1M2	35%	0,85	0,94	1427 \pm 369 ^a

^aos dados são apresentados como media \pm erro padrão (n=3).

Outros estudos empregando CD evidenciaram mudanças conformacionais induzidas pela interação com o DNA para diversas proteínas, tais como c-Jun/c-Fos, GCN4, Pax-6, NF- κ B, MASH-1, Ets-1 e FMBP-1 (Patel et al., 1990; Weiss et al., 1990; Epstein et al., 1994; Matthews et al., 1995; Meierhan et al., 1995; Petersen et al., 1995; Saito et al., 2008).

Por um lado, nos casos de c-Jun/c-Fos (Patel et al., 1990) e GCN4 (Weiss et al., 1990), em exemplos de fatores transcricionais cujo DLD é um domínio básico do tipo “zíper de leucina” (bZIP), a interação com DNA promove uma clara indução e estabilização de regiões em α -hélice. O mesmo ocorre para outros fatores cujo DLD é basicamente formado por regiões em α -hélice, como Pax-6 (Epstein et al., 1994), com DLD do tipo *paired box*, MASH-1 (hélice-alça-hélice, bHLH) (Meierhan et al., 1995) e FMBP-1 (*score and three amino acid peptide repeat domain*, STPR) (Saito et al., 2008).

Por outro lado, foi relatada perda de estrutura secundária para NF- κ B e Ets-1 (Matthews et al., 1995; Petersen et al., 1995). Os homodímeros de p50 e p65 do complexo NF- κ B, que

compartilham um complexo DLD do tipo domínio de homologia Rel (RHD) com predominância em folhas- β , apresentaram considerável desenovelamento da proteína como um todo quando interagem com o DNA (Matthews et al., 1995). O caso de Ets-1 (Petersen et al., 1995) é o que mais se assemelha ao observado para rXyr1 (Figura 8). Ets-1 é um fator transcricional que apresenta um DLD na forma de “hélice-volta-hélice alada” (wHTH): a interação com o DNA promove o desenovelamento de uma hélice que flanqueia um domínio auto-inibitório, que regula a afinidade do fator ao DNA, e possivelmente expõe uma segunda região de interação proteína-proteína. Um possível papel do DNA na regulação alostérica de Xyr1 soa plausível, mas ainda carece de maior corroboração experimental, como ensaios utilizando versões truncadas da proteína ou ainda a verificação da sensibilidade proteolítica de rXyr1 na ausência e na presença de DNA.

A aparente mudança estrutural induzida em rXyr1 durante a interação DNA-Proteína foi observada apenas quando foram utilizadas quantidades equimolares, tanto da sonda de DNA quanto da proteína recombinante. No entanto, diferenças ficaram claras quando 300 nM de rXyr1 foram titulados com quantidades crescentes de cada sonda, com os quais a proteína apresentou diferentes constantes de dissociação, Kd (**Tabela 3 e Figura Suplementar S1, ver em Anexos**). Estes dados de titulação apontaram para uma preferência de rXyr1 por se ligar ao segundo motivo 5'-GGCTAA-3' presente no sítio palindrômico do promotor de *xyn1*. Com uma afinidade de ligação quase 10 vezes maior quando utilizada a sonda “M1M2” em comparação com “WT”, a mudança conformacional observada em rXyr1, quando em contato com essa sonda, foi interpretada como ligação inespecífica, o que é corroborado pelo ensaio de EMSA realizado com a sonda “M1M2” (**Figura 6a**).

A utilização preferencial do segundo motivo 5'-GGCTAA-3' vai de encontro com os resultados relatados por Rauscher e colaboradores (2006), nos quais a mutação no segundo motivo abole a formação de complexos DNA-proteína utilizando extratos protéicos de *T. reesei* e

reduz a atividade promotora da região. Adicionalmente, isso reforça a hipótese de uma possível interação/competição de Xyr1 com o regulador Ace1, cuja especificidade de ligação ao promotor de *xyn1* ocorre justamente para este segundo motivo (Rauscher et al., 2006).

Analisados em conjunto com os dados de EMSA, as titulações por CD indicam um padrão complexo de interação DNA-proteína entre rXyr1 e as sondas utilizadas. A proteína pode interagir independentemente em cada um dos sítios de ligação da repetição invertida presente no promotor de *xyn1* e pode, ainda, se ligar como um homodímero ou monômero.

A maioria dos fatores de transcrição da família Zn(II)₂Cys₆ se ligam como homodímeros a sítios contendo repetições da trinca CGG orientados em uma configuração simétrica (diretos, invertidos ou evertidos) separados em uma seqüência interna (revisto por Todd & Andrianopoulos, 1997). No entanto, algumas proteínas da família, como AlcR de *Aspergillus nidulans*, se ligam como um monômero a uma seqüência alvo assimétrica (Nikolaev et al., 1999). No caso de XlnR, tanto em *A. niger* quanto em *A. oryzae*, a análise dos promotores de seus genes alvos revela uma seqüência consenso de ligação como sendo um sítio único (van Peij et al., 1998a, b; de Vries et al., 2002; Marui et al., 2002a, b). Dados de *footprint in vivo* para os promotores de *xyn1* e *xyn2* de *T. reesei* indicam a ocupação de sítios palindrômicos (Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2008a).

Por outro lado, Fukurawa e colaboradores (2009) também evidenciam a ligação do DLD de Xyr1 em motivos únicos, o que, junto aos dados deste trabalho, colocam Xyr1 em uma situação intermediária. Curiosamente, o complexo DNA-Proteína formado com a sonda "WT" possui Kd menor que em relação á sonda "M1", o que indica que, mesmo podendo interagir separadamente com cada um dos motivos 5'-GGCTAA-3', a presença dos dois motivos intactos parece estabilizar o complexo DNA-proteína formado, no qual ambas as unidades protéicas do dímero fazem contato com a sonda. Isso fica evidente ao se comparar os resultados de EMSA deste trabalho,

empregando a proteína inteira, e o mesmo ensaio realizado com a mesma sonda somente com o DLD de Xyr1 (Rauscher et al., 2006; Fukurawa et al., 2008). Nestes trabalhos, o uso de crescentes quantidades do DLD promoveu um incremento de ambos os complexos DNA-proteína formados, com maior intensidade para o complexo de maior mobilidade, indicativo de saturação seqüencial dos motivos 5'-GGCTAA-3'. Já o emprego da proteína inteira favorece a formação do segundo complexo, de menor mobilidade (**Figura 6a**).

O número de motivos de interação com fatores de transcrição pode estar diretamente relacionado à força de um promotor. Para GAL4, onde o número de motivos de ligação e a relativa afinidade variam entre os genes da família *GAL*, o que acarreta uma ativação diferencial (revisado por Lohr et al 1995). Assim, uma possível associação entre o número de motivos de ligação a Xyr1 e a força de certos promotores representaria um interessante campo de investigação. A análise dos genes *xyn1-3* torna plausível a afirmação inicial de que um maior número de motivos de ligação a Xyr1 é diretamente proporcional à força dos promotores de cada um desses genes. Fukurawa e colaboradores (2009) mostraram que, para linhagem de *T. reesei* PC-3-7 sob indução de sofrose, o acúmulo de mRNA de *xyn3* é, pelo menos, 6 vezes maior do que em relação a *xyn1* e *xyn2*. O promotor de *xyn3* possui 3 motivos de ligação a Xyr1 fisiologicamente ativos (uma repetição invertida de 5'-GGCTAT-3' e 5'-GGCTAT-3' separados por 16 pb e um motivo não-palindrômico 5'-GGCTAA-3') (Fukurawa et al 2008), enquanto *xyn1* e *xyn2* contam com 2 motivos, na forma de um sítio palindrômico, separados por 10 e 12 pb, respectivamente (Rauscher et al., 2006; Stricker et al., 2008a). No entanto, o número de motivos em *cis* é uma variável que, mesmo importante, não deve ser considerada isoladamente. Conforme abordado no tópico introdutório deste capítulo, diferentes moléculas indutoras induzem diferencialmente *xyn1* e *xyn2*. Há ainda a participação de fatores transcricionais acessórios, como Ace1 e Ace2 estabelecendo, portanto, uma rede regulatória.

4.3.2 Sinal de localização nuclear e região em *coiled-coil*

À montante do putativo DLD são observados dois pequenos grupamentos de resíduos básicos de lisina e arginina, RK-X₉-RRR (resíduos 80 a 93, **Figura 4**), os quais se assemelham com o consenso descrito para um sinal de localização nuclear (SLN) bipartido: (K/R)₂-X₁₀₋₁₂-(K/R)₃ (Christophe et al., 2000). Por outro lado, imediatamente à jusante ao DLD, é observado outro grupamento de resíduos básicos de lisina e arginina (RKKR, resíduos 130 a 133, **Figura 4**). Esta seqüência, embora se encaixando no consenso (K/R)₄₋₆, descrito como SLN de sítio único (Christophe et al., 2000), e comumente reportada como SLN de diversas proteínas (Kirito et al., 2004; Mikami et al., 2005; Lopes et al., 2006; Song et al., 2006), mostra-se não funcional para o homólogo XlnR em *A. niger*. Hasper e colaboradores (2004) demonstraram que a deleção parcial e a mutagênese sítio-dirigida de RKKR não afetam a localização nuclear de XlnR. Ainda segundo Hasper e colaboradores (2004), o endereçamento ao núcleo de XlnR fica a cargo de uma região presente na porção C-terminal com possível estrutura na forma de hélices enroladas (*coiled-coil*). A análise da seqüência de Xyr1 pelo programa COILS (Lupas et al., 1991) aponta uma possível região em *coiled-coil* equivalente ao que é reportada para XlnR (resíduos 702 – 729, **Figura 4**). Regiões em *coiled-coil* comumente mediam a homodimerização de diversas proteínas da família Zn(II)₂Cys₆, incluindo GAL4, LEU3 e PPR1 (Carey et al., 1989; Marmostein et al., 1992; Marmostein & Harrison, 1994; Remboutsika & Kohlhaw, 1994), embora nem todos representantes da família de proteínas necessariamente funcionem como homodímeros.

Os resultados dos EMSAs (**Figuras 6 e 7**) indicaram a formação de um padrão complexo de interação de rXyr1 com o fragmento da região promotora de *xyn1*, podendo se ligar como dímero

ou monômero. No intuito de investigar se a formação do dímero é um evento dependente da interação com o DNA, o estado de dimerização da proteína foi verificado por BN-PAGE bidimensional (**Figura 9**). A primeira dimensão de separação eletroforética (gel nativo não-desnaturante) evidenciou a separação de duas bandas que, segundo a segunda dimensão de separação (gel desnaturante), possuem a mesma massa molecular e, portanto, representam a mesma proteína (**Figura 9a**). A presença de duas bandas indica que rXyr1 ocorre como uma mistura de monômeros e homodímeros em solução, com a prevalência da forma monomérica observada pela aparente abundância da banda de maior mobilidade.

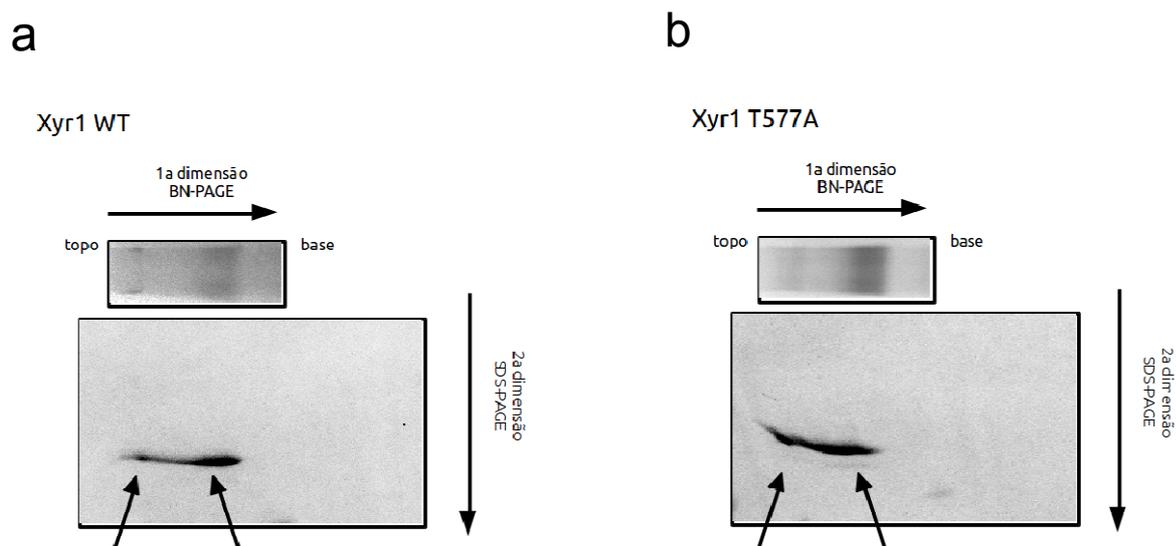


Figura 9. Eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida azul nativo (2D BN-PAGE) para rXyr1 (a) e rXyr1_{T577A} (b). 900 ng de cada proteína recombinante foram inicialmente submetidos ao BN-PAGE (5/8%) para separar dímeros de monômeros. Em seguida, as amostras foram submetidas à segunda dimensão (SDS-PAGE, 8%) para fracionar as proteínas por tamanho.

Na espectroscopia de Dicroísmo Circular, a razão dos valores de elipticidade molar $[\theta_{222}]/[\theta_{208}]$ tem sido utilizada para avaliar o estado de conformação em *coiled-coil* de proteínas (Lau et al., 1984), o que evidencia a interação inter-hélices, algo comum em eventos de homo e heterodimerização de proteínas. Em particular, a elipticidade em 222 nm é responsiva ao conteúdo α -helicoidal, enquanto que a variação em 208 nm é sensível ao eixo da hélice e, portanto, se o eixo α -hélice está interagindo com outra hélice. Desta maneira, a elipticidade molar em 222 nm permanece inalterada durante a interação inter-hélices, enquanto é observada uma redução para 208 nm (Lau et al., 1984; Zhou et al., 1992; Mehboob et al., 2001; Paulucci et al., 2002; Choy et al., 2003). A razão $[\theta_{222}]/[\theta_{208}] \sim 1$ é indicativa de α -hélices em conformação em *coiled-coil*, enquanto hélices simples que não interagem apresentam razão $\sim 0,8$.

As razões $[\theta_{222}]/[\theta_{208}]$ para rXyr1 permanecem em torno de 0,8 na ausência das sondas de DNA (**Tabela 3**). Isso sugere que, nas condições empregadas no ensaio de CD, as regiões de α -hélice permaneceram simples, o que foi interpretado como rXyr1 em uma forma prevalentemente monomérica. Por outro lado, na presença de DNA, foi observado um aumento na razão $\theta_{222}/\theta_{208}$, indicando aumento das interações inter-hélice, possivelmente, por formação do homodímero. Estes resultados, tomados em conjunto com os dados de EMSA e BN-PAGE, fortalecem a hipótese de que Xyr1 pode até dimerizar antes de se ligar aos promotores, mas a formação do homodímero é induzida pela interação com DNA. Contudo, a dimerização não é fundamental para a interação com o DNA, pelo menos *in vitro*. Em adição a isto, a possibilidade de rXyr1 de formar dímeros vai de encontro com uma possível interação direta com Ace1 e Ace2, em um modelo de regulação que iria além da simples competição por sítios de ligação ao DNA.

4.3.3 Domínio de ativação transcricional

Vários fatores transcricionais da família $Zn(II)_2Cys_6$ apresentam domínios regulatórios C-terminais. Em GAL4, o domínio de ativação transcricional é observado entre os resíduos 768 e 881, os 113 últimos resíduos de aminoácidos da proteína (Keegan et al., 1986; Ma & Ptashne, 1987). Em LEU3 (886 resíduos de aminoácidos), o domínio de ativação transcricional encontra-se nos 30 últimos resíduos (Wang et al., 1997) e em PUT3 (979 resíduos de aminoácidos) a região compreendida entre os resíduos C-terminais de 890 a 979 inclui domínios de ativação e regulação (Etages et al., 2001). Dois resíduos de aminoácidos que são imprescindíveis para ativação transcricional por XlnR (Leu-823 e Tyr-864) (van Peij et al., 1998a; Hasper et al., 2004) também são conservados em Xyr1 (Leu-823 e Tyr-923, **Figura 4**). Eles estão localizados entre os 60 últimos resíduos de XlnR, região considerada como o domínio de ativação transcricional (van Peij et al., 1998a; Hasper et al., 2004), que apresenta alta identidade de seqüência com a extrema porção C-terminal de Xyr1.

4.3.4 Fosforilação em rXyr1

Comum mecanismo de modulação de atividade transcricional, a fosforilação também tem papel fundamental na regulação da atividade de proteínas da família $Zn(II)_2Cys_6$. Proteínas como CAT8 e SIP4, ativadores de genes envolvidos com a gliconeogênese em *S. cerevisiae*, se tornam fosforiladas durante a desrepressão de seus genes alvo (Randez-Gil et al., 1997; Vicent & Carlson, 1998). GAL4 sofre múltiplas fosforilações que influenciam sua atividade e que estão relacionadas com a estabilização de uma conformação do complexo GAL4-GAL80 permissivo à ativação transcricional (Sadowski et al., 1996). Tais fosforilações que possivelmente funcionam como

marcação para degradação proteolítica das unidades de GAL4 já engajadas no recrutamento do complexo de pré-iniciação da transcrição em seus genes alvo (Muratani et al., 2005). Dentre os reguladores de xilanases, Noguchi e colaboradores (2011) mostraram que AoXlnR de *A. oryzae* é uma fosfoproteína que assume um estado hiperfosforilado e reversível quando o fungo é crescido em D-xilose como única fonte de carbono.

No intuito de avaliar o papel da fosforilação em rXyr1, inicialmente foi realizado um EMSA com alíquotas de rXyr1 tratadas com fosfatase alcalina. Nesse experimento ficou evidente a diminuição da formação de complexos DNA-proteína na medida em que se aumentou a quantidade de fosfatase alcalina empregada, com reversão do quadro quando a enzima foi inativada por calor antes do tratamento de rXyr1 (**Figura 10**).

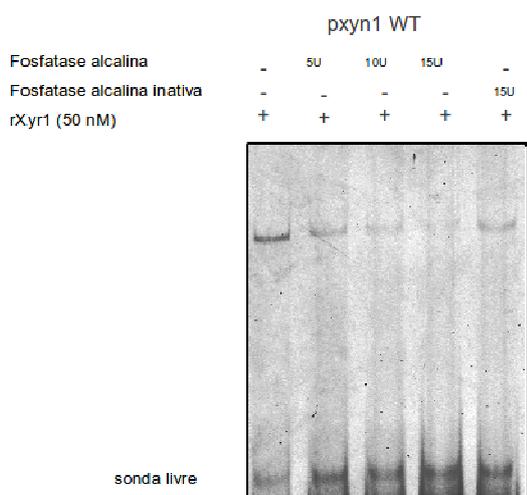


Figura 10. Ensaio de EMSA para a região promotora de *xyn1*: desfosforilação de rXyr1. A proteína rXyr1 foi defosforilada por 30 min, 30°C na presença de fosfatase alcalina antes da incubação com a sonda pxyn1 WT.

Segundo análise *in silico* por meio da plataforma *NetPhos 2.0* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>, Bloom et al., 1999), Xyr1 possuiria diversos sítios passíveis de fosforilação, o que incluiria pelo menos 43 resíduos de serina, 7 de treonina e 6 de tirosina. Em especial, a região compreendida entre os resíduos 577 e 586 (TEEEREERRR, **Figura 4**) é

idêntica entre Xyr1 e os homólogos XlnR em *A. niger*, *A. oryzae* e *N. crassa* e é consistente com o consenso utilizado pela caseína quinase II ((S/T)X2(D/E), Pinna, 1990). Uma região equivalente no fator Cre1 em *T. reesei* é também bastante conservada entre os homólogos em ascomicetos e é fundamental para a atividade do fator. Mutações nessa região reduzem a formação de complexos DNA-proteína e colocam o fungo em um estado desreprimido, considerando-se o sistema de repressão por carbono (Cziferszky et al., 2002).

Com base no exposto, além da versão selvagem de Xyr1, uma versão variante foi produzida (**Figura 2**) e caracterizada. A versão rXyr1_{T577A} foi produzida no intuito de avaliar a mutação pontual em um possível sítio de fosforilação, com a substituição Thr-577-Ala (**Figura 4**).

A avaliação do mutante por CD não apontou diferenças em termos de conteúdo de estrutura secundária entre rXyr1_{T577A} e o tipo selvagem (**Figura 11**).

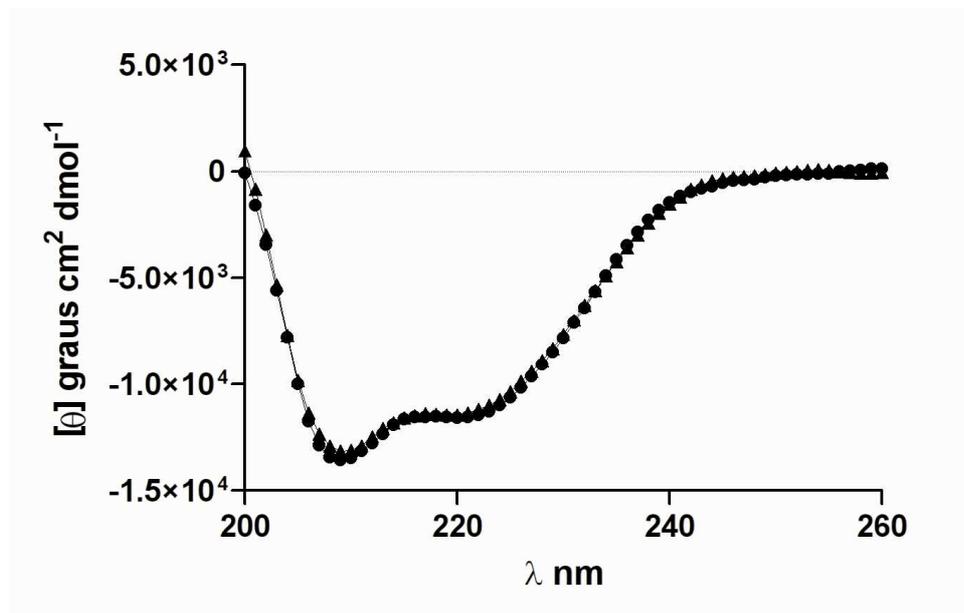


Figura 11. Espectros de CD na região do UV distante (200 – 260 nm) de 0.3 μ M de rXyr1 (●) e rXyr1_{T577A} (▲).

Como foi evidenciado pelos ensaios de BN-PAGE, a mutação não afeta a dimerização de rXyr1 (**Figura 9b**), dado este confirmado por EMSA (**Figura 12a**). No entanto, a versão rXyr1_{T577A} apresentou maior Kd que a proteína selvagem (**Figura 12b e Figura Suplementar S1, ver em Anexos**), confirmando que a modulação da atividade de rXyr1 por fosforilação afeta diretamente a capacidade do fator de se ligar ao DNA.

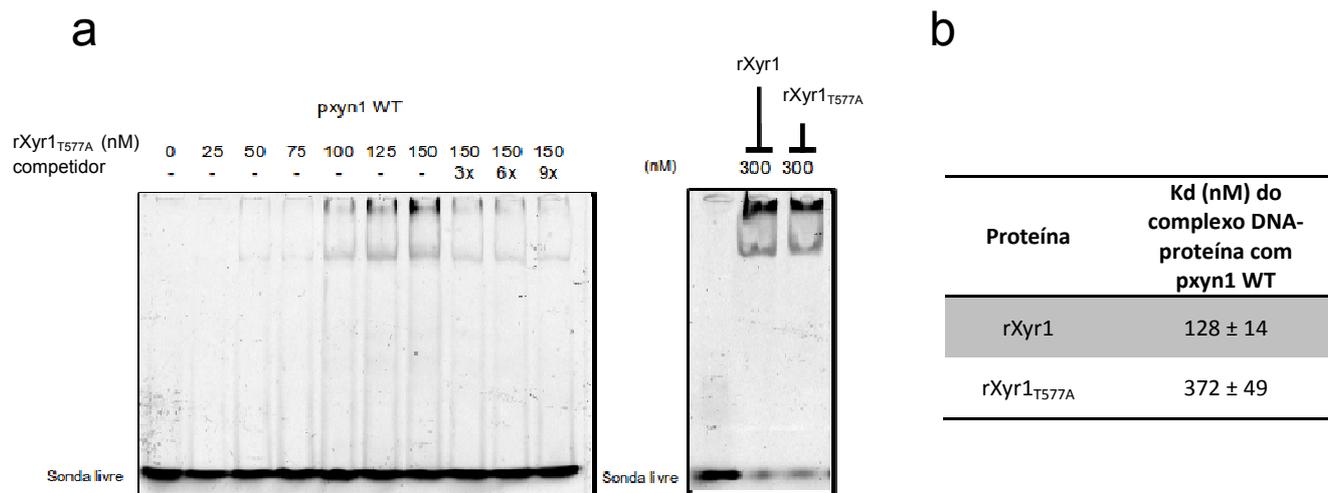


Figura 12. (a) Ensaio de EMSA para a região promotora de *xyn1*: interação de rXyr1_{T577A} com a sonda pxyn1 WT. A confirmação da especificidade de ligação foi evidenciada empregando-se competidores não marcados em excesso molar de 3, 6 e 9 vezes para a sonda “pxyn1 WT” (b) As aparentes constantes de dissociação (kd) dos complexos DNA-proteína formadas foram determinadas por titulação empregando-se CD. Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n=3).

A fosforilação de Xyr1 em outras posições abre a possibilidade de investigação de outros mecanismos de modulação para Xyr1 que não apenas afinidade de ligação ao DNA. A primeira escolha lógica seria a investigação futura de resíduos na região do possível domínio de ativação transcricional, tendo em vista a importância do resíduo Tyr-864 em XlnR (Hasper et al., 2004), conservado na posição 929 em *T. reesei* (**Figura 4**), e que, quando substituído por fenilalanina, impôs forte redução da atividade xilanolítica de *A. niger*.

Adicionalmente, no intuito de avaliar a possível interferência na estabilidade estrutural de rXyr1 causada pela mutação T577A, um ensaio piloto de desnaturação térmica da proteína selvagem e do mutante foi realizado elevando-se a temperatura de 20 a 95°C, permitindo o equilíbrio por 5 minutos antes da realização das medidas. Não foi observada diferença entre a T_m de desnaturação entre as duas proteínas (dados não mostrados). No entanto, tal experimento não foi levado em consideração para uma real análise de resultados, em virtude do caráter não reversível da desnaturação térmica observada, com concomitante agregação e precipitação das proteínas. Isso impossibilitou o cálculo de parâmetros termodinâmicos que permitiriam uma análise mais segura desse resultado específico.

4.3.5 Domínio responsivo à glicose

A modulação da atividade transcricional de proteínas da família $Zn(II)_2Cys_6$ em resposta a sinais metabólicos é comum para. Wang e colaboradores (1997) descrevem um fenômeno de modulação da atividade transcricional de LEU3 em *S. cerevisiae*, no qual a proteína sofre possível mudança conformacional na presença de isopropilmalato, um intermediário metabólico da biosíntese de leucina, expondo o domínio de ativação transcricional do fator. No caso de GAL4, o membro da família $Zn(II)_2Cys_6$ melhor estudado até então, o mascaramento do domínio de ativação transcricional ocorre pelo regulador GAL80. Na presença de galactose, uma terceira proteína, GAL3, forma um heterodímero com GAL80 liberando o domínio de ativação de GAL4 (revisto por Traven et al., 2006). Além da modulação da atividade de GAL4 por interações intermoleculares, existem evidências de um mecanismo de inibição direto por D-glicose. Stone & Sadowski (1993) demonstram que na região central de GAL4 há um domínio responsivo à D-glicose com papel na

inibição intramolecular da atividade transcricional do fator. Neste modelo, é considerada como hipótese para o mecanismo de modulação a ligação direta de D-glicose ou de seus metabólitos a GAL4 desencadeiam possível mudança conformacional na proteína.

A análise de mutantes de *A. niger* contendo três modificações em XlnR, a mutação Val-756-Phe e a introdução de códons de parada após os resíduos Leu-668 e Gly-797 apresentaram conseqüências interessantes. Ambas as modificações resultam em uma maior atividade xilanólítica do fungo, assim como um aumento da expressão de genes alvo de XlnR, como *xlnB* (endoxilanase B), em condições de repressão com D-glicose como única fonte de carbono (Hasper et al., 2004). A região que contém essas mutações está localizada entre a região em *coiled coil* (o SLN) e o domínio de ativação transcricional, provavelmente, está relacionada com a modulação da atividade de XlnR por D-glicose. O modelo de repressão por D-glicose proposto para XlnR ocorreria por meio de interações inter ou intramoleculares com a região C-terminal da proteína que resultariam em um estado inativo da proteína.

O regulador Xyr1 apresenta alta identidade nesta região descrita para XlnR, incluindo o resíduo Val-756 (posição 821, **Figura 4**). Esta constatação motivou investigação de uma possível modulação alostérica de Xyr1 por carboidratos. O ensaio de CD para rXyr1 na presença de D-glicose, assim como de D-xilose, mostrou-se que os dois carboidratos tiveram influência na estrutura secundária de rXyr1 (**Figura 13**). Em ambos os casos, ocorre diminuição no conteúdo de α -hélice e aumento nas razões $[\theta_{222}]/[\theta_{208}]$ (0,88 \rightarrow 0,93 em ambos os casos), com um efeito muito similar à interação de rXyr1 com o DNA. No entanto, ocorreu maior perda de estruturas em α -hélice na presença de D-xilose (até 33% contra 22% em D-glicose), o que pode indicar que rXyr1 assume diferentes conformações conforme o carboidrato empregado. Tais mudanças na estrutura da proteína aparentemente não interferem com a capacidade de ligação ao DNA (**Figura 14**).

Evidências a respeito da regulação transcricional de Xyr1 sustentam a hipótese de modulação da atividade do fator por ativação pós-transcricional. Mach-Aigner e colaboradores (2008) reportaram que a expressão de *xyr1* é diretamente influenciada por Cre1, o mediador da repressão por carbono em *T. reesei*, e que esse gene também é regulado negativamente por Ace1. Ainda no mesmo trabalho, a expressão de *xyr1* não foi afetada via uma molécula indutora específica. Enquanto a utilização de D-xilose e xilobiose induzem diferencialmente *xyn1* e *xyn2*, o acúmulo de mRNA de *xyr1* se manteve constante. Quando são tomados em conjunto com o fato que o promotor de *xyr1* não apresenta motivos de ligação a Xyr1, o que descartaria possível auto-regulação, esses dados dariam suporte a um simples modelo regulatório baseado em um mecanismo de repressão/desrepressão. Tal hipótese também explica razoavelmente como a repressão por carbono regula a expressão de genes como *cbh2* e *xyn2*, que não possuem sítios funcionais para a ligação de Cre1 (Zeilinger et al., 1996 e 2003).

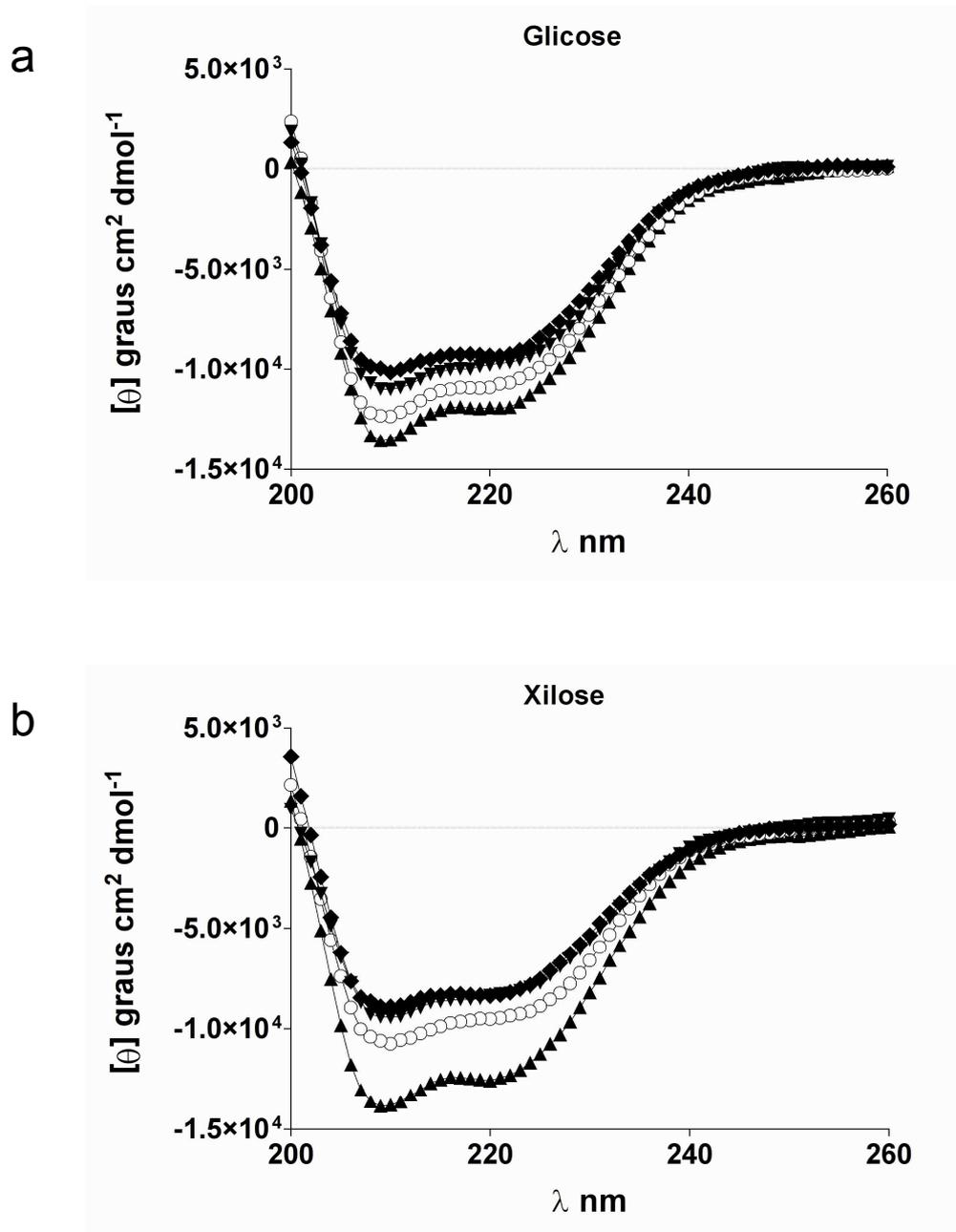


Figura 13. Espectros de CD de 0,25 μM de rXyr1 na região do UV distante (200 – 260 nm) na presença de D-glicose (**a**) e D-xilose (**b**). Relação proteína:carboidrato = 1:0 (\blacktriangle), 5:1 (\circ) 1:1 (\blacktriangledown) e 1:5 (\blacklozenge). A contribuição dos espectros dos carboidratos foi subtraída.

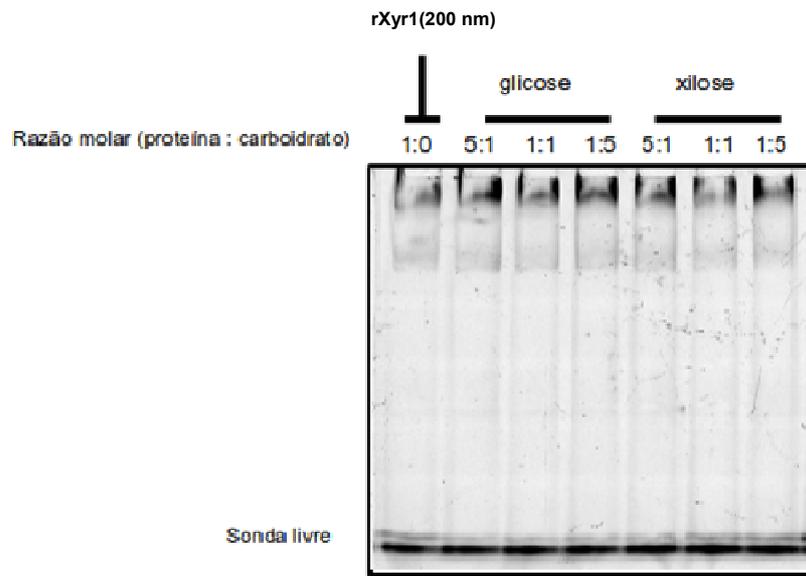


Figura 14. Ensaio de EMSA para a região promotora de *xyn1*: interação de rXyr1 com a sonda *pxyn1* WT na presença de D-glicose e D-xilose.

Em uma primeira análise, é plausível considerar que a síntese *de novo* de Xyr1 teria um papel importante em tal modelo de regulação. O que é contradito pelo fato de que análises de *footprinting in vivo* em *xyn1* e *xyn2* revelaram que Xyr1 se encontra ligado aos seus sítios de ligação ao DNA, mesmo em condições de repressão (Rauscher et al. 2006, Stricker et al., 2008a). Além disso, essas mesmas análises revelaram que o emprego de ciclohexamida, um inibidor da tradução, demonstrou que a indução de *xyn1* é independente de uma nova síntese de Xyr1 (Mach-Aigner et al., 2008). Este estaria permanentemente disponível na célula em níveis basais e cuja ativação provavelmente ocorreria por modificações pós-traducionais. O modelo de regulação por Xyr1 é, portanto, mais complexo do que as primeiras evidências experimentais sugeriram.

Diante do exposto, dentro desse modelo complexo, defendo a hipótese de que a regulação alostérica de Xyr1 é possível e a proposição de que distintas mudanças conformacionais, induzidas

tanto por D-glicose e D-xilose, poderiam influenciar a ativação do fator. Nossos dados vão diretamente em encontro com os dados de Mach-Aigner e colaboradores (2008). Esses autores demonstraram que um transformante de *T. reesei* contendo uma cópia constitutiva de *xyr1* apresenta aumento considerável no acúmulo de mRNA de *xyn1* quando o fungo é cultivado em D-xilose. Adicionalmente, *xyn1* é induzido por D-xilose mesmo na presença de D-glicose (Mach et al., 1996).

Embora a proposição de modulação alostérica para Xyr1 seja plausível dentro do modelo e encontre correlação com outros reguladores transcricionais como GAL4, tal hipótese necessita de outra confirmação experimental. No entanto, os resultados aqui apresentados deverão nortear a investigação mais aprofundada deste mecanismo ainda não explorado em Xyr1 ou em qualquer outro reguladores de xilanases.

5. Conclusão

Os resultados apresentados nesta etapa do trabalho mostraram a bem sucedida produção heteróloga da versão completa da proteína Xyr1 (rXyr1), a despeito de sua instabilidade, algo até então inédito entre reguladores de xilanases em fungos filamentosos. Nossos dados indicaram que rXyr1 naturalmente pode formar homodímeros em solução, mas também que a dimerização não é fundamental para a interação com o DNA, o que implica em uma dinâmica complexa de ligação ao promotor de *xyn1*, podendo se ligar como monômero ou dímero e interagir com ambos os motivos do sítio palindrômico.

A capacidade de dimerização fortalece ainda a hipótese de possíveis interações proteína-proteína com outros fatores transcricionais como Ace1 e Ace2, que modulariam a atividade de Xyr1 durante a indução da expressão de genes do complexo xilanolítico de *T. reesei*.

Modificações pós-traducionais têm sido apontadas como cruciais na regulação mediada por Xyr1 (Mach-Aigner et al.,2008). No presente trabalho, iniciamos a investigação de duas facetas de tal modulação: a fosforilação e a modulação alostérica. A fosforilação tem um possível papel na regulação da atividade de rXyr1, sendo necessária para a interação DNA-proteína *in vitro*, mas não afeta a homodimerização. Adicionalmente, apresentamos indícios de modulação alostérica para Xyr1, dependente tanto da interação com o DNA, como carboidratos, o que torna mais complexo esse modelo de regulação que tem se demonstrado bastante elaborado ao longo dos últimos 15 anos.

6. Perspectivas

Como perspectivas futuras desse trabalho, podemos destacar:

- 1- Análise comparativa do padrão de ligação de rXyr1 a outros promotores e verificação de como o número de motivos de ligação afetaria a dinâmica de interação, afinidade e se isso estaria correlacionado com a força destes promotores;
- 2- Análise da formação de heterodímeros entre rXyr1 e outros moduladores da expressão de xilanases, como Ace1 e Ace2, visando elucidar o mecanismo da rede de regulação transcricional;
- 3- A investigação do papel de mutações pontuais na estrutura e função do fator, *in vitro* e *in vivo*, sobretudo em regiões como os possíveis “domínio responsivo à glicose” e o “domínio de ativação transcricional”;
- 4- Análise do possível papel de mutação T577A e outras mutações pontuais na estabilidade estrutural de rXyr1 por meio de ensaios de desnaturação empregando agentes caotrópicos no lugar da temperatura.
- 5- A confirmação da hipótese de modulação alostérica por meio do emprego de versões truncadas da proteína e com a verificação da sensibilidade proteolítica de rXyr1 na ausência e na presença de DNA e carboidratos, com concomitante identificação dos fragmentos gerados. Tal abordagem permitirá o mapeamento de possíveis interações intramoleculares e como isso interferiria nas em interações proteína-proteína.

7. Referências Bibliográficas

- Andrade, M. A., Chacón, P., Merelo, J. J., & Morán, F. (1993). Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Eng* , 6 (4), 383-390.
- Aro, N., Ilmén, M., Saloheimo, A., & Penttilä, M. (2003). ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl Environ Microbiol* , 69 (1), 56-65.
- Aro, N., Saloheimo, A., Ilmén, M., & Penttilä, M. (2001). ACEII, a novel transcriptional activator involved in regulation of cellulase and xylanase genes of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* , 276 (26), 24309-24314.
- Baeuerle, P. A., & Baltimore, D. (1988). Activation of DNA-binding activity in an apparently cytoplasmic precursor of the NF-kappa B transcription factor. *Cell* , 53 (2), 211-217.
- Baleja, J. D., Marmorstein, R., Harrison, S. C., & Wagner, G. (1992). Solution structure of the DNA-binding domain of Cd2-GAL4 from *S. cerevisiae*. *Nature* , 356 (6368), 450-453.
- Biely, P., Kremnický, L., Alföldi, J., & Tenkanen, M. (1994). Stereochemistry of the hydrolysis of glycosidic linkage by endo-beta-1,4-xylanases of *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett* , 356 (1), 137-140.
- Bisaria, V. S., & Mishra, S. (1989). Regulatory aspects of cellulase biosynthesis and secretion. *Crit Rev Biotechnol* , 9 (2), 61-103.
- Blom, N., Gammeltoft, S., & Brunak, S. (1999). Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* , 294 (5), 1351-1362.
- Bondos, S. E., & Bicknell, A. (2003). Detection and prevention of protein aggregation before, during, and after purification. *Anal Biochem* , 316 (2), 223-231.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* , 72, 248-254.
- Buchert, J., Oksanen, T., Pere, J., Siika-Aho, M., Suurnäkki, A., Viikari, L. (1998) Applications of

- Trichoderma reesei* enzymes in the pulp and paper industry. In: Harman, G.E., & Kubicek, C. P. (eds) *Trichoderma & Gliocladium*. Taylor & Francis, Londres, pp 343-363.
- Carey, M., Kakidani, H., Leatherwood, J., Mostashari, F., & Ptashne, M. (1989). An amino-terminal fragment of GAL4 binds DNA as a dimer. *J Mol Biol* , 209 (3), 423-432.
- Choy, N., Raussens, V., & Narayanaswami, V. (2003). Inter-molecular coiled-coil formation in human apolipoprotein E C-terminal domain. *J Mol Biol* , 334 (3), 527-539.
- Christophe, D., Christophe-Hobertus, C., & Pichon, B. (2000). Nuclear targetting of proteins: how many different signals? *Cell Signal*, 12, 337–341.
- Cunha, E. S., Domingues, C. C., & de Paula, E. (2011). Modified native electrophoresis protocol for the solubilization and separation of mitochondrial protein complexes. *Anal Biochem* , 418 (1), 158-160.
- Cziferszky, A., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (2002). Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J Biol Chem* , 277 (17), 14688-14694.
- de Vries, R. P.; van de Vondervoort, P. J. I.; Hendriks, L.; van de Belt, M., & Visser, J. (2002). Regulation of the alpha-glucuronidase-encoding gene (*aguA*) from *Aspergillus niger*. *Mol Genet Genomics* , 268 (1), 96-102.
- Epstein, J., Cai, J., Glaser, T., Jepeal, L., & Maas, R. (1994). Identification of a Pax paired domain recognition sequence and evidence for DNA-dependent conformational changes. *J Biol Chem* , 269 (11), 8355-8361.
- Etages, S. A. D.; Saxena, D.; Huang, H. L.; Falvey, D. A.; Barber, D., & Brandriss, M. C. (2001). Conformational changes play a role in regulating the activity of the proline utilization pathway-specific regulator in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* , 40 (4), 890-899.
- Fiala, G. J.; Schamel, W. W. A., & Blumenthal, B. (2011). Blue native polyacrylamide gel

electrophoresis (BN-PAGE) for analysis of multiprotein complexes from cellular lysates. *J Vis Exp* (48).

Fields, S., & Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340 (6230), 245-246.

Fowler, T., & Brown, R. D. (1992). The *bg/1* gene encoding extracellular beta-glucosidase from *Trichoderma reesei* is required for rapid induction of the cellulase complex. *Mol Microbiol*, 6 (21), 3225-3235.

Fried, M., & Crothers, D. M. (1981). Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res*, 9 (23), 6505-6525.

Furukawa, T., Shida, Y., Kitagami, N., Mori, K., Kato, M., Kobayashi, T., et al. (2009). Identification of specific binding sites for XYR1, a transcriptional activator of cellulolytic and xylanolytic genes in *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol*, 46 (8), 564-574.

Furukawa, T., Shida, Y., Kitagami, N., Ota, Y., Adachi, M., Nakagawa, S., et al. (2008). Identification of the cis-acting elements involved in regulation of xylanase III gene expression in *Trichoderma reesei* PC-3-7. *Fungal Genet Biol*, 45 (7), 1094-1102.

Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., et al. (2003). The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*, 422 (6934), 859-868.

Galante, Y. M., de Conti, A., & Monteverdi, R. (1998a) Application of *Trichoderma* enzymes in the textile industry. In: Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (eds) *Trichoderma & Gliocladium*. Taylor & Francis, Londres, pp 311-325.

Galante, Y. M., de Conti, A., & Monteverdi, R. (1998b) Application of *Trichoderma* enzymes in the food and feed industries. In: Harman, G. E., & Kubicek, C. P. (eds) *Trichoderma & Gliocladium*. Taylor & Francis, Londres, pp 327-342.

Geourjon, C., & Deléage, G. (1995). SOPMA: significant improvements in protein secondary

- structure prediction by consensus prediction from multiple alignments. *Comput Appl Biosci* , 11 (6), 681-684.
- Greenfield, N. J. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* , 1 (6), 2876-2890.
- Hamilton, S., Odili, J., Pacifico, M. D., Wilson, G. D., & Kupsch, J.-M. (2003). Effect of imidazole on the solubility of a his-tagged antibody fragment. *Hybrid Hybridomics* , 22 (6), 347-355.
- Hasper, A. A.; Trindade, L. M.; van der Veen, D.; van Ooyen, A. J. J., & de Graaff, L. H. (2004). Functional analysis of the transcriptional activator XlnR from *Aspergillus niger*. *Microbiology* , 150 (Pt 5), 1367-1375
- Hasper, A. A.; Visser, J., & de Graaff, L. H. (2000). The *Aspergillus niger* transcriptional activator XlnR, which is involved in the degradation of the polysaccharides xylan and cellulose, also regulates D-xylose reductase gene expression. *Mol Microbiol* , 36 (1), 193-200.
- Hrmová, M., Biely, P., & Vrsanska, M. (1986) Specificity of cellulase and β -xylanase induction in *Trichoderma reesei* QM 9414. *Arch Microbiol*, 144: 307-311.
- Ilmén, M., Onnela, M. L., Klemsdal, S., Keränen, S., & Penttilä, M. (1996). Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Mol Gen Genet* , 253 (3), 303-314.
- Keegan, L., Gill, G., & Ptashne, M. (1986). Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* , 231 (4739), 699-704.
- Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* , 1751 (2), 119-139.
- Kirito, K., Fox, N., & Kaushansky, K. (2004). Thrombopoietin induces HOXA9 nuclear transport in immature hematopoietic cells: potential mechanism by which the hormone favorably affects hematopoietic stem cells. *Mol Cell Biol* , 24 (15), 6751-6762.

- Kraulis, P. J., Raine, A. R., Gadhavi, P. L., & Laue, E. D. (1992). Structure of the DNA-binding domain of zinc GAL4. *Nature* , 356 (6368), 448-450.
- Krishna, S. S., Majumdar, I., & Grishin, N. V. (2003). Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res* , 31 (2), 532-550.
- Kubicek, C. P. (1993) Cellulose to cellulase inducers: facts and fiction. In: Suominen, P., & Reinikainen T (eds) Proceedings of the 2nd Tricel Symposium on *Trichoderma reesei* cellulases and other hydrolases. Foundation for biotechnical and industrial fermentation research, Espoo, Finlândia, pp 181-188.
- Lau, S. Y., Taneja, A. K., & Hodges, R. S. (1984). Synthesis of a model protein of defined secondary and quaternary structure. Effect of chain length on the stabilization and formation of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* , 259 (21), 13253-13261.
- Lohr, D., Venkov, P., & Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J* , 9 (9), 777-787.
- Lopes, J. E., Torgerson, T. R., Schubert, L. A., Anover, S. D., Ocheltree, E. L., Ochs, H. D., et al. (2006). Analysis of FOXP3 reveals multiple domains required for its function as a transcriptional repressor. *J Immunol* , 177 (5), 3133-3142.
- Lupas, A., Dyke, M. V., & Stock, J. (1991). Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* , 252 (5010), 1162-1164.
- Ma, J., & Ptashne, M. (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* , 48 (5), 847-853.
- Mach, R. L., & Zeilinger, S. (2003). Regulation of gene expression in industrial fungi: *Trichoderma*. *Appl Microbiol Biotechnol* , 60 (5), 515-522.
- 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*. *Mol Microbiol* , 21 (6),

1273-1281.

- Mach, R. L., Zeilinger, S., Kristufek, D., & Kubicek, C. P. (1998). Ca²⁺-calmodulin antagonists interfere with xylanase formation and secretion in *Trichoderma reesei*. *Biochim Biophys Acta* , 1403 (3), 281-289.
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., & Mach, R. L. (2010). D-Xylose as a repressor or inducer of xylanase expression in *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Environ Microbiol* , 76 (6), 1770-1776.
- Mach-Aigner, A. R., Pucher, M. E., Steiger, M. G., Bauer, G. E., Preis, S. J., & Mach, R. L. (2008). Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Appl Environ Microbiol* , 74 (21), 6554-6562.
- MacPherson, S., Larochelle, M., & Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* , 70 (3), 583-604.
- Mandels, M., & Reese, E. T. (1960) Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J Bacteriol*, 79: 816-826.
- Mandels, M., Parrish, F. W., & Reese, E. T. (1962) Sophorose as an inducer of cellulases in *Trichoderma reesei*. *J Bacteriol*, 83: 400-408.
- Margolles-Clark, E., Ilmén, M., & Penttilä, M. (1997) Expression patterns of ten hemicellulase genes of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *J Biotechnol*, 57: 167-179.
- Margolles-Clark, E., Saloheimo, M., Aho, M. S., & Penttilä, M. (1996a). The alpha-glucuronidase-encoding gene of *Trichoderma reesei*. *Gene* , 172 (1), 171-172.
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Luonteri, E., & Penttilä, M. (1996b). Three alpha-galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur J Biochem* , 240 (1), 104-111.
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Nakari-Setälä, T., & Penttilä, M. (1996c). Cloning of genes

- encoding alpha-L-arabinofuranosidase and beta-xylosidase from *Trichoderma reesei* by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* , 62 (10), 3840-3846.
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Söderlund, H., & Penttilä, M. (1996d). Acetyl xylan esterase from *Trichoderma reesei* contains an active-site serine residue and a cellulose-binding domain. *Eur J Biochem* , 237 (3), 553-560.
- Marmorstein, R., & Harrison, S. C. (1994). Crystal structure of a PPR1-DNA complex: DNA recognition by proteins containing a Zn₂Cys₆ binuclear cluster. *Genes Dev* , 8 (20), 2504-2512.
- Marmorstein, R., Carey, M., Ptashne, M., & Harrison, S. C. (1992). DNA recognition by GAL4: structure of a protein-DNA complex. *Nature* , 356 (6368), 408-414.
- Marui, J., Kitamoto, N., Kato, M., Kobayashi, T., & Tsukagoshi, N. (2002a). Transcriptional activator, AoXlnR, mediates cellulose-inductive expression of the xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *FEBS Lett* , 528 (1-3), 279-282.
- Marui, J., Tanaka, A., Mimura, S., de, L. H., Visser, J., Kitamoto, N., et al. (2002b). A transcriptional activator, AoXlnR, controls the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet Biol* , 35 (2), 157-169.
- Matthews, J. R., Nicholson, J., Jaffray, E., Kelly, S. M., Price, N. C., & Hay, R. T. (1995). Conformational changes induced by DNA binding of NF-kappa B. *Nucleic Acids Res* , 23 (17), 3393-3402.
- Mehboob, S., Luo, B. H., Patel, B. M., & Fung, L. W. (2001). alpha beta Spectrin coiled coil association at the tetramerization site. *Biochemistry* , 40 (41), 12457-12464.
- Meierhan, D., Ariss, C. e., Neuenschwander, M., Sieber, M., Stackhouse, J. F., & Allemann, R. K. (1995). DNA binding specificity of the basic-helix-loop-helix protein MASH-1. *Biochemistry* , 34 (35), 11026-11036.
- Mikami, Y., Hori, T., Kimura, H., & Fukagawa, T. (2005). The functional region of CENP-H interacts

- with the Nuf2 complex that localizes to centromere during mitosis. *Mol Cell Biol* , 25 (5), 1958-1970.
- Muratani, M., Kung, C., Shokat, K. M., & Tansey, W. P. (2005). The F box protein Dsg1/Mdm30 is a transcriptional coactivator that stimulates Gal4 turnover and cotranscriptional mRNA processing. *Cell* , 120 (6), 887-899.
- Niedziela-Majka, A., Rymarczyk, G., Kochman, M., & Ozyhar, A. (1998). GST-Induced dimerization of DNA-binding domains alters characteristics of their interaction with DNA. *Protein Expr Purif* , 14 (2), 208-220.
- Nikolaev, I., Lenouvel, F., & Felenbok, B. (1999). Unique DNA binding specificity of the binuclear zinc AlcR activator of the ethanol utilization pathway in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* , 274 (14), 9795-9802.
- Noguchi, Y., Tanaka, H., Kanamaru, K., Kato, M., & Kobayashi, T. (2011). Xylose triggers reversible phosphorylation of XlnR, the fungal transcriptional activator of xylanolytic and cellulolytic genes in *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* , 75 (5), 953-959.
- Patel, L., Abate, C., & Curran, T. (1990). Altered protein conformation on DNA binding by Fos and Jun. *Nature* , 347 (6293), 572-575.
- Paulucci, A. A., Hicks, L., Machado, A., M, M. T., Kay, C. M., & Farah, C. S. (2002). Specific sequences determine the stability and cooperativity of folding of the C-terminal half of tropomyosin. *J Biol Chem* , 277 (42), 39574-39584.
- Pel, H. J., de, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., et al. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88. *Nat Biotechnol* , 25 (2), 221-231.
- Petersen, J. M., Skalicky, J. J., Donaldson, L. W., McIntosh, L. P., Alber, T., & Graves, B. J. (1995). Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix.

- Science , 269 (5232), 1866-1869.
- Pinna, L. A. (1990). Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta* , 1054 (3), 267-284.
- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., & Entian, K. D. (1997). Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Mol Cell Biol* , 17 (5), 2502-2510.
- Rauscher, R., Würleitner, E., Wacenovskiy, C., Aro, N., Stricker, A. R., Zeilinger, S., et al. (2006). Transcriptional regulation of *xyn1*, encoding xylanase I, in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell* , 5 (3), 447-456.
- Remboutsika, E., & Kohlhaw, G. B. (1994). Molecular architecture of a Leu3p-DNA complex in solution: a biochemical approach. *Mol Cell Biol* , 14 (8), 5547-5557.
- Sadowski, I., Costa, C., & Dhanawansa, R. (1996). Phosphorylation of Ga14p at a single C-terminal residue is necessary for galactose-inducible transcription. *Mol Cell Biol* , 16 (9), 4879-4887.
- Saito, S., Yokoyama, T., Aizawa, T., Kawaguchi, K., Yamaki, T., Matsumoto, D., et al. (2008). Structural properties of the DNA-bound form of a novel tandem repeat DNA-binding domain, STPR. *Proteins* , 72 (1), 414-426.
- Saloheimo, M., Kuja-Panula, J., Ylösmäki, E., Ward, M., & Penttilä, M. (2002). Enzymatic properties and intracellular localization of the novel *Trichoderma reesei* beta-glucosidase BGLII (cel1A). *Appl Environ Microbiol* , 68 (9), 4546-4553.
- Sambrook, J. & Russel, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Senior, D. J., Mayers, P. R., & Saddler, J. N. (1989) Production and purification of xylanases. *ACS Symp Ser*, 309: 641-655.
- Song, J. H., Waataja, J. J., & Martemyanov, K. A. (2006). Subcellular targeting of RGS9-2 is controlled by multiple molecular determinants on its membrane anchor, R7BP. *J Biol Chem* , 281

(22), 15361-15369.

Sternberg, D., & Mandels, G. R. (1979). Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J Bacteriol* , 139 (3), 761-769.

Stone, G., & Sadowski, I. (1993). GAL4 is regulated by a glucose-responsive functional domain. *EMBO J* , 12 (4), 1375-1385.

Stricker, A. R., Grosstessner-Hain, K., Würleitner, E., & Mach, R. L. (2006). Xyr1 (xylanase regulator 1) regulates both the hydrolytic enzyme system and D-xylose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell* , 5 (12), 2128-2137.

Stricker, A. R., Steiger, M. G., & Mach, R. L. (2007). Xyr1 receives the lactose induction signal and regulates lactose metabolism in *Hypocrea jecorina*. *FEBS Lett* , 581 (21), 3915-3920.

Stricker, A. R., Trefflinger, P., Aro, N., Penttilä, M., & Mach, R. L. (2008a). Role of Ace2 (Activator of Cellulases 2) within the *xyn2* transcriptosome of *Hypocrea jecorina*. *Fungal Genet Biol* , 45 (4), 436-445.

Stricker, A. R., Mach, R. L., & de Graaff, L. H. (2008b). Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *Appl Microbiol Biotechnol*, 78, 211-220.

Todd, R. B., & Andrianopoulos, A. (1997). Evolution of a fungal regulatory gene family: the Zn(II)₂Cys₆ binuclear cluster DNA binding motif. *Fungal Genet Biol* , 21 (3), 388-405.

Traven, A., Jelacic, B., & Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO Rep* , 7 (5), 496-499.

van Peij, N. N.; Gielkens, M. M.; de Vries, R. P.; Visser, J., & de Graaff, L. H. (1998a). The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl Environ Microbiol* , 64 (10), 3615-3619.

van Peij, N. N.; Visser, J., & de Graaff, L. H. (1998b). Isolation and analysis of xlnR, encoding a

- transcriptional activator co-ordinating xylanolytic expression in *Aspergillus niger*. *Mol Microbiol* , 27 (1), 131-142.
- Vincent, O., & Carlson, M. (1998). Sip4, a Snf1 kinase-dependent transcriptional activator, binds to the carbon source-responsive element of gluconeogenic genes. *EMBO J* , 17 (23), 7002-7008.
- Wang, D., Hu, Y., Zheng, F., Zhou, K., & Kohlhaw, G. B. (1997). Evidence that intramolecular interactions are involved in masking the activation domain of transcriptional activator Leu3p. *J Biol Chem* , 272 (31), 19383-19392.
- Weiss, M. A., Ellenberger, T., Wobbe, C. R., Lee, J. P., Harrison, S. C., & Struhl, K. (1990). Folding transition in the DNA-binding domain of GCN4 on specific binding to DNA. *Nature* , 347 (6293), 575-578.
- Würleitner, E., Pera, L., Wacenovský, C., Cziferszky, A., Zeilinger, S., Kubicek, C. P., et al. (2003). Transcriptional regulation of *xyn2* in *Hypocrea jecorina*. *Eukaryot Cell* , 2 (1), 150-158.
- Zeilinger, S., & Mach, R. L. (1998) Xylanolytic enzymes of *Trichoderma reesei*: properties and regulation of expression. *Curr Topics Cer Chem*, 1: 27-35.
- Zeilinger, S., Kristufek, D., Arisan-Atac, I., Hodits, R., & Kubicek, C. P. (1993). Conditions of formation, purification, and characterization of an alpha-galactosidase of *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Appl Environ Microbiol* , 59 (5), 1347-1353.
- Zeilinger, S., Mach, R. L., Schindler, M., Herzog, P., & Kubicek, C. P. (1996). Different inducibility of expression of the two xylanase genes *xyn1* and *xyn2* in *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem* , 271 (41), 25624-25629.
- Zeilinger, S., Schmoll, M., Pail, M., Mach, R. L., & Kubicek, C. P. (2003). Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter *cbh2* associated with cellulase induction. *Mol Genet Genomics* , 270 (1), 46-55.
- Zhou, N. E., Kay, C. M., & Hodges, R. S. (1992). Synthetic model proteins. Positional effects of

interchain hydrophobic interactions on stability of two-stranded alpha-helical coiled-coils. *J Biol Chem* , 267 (4), 2664-2670.

8. Anexos

Figura Suplementar

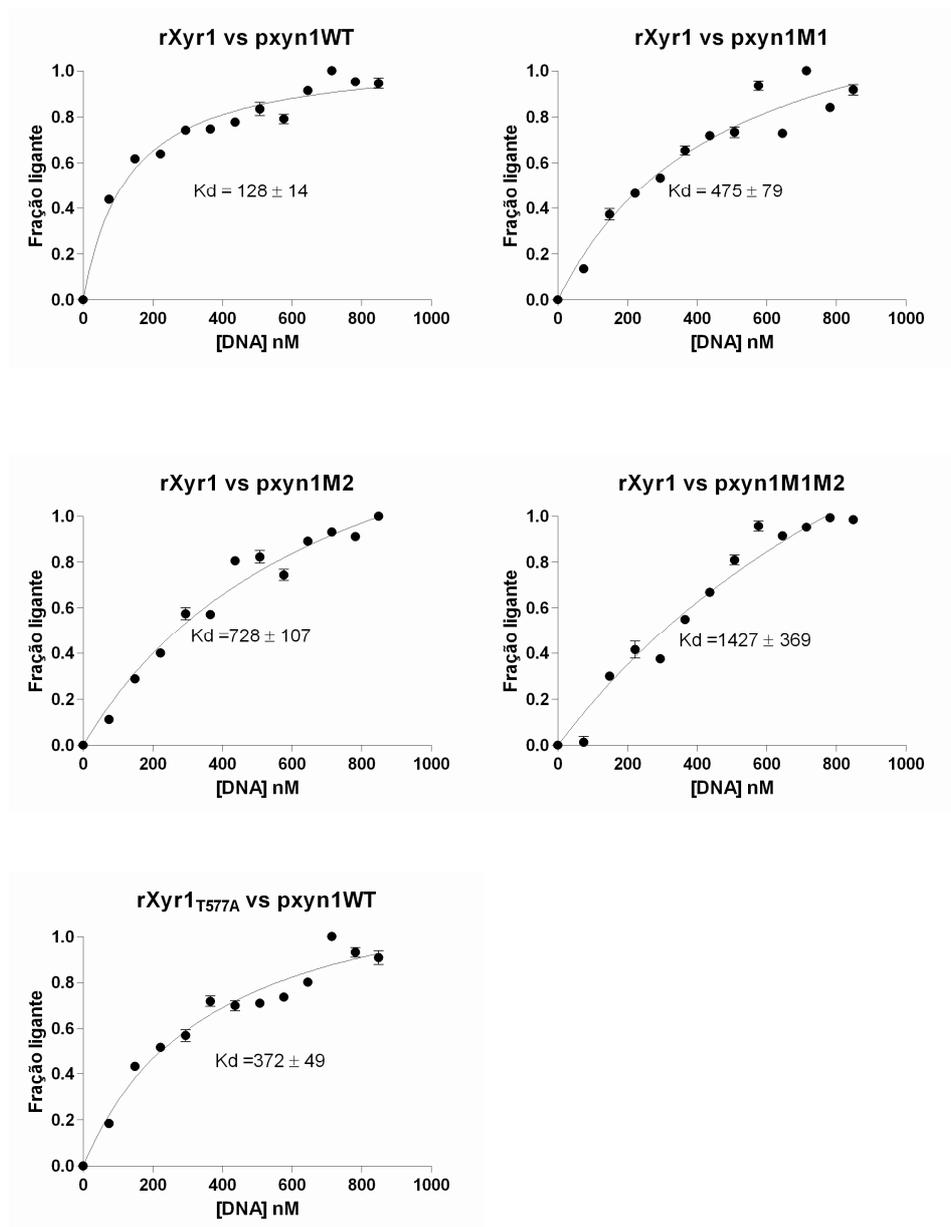


Figura Suplementar S1. Determinação das aparentes constantes de dissociação. As titulações foram realizadas com 0,3 μ M de proteína, adicionando-se 0 – 0,9 μ M de DNA, com um tempo de equilíbrio de 2 min entre cada varredura, a 22 °C. As aparentes constantes de dissociação (K_d) dos complexos DNA-Proteína foram estimadas seguindo as mudanças de elipticidade residual molar a 222 nm utilizando a equação $Y = (B_{max}X)/(K_d+X)$, onde B_{max} representa a fração de complexo formado no ponto de saturação, na mesma unidade que Y (fração ligante) e X representa a concentração de DNA a cada ponto da titulação. Os valores de K_d foram obtidos por regressão não-linear empregando-se a equação descrita.



Carbon source and pH-dependent transcriptional regulation of cellulase genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* grown on sugarcane bagasse

Thiago Machado Mello-de-Sousa^a, Ildinete Silva-Pereira^a, Marcio José Poças-Fonseca^{b,*}

^a Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília-DF 70.910-900, Brazil

^b Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília-DF 70.910-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2010

Received in revised form 18 August 2010

Accepted 19 August 2010

Keywords:

Cellulases

CreA

PacC

Transcriptional regulation

Humicola grisea var. *thermoidea*

Sugarcane bagasse

ABSTRACT

Time-course expression profiles of one xylanase and eight cellulase encoding genes, as well as of two transcription factor encoding genes of *Humicola grisea* var. *thermoidea* were established in different culture media pHs and carbon sources (glucose and sugarcane bagasse). Quantitative real-time RT-PCR analysis revealed a remarkable and parallel increase in mRNA accumulation for *cbh1.1*, *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *bg14* and *xyn1* at alkaline pH and with sugarcane bagasse employed as the sole carbon source. Glucose utilization led to a higher *creA* mRNA accumulation compared to the other genes. A distinct pattern was observed for *egl4*, whose mRNA preferably accumulated in acidic conditions. The transcriptional profile data combined with the analysis of the *in vitro* binding of PacC and CreA transcription factors to the promoters support the CreA-mediated carbon repression and the PacC-related pH regulation of *H. grisea* cellulase and xylanase encoding genes. Moreover, EMSA analyses suggest a role for CreA on *pacC* transcriptional regulation. These data will be useful to *H. grisea* hydrolytic enzymes production improvement, as well as to the design of optimized promoters aiming industrial heterologous proteins production.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Depletion of crude oil reserves, environmental concerns about fossil fuel usage and increasing worldwide demand for energy have renewed interest in the development of alternative sustainable fuels [1,2]. A promising approach for the development of alternative fuels relies on the production of second-generation bioethanol from the abundant and renewable lignocellulosic biomass [3]. In this process, the enzymatic lignocellulose saccharification represents a key step for biomass conversion. Therefore, several studies have focused on the bioprospection of microorganisms that efficiently degrade plant cell wall polymers, such as cellulose and xylan [4–6]. Apart from the exciting potential of employing hydrolases for bioethanol production, a wide range of industrial processes take advantage of such enzymes. Cellulases and xylanases are used in the paper and textile industries [7,8], in the extraction of vegetal oils, essences, alkaloids, skin product and as adjuvant for beer malt [9]. Distinct applications such as the production of animal feed, formulation of detergents, juice clarification and wine production are frequently described in the literature. For these processes special attention should be drawn to thermophilic fungi as sources of thermostable enzymes, because of their

higher stability and activity over a wider range of temperatures [10,11].

The thermophilic fungus *Humicola grisea* var. *thermoidea* produces an efficient hydrolytic system with a wide range of thermostable enzymes such as trehalase [12], glucoamylase [13], cellulases [14,15] and xylanases [16]. In this respect, it represents a promising agent for agricultural residue bioconversion [17,18]. It can also be employed as a gene donor for the heterologous production of industrial enzymes and to complement enzymatic cocktails [19].

Despite the biotechnological potential of *H. grisea*, little is known about the regulation of its gene expression. Previous studies have already focused on the inducing properties of different complex carbon sources on the *H. grisea* lignocellulolytic complex [15,20–23]. However, those studies were based only on northern blot analysis after long induction periods. This generated useful information, but may have missed mRNAs produced in the earlier periods of induction, or mRNAs produced at levels undetectable by northern blot. In this paper, using quantitative RT-PCR (qRT-PCR), we established the early time-course expression profiles of several *H. grisea* hydrolase encoding genes, in different culture medium pHs, and carbon sources. The influence of the pH and carbon catabolic repression-related transcription factors (PacC and CreA) over the expression of the hydrolase genes was also investigated through *in vitro* pull-down DNA assays and EMSA analyses employing the DNA-binding domains (DBDs) from PacC and CreA proteins. Our data support, PacC-mediated pH regulation,

* Corresponding author. Tel.: +55 61 3307 2423/3307 2390;

fax: +55 61 3349 8411/3107 2923.

E-mail address: mpossas@unb.br (M.J. Poças-Fonseca).

CreA-mediated carbon repression and also suggest that there may be regulatory crosstalk between these two mechanisms.

2. Material and methods

2.1. *H. grisea* pre-cultivation

H. grisea was maintained at 42 °C on 4.0% (w/v) oatmeal (Quaker) solid medium. For mycelium obtainment, 10⁶ spores/mL were inoculated in 50 mL of Pontecorvo's minimal medium (MM) [24], at pH 6.8 (non-buffered), enriched with 0.25% (w/v) yeast extract, 0.1% (w/v) peptone and supplemented with 1% (w/v) glucose (GLU). Incubation proceeded for 24 h (42 °C/120 rpm).

2.2. Glycosyl hydrolase induction

For glycosyl hydrolase encoding genes induction, grown mycelium was filtered, washed and transferred to fresh 50 mL MM, supplemented with 1% (w/v) GLU or 0.1% ball-milled, steam-exploded sugarcane bagasse (SCB) as carbon sources. Culture media pH was adjusted to 5.0 or to 8.0 (buffered with 100 mM sodium citrate). Cultures were incubated for 0.5, 2, 6, and 18 h (42 °C/120 rpm). For the acidic to alkaline shift experiment, the filtered and washed mycelium was previously inoculated for 2 h (42 °C/120 rpm) in 50 mL MM, at pH 5.0, 1% (w/v) GLU and then transferred to 50 mL MM containing 1% (w/v) GLU or 0.1% SCB, at pH 5.0 or pH 8.0 and then incubated for additional 2 h (42 °C/120 rpm). For each culture condition and growth period, mycelium was harvested by filtration for RNA extraction. Cultures supernatants samples were collected. The supernatants glucose consumption measurement was performed by glucose oxidase/peroxidase colorimetric assay by using the Glucose kit (Biosystems). No variation in the pH of buffered media was observed during cultivation.

2.3. *H. grisea* *pacC* gene cloning

A 2.9 kb DNA fragment corresponding to the *H. grisea* *pacC* sequence was screened from a previously constructed Lambda DASH II (Stratagene) genomic library. An additional 630 bp fragment corresponding to the 5' upstream non-coding region (5' UP) was obtained through Single Oligonucleotide Nested-PCR (SON-PCR) [26], using genomic DNA as template and the reverse primers described in Supplementary Table 1.

2.4. RNA extraction, reverse transcription and real-time PCR analysis

Harvested mycelia were immediately ground in liquid nitrogen to a fine powder. RNA was extracted by using the Trizol reagent (Invitrogen) and the synthesis of cDNA was carried out with 2 µg of DNase I-treated (Promega) total RNA and SuperScript III (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. Real-time PCRs were carried out in a 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Amplification assays were performed in 10 µL reactions containing 0.2 µM of each primer, 5 µL Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and 2 µL of template cDNA (3-fold diluted). Employed primers are listed in Supplementary Table 1. Real-time PCR program consisted of 40 cycles at 95 °C for 3 s and 60 °C for 20 s. All assays were performed in triplicate. Reactions without cDNA functioned as negative controls. The specificity of the PCR products was confirmed by melting curve analysis. Relative gene expression analysis was performed by the 2^{-ΔΔCt} method [27]. The constitutive actin encoding gene (*act*) was employed for normalization, as it did not present a significant Ct change (17.45 ± 0.29) in all tested experimental conditions. Data were

presented as expression values (fold change) of each gene. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to identify differences amongst groups.

2.5. In silico analysis of the 5' upstream regions

The search for putative *cis*-binding elements within the 5' UP regions of the interest genes (Supplementary Table 1) was done using the Transcription Element Search System (TESS) website (<http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tes/s/tes>). The weight matrix models for PacC 5'-GCCARG-3' [28,29] and CreA 5'-SYGGRG-3' [30] consensus binding sequences were used according to the website's full search form instructions.

2.6. GST fusion proteins production

The production of GST fusion proteins was achieved by initial amplification of the DBD encoding regions from *pacC* and *creA* genes, with subsequent cloning into the pGEM-T vector (Promega). PCRs were performed from cDNA templates employing the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) and primers listed in Supplementary Table 1. The 391 bp *Bam* HI/*Xho* I *pacC* and the 254 bp *Bam* HI/*Sal* I *creA* DNA fragments were sub-cloned into the pGEX-4T2 expression vector (GE Healthcare). The recombinant GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ and GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ fusion proteins were produced in *Escherichia coli* BL21(DE3) and purified using GSTrap FF affinity columns (GE Healthcare), according to the manufacturer's guidelines. The recombinant proteins concentration was estimated by the Bradford method [25].

2.7. Pull-down DNA assay

Genomic DNA sequences corresponding to the genes 5' UP regions were amplified with the Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) using the primers listed in Supplementary Table 1. Amplicons were purified with the GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare). Binding reactions were performed with 2 µg of each DNA fragment and 5 µg of GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ or GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾, in a reaction mixture consisting of 0.1 M KCl, 2.5 µM ZnCl₂, 4 mM spermidine and 2 µg poly [d(I-C)], at room temperature for 30 min. Reaction mixtures were then incubated with 10 µL of a glutathione-sepharose 4B matrix (Amersham Biosciences) for an additional 30 min at room temperature, followed by three PBS washes (500 × g, room temperature). Pellets and supernatants were then submitted to proteinase K (PK) digestion (100 µg/mL) in 100 µL of 1 × PK buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM EDTA and 0.5% SDS) at 65 °C for 1 h. Enzyme was extracted by phenol/chloroform treatment and DNA was ethanol-precipitated. A quarter of the rescued material was analysed by electrophoresis in 1.5% agarose TBE gels. Pull-down assay negative controls were performed employing 5 µg of purified GST instead of the fusion proteins.

2.8. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Double-stranded probes were produced by annealing synthetic FAM-labeled oligonucleotides and their complementary sequences (Supplementary Table 1). 500 ng of each oligonucleotide were heated at 95 °C in 30 µL of 1 × annealing buffer (0.2 M Tris-HCl pH 7.7) for 5 min; reactions were then slowly cooled down to room temperature. DNA-protein binding was achieved by incubating the GST fusion proteins with 30 ng of probe (20 min, room temperature) in a reaction mixture consisting of 0.1 M KCl, 2.5 µM ZnCl₂, 4 mM spermidine and 1 µg poly [d(I-C)]. For competition experiments, unlabeled probes (wild type and mutated versions) were used in a 100 to 200-fold molar excess. Reaction mixtures were

loaded on 8% or 15% non-denaturing polyacrilamide gel and electrophoresed at 500 V in 0.5 × TBE. Gel analyses were carried out on a Typhoon 9210 variable mode imager (GE Healthcare) and densitometric quantification was performed with the ImageQuant image analysis software (GE Healthcare).

3. Results

3.1. *H. grisea* *pacC* sequence analysis

Analyses of genomic and cDNA sequences revealed that *H. grisea* *pacC* gene (GenBank accession no. EU684545.1) contains a 2111 bp open reading frame (ORF) interrupted by two introns of 98 and 93 bp in length. Southern blot analysis showed that *pacC* occurs as single copy in the fungal genome (data not shown). The *pacC* ORF encodes a putative 639 amino acid polypeptide. The ScanProsite analysis identified three distinct Cys2His2-type zinc finger motifs (residues 99 to 124, 135 to 159, and 165 to 187), possibly corre-

sponding to the PacC DNA-binding domain. Sequence alignment showed that the complete PacC deduced protein presents considerable sequence similarity with PacC orthologs identified in other fungi, such as *Magnaporthe grisea* (73.8%) (UniProtKB accession no. Q52B93), *Neurospora crassa* (72%) (Q7RVQ8), *Fusarium oxysporum* (69.7%) (Q870A3), *Aspergillus niger* (61.3%) (Q00203) and *Aspergillus nidulans* (60.1%) (Q00202). Similarities were higher in the zinc-finger regions and the 92.1% similarity with the *A. nidulans* corresponding sequence suggested that PacC from *H. grisea* might recognize the 5'-GCCARG-3' binding consensus [29].

3.2. Hydrolases and transcription factors encoding genes expression profiles

mRNA accumulation of eight glycosyl hydrolases and two transcription factor encoding genes were followed for 18 h using two different carbon sources and two different pH values (Table 1). *H. grisea* growing on SCB resulted in higher mRNA levels for all cellu-

Table 1
Time-course quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) analysis of glycosyl hydrolase and transcription factor genes.

Gene	Cultivation period (h)	Glucose		Sugarcane bagasse	
		pH 5.0	pH 8.0	pH 5.0	pH 8.0
<i>cbh1.1</i>	0.5	1.74 ± 0.05 ^a	1.68 ± 0.05 ^a	16.27 ± 1.75	74.33 ± 9.90
	2	1.82 ± 0.60 ^a	1.80 ± 0.02 ^a	53.31 ± 4.99	345 ± 103.35
	6	2.16 ± 0.30 ^a	2.00 ± 0.05 ^a	127 ± 14.60	38.5 ± 8.59
	18	9.57 ± 1.33 ^a	10.20 ± 1.44 ^a	11.02 ± 1.59 ^a	30.49 ± 4.72
<i>cbh1.2</i>	0.5	3.64 ± 0.51 ^a	3.58 ± 0.25 ^a	3.34 ± 0.62 ^{ab}	2.14 ± 0.10 ^b
	2	4.56 ± 1.47 ^a	4.55 ± 0.38 ^a	6.15 ± 0.58 ^a	10.553.92 ± 2.147.12
	6	10.28 ± 0.51 ^a	10.53 ± 0.82 ^a	3297.59 ± 328.56	5.671.75 ± 65.1.42
	18	44.46 ± 7.05 ^{ab}	40.98 ± 4.21 ^a	78.81 ± 12.48 ^b	304.96 ± 26.48
<i>egl1</i>	0.5	3.92 ± 0.45 ^a	3.49 ± 0.23 ^a	18.04 ± 1.22	0.52 ± 0.04
	2	1.89 ± 0.65 ^{ab}	1.37 ± 0.44 ^b	3.89 ± 0.50 ^b	452.07 ± 116.33
	6	1.69 ± 0.16 ^a	1.54 ± 0.20 ^a	291.26 ± 43.35 ^b	179.52 ± 40.65 ^b
	18	4.13 ± 1.00 ^a	4.39 ± 0.70 ^a	13.32 ± 3.38 ^{ab}	7.07 ± 1.88 ^b
<i>egl2</i>	0.5	0.40 ± 0.06 ^{ab}	0.44 ± 0.05 ^a	0.27 ± 0.02 ^{ab}	0.72 ± 0.10 ^a
	2	0.28 ± 0.09 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.22 ± 0.01 ^a	23.37 ± 8.30
	6	0.21 ± 0.04 ^a	0.18 ± 0.06 ^a	118.18 ± 21.73	500.42 ± 49.14
	18	0.23 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.03 ^a	1.67 ± 0.73 ^a	25.82 ± 6.24
<i>egl3</i>	0.5	0.47 ± 0.06 ^a	0.23 ± 0.11 ^a	0.54 ± 0.08 ^a	1.57 ± 0.48 ^a
	2	0.36 ± 0.09 ^{ab}	0.50 ± 0.01 ^a	0.18 ± 0.05 ^b	23.55 ± 7.34
	6	0.21 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.04 ^a	5.38 ± 1.02	10.41 ± 1.2
	18	0.60 ± 0.10 ^a	0.69 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.05 ^a	1.14 ± 0.23 ^a
<i>egl4</i>	0.5	2.30 ± 0.38 ^a	0.04 ± 0.02 ^b	2.37 ± 0.34 ^a	0.01 ± 0.00 ^b
	2	3.01 ± 0.55	0.21 ± 0.01 ^a	5.72 ± 0.21	0.78 ± 0.22 ^a
	6	2.30 ± 0.14 ^a	0.14 ± 0.07 ^b	3.60 ± 0.37	1.27 ± 0.55 ^{ab}
	18	4.34 ± 0.97 ^{ab}	1.69 ± 0.30 ^a	5.07 ± 0.72 ^b	0.27 ± 0.08
<i>bgf4</i>	0.5	10.01 ± 3.25 ^a	10.41 ± 0.48 ^a	38.07 ± 5.91	262.33 ± 20.12
	2	14.64 ± 1.23 ^a	10.22 ± 1.04 ^a	14.46 ± 2.90 ^a	297.71 ± 90.75
	6	13.13 ± 1.06 ^a	12.09 ± 0.45 ^a	35.36 ± 4.13	187.54 ± 31.80
	18	10.58 ± 1.80 ^a	9.36 ± 0.19 ^a	7.41 ± 1.07 ^a	125.45 ± 17.34
<i>xyn1</i>	0.5	1.17 ± 0.11 ^a	1.12 ± 0.05 ^a	3.27 ± 0.28	19.42 ± 2.13
	2	0.93 ± 0.20 ^a	0.82 ± 0.01 ^a	3.46 ± 0.86	709.81 ± 182.41
	6	1.12 ± 0.16 ^a	1.44 ± 0.12 ^a	65.17 ± 6.04	255.36 ± 42.46
	18	0.48 ± 0.07 ^a	0.40 ± 0.01 ^a	3.23 ± 0.23	9.43 ± 2.15
<i>pacC</i>	0.5	0.70 ± 0.17 ^a	0.88 ± 0.49 ^a	1.58 ± 0.28 ^a	1.27 ± 0.15 ^a
	2	1.49 ± 0.35 ^a	1.39 ± 0.22 ^a	1.30 ± 0.08 ^a	1.00 ± 0.39 ^a
	6	1.10 ± 0.07 ^a	1.81 ± 0.60 ^a	0.99 ± 0.16 ^a	1.37 ± 0.09 ^a
	18	0.76 ± 0.11 ^a	1.38 ± 0.11 ^b	0.83 ± 0.12 ^a	1.77 ± 0.22 ^b
<i>creA</i>	0.5	15.60 ± 6.70 ^a	3.48 ± 1.57 ^a	8.29 ± 1.57 ^a	0.36 ± 0.03 ^a
	2	30.34 ± 6.24	2.51 ± 0.29 ^{ab}	5.31 ± 1.14 ^a	1.45 ± 0.26 ^b
	6	95.43 ± 12.17	44.21 ± 13.09	4.20 ± 0.47 ^a	6.10 ± 1.20 ^a
	18	18.65 ± 4.99	4.06 ± 0.84	1.11 ± 0.06 ^a	0.74 ± 0.24 ^a

Data are presented as fold change ± standard error of mean (SEM) from three independent biological replicates, in comparison to the expression values observed in the cultivation period of 0 h (fold change = 1). Equal letters denote no statistical difference among data in the same incubation period ($P < 0.05$).

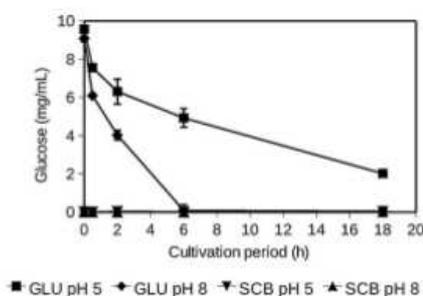


Fig. 1. Glucose consumption of *H. grisea* grown in presence of 1% glucose (GLU) or 0.1% sugarcane bagasse (SCB) as the sole carbon source and in different pH conditions. Error bars indicate \pm standard deviation (SD) from three independent biological replicates.

lases and xylanase genes when compared to growing on GLU as the sole carbon source. Considering the distinct pH values, a different pattern was observed for seven out of eight hydrolase genes. For *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *bgl4* and *xyn1* a remarkable and simultaneous increase in mRNA levels was observed with SCB at pH 8.0. In this condition, the mRNA levels were not only higher, but also achieved earlier maximum accumulation states when compared to the acidic environment (pH 5.0). The maximum accumulation was observed at 2 h, except for *egl2* (6 h) and for *bgl4* (0.5 h) mRNAs. Besides displaying the fastest induction response, the *bgl4* transcript maintained the high expression level throughout the 18 h cultivation period. When GLU was used as carbon source, the pH value had no effect on transcripts accumulation for *cbh1.1*, *cbh1.2*, *egl1*, *egl2*, *egl3*, *bgl4* and *xyn1*. On the other hand, a noteworthy distinct profile was observed for *egl4*, whose mRNA preferably accumulated in acidic conditions, particularly with SCB as carbon source.

Glucose consumption was measured during the 18 h growth period (Fig. 1). This measurement indicated a faster rate of glucose consumption for *H. grisea* in alkaline conditions. Glucose released from lignocellulose degradation in SCB cultures was not detected, probably due to its immediate consumption (Fig. 1). Glucose concentrations after the 24 h pre-growing period indicated that glucose had already been consumed prior to transferring to the different induction conditions (data not shown). pH measurement after this same period indicated that, in non-buffered conditions the growth of *H. grisea* increased the culture medium pH from 6.8 to 7.8 (± 0.2).

In addition to the hydrolytic enzyme encoding genes, the expression profiles of the pH- and CCR-related transcription factors encoding genes (*pacC* and *creA*) were evaluated (Table 1). Along the 18 h cultivation period no significant difference was observed for *pacC* mRNA levels. On the other hand, *creA* transcripts clearly accumulated up to 6 h in the presence of GLU, particularly in acidic conditions.

The maintenance of *pacC* transcript levels motivated the investigation of its expression during an acidic to alkaline pH shift (Fig. 2A). After a 2 h pre-incubation in the presence of GLU at pH 5.0, mycelium was washed and transferred to GLU or SCB media at pH 5.0 or pH 8.0 and cultivated for additional 2 h. In this assay, *pacC* mRNA levels reached the highest rates in the alkaline environment, thus corroborating the role of the ambient pH on its own regulation, as proposed for other *pacC* homologs [28,31–33]. As this high transcript accumulation was achieved with SCB but not with GLU, it is possible that CCR might participate in *pacC* regulation, as we further discuss later. Changes in *creA* mRNA accumulation were also evaluated during the acidic to alkaline shift (Fig. 2B). The transcript accumulation pattern was similar to the one observed in the induction experiments (0.5–18 h) (Table 1).

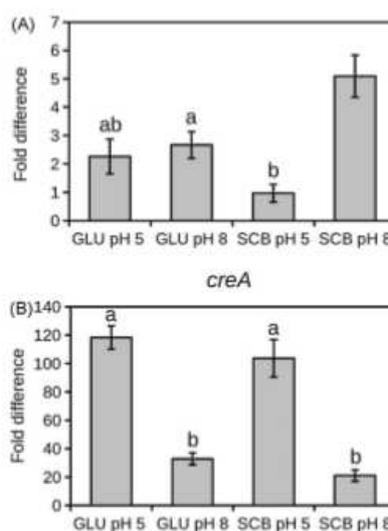


Fig. 2. Quantitative real-time RT-PCR analysis of (A) *pacC* and (B) *creA* during an acidic to alkaline pH shift. *H. grisea* cultures were produced by direct spore incubation in Pontecorvo's enriched medium for 24 h. The filtered and washed mycelia were pre-cultured in MM with 1.0% GLU and incubated for 2 h. These mycelia were then transferred to MM with 1.0% GLU or 0.1% SCB in different buffered pH conditions (pH 5.0 and 8.0) and incubated for additional 2 h. The fold differences are presented in comparison with the transcripts of mycelia cultivated by 24 h in Pontecorvo's enriched medium (fold change = 1). Error bars indicate \pm SEM from three independent biological replicates. Equal letters denote no statistical difference ($P < 0.05$).

3.3. In silico analysis of the 5' upstream regions

To obtain additional information on the transcriptional regulation of the genes of interest, a search for putative PacC- and CreA-binding sites within the 5' UP regions was performed (Table 2). Nonetheless, we should consider that these regions vary in length (242 to 1618) and hence not all motifs might be detected. The 5'-GCCARG-3' PacC-binding consensus [28,29] was found in all genes, except for *egl3*, although its expression is coordinately induced with the other hydrolytic enzyme encoding genes. The search for the 5'-SYGGRG-3' CreA-binding motif [30] revealed the presence of this *cis* element in all genes, except for *creA* itself.

3.4. DNA pull-down assay

The pull-down assay employing the GST-tagged fusion proteins obtained DNA fragments corresponding to several *H. grisea* genes 5' UP regions (Fig. 3). The pull-down assay with the GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ fusion protein as bait recovered promoter regions of all the hydrolytic genes. This was also verified for the *pacC* 5' UP region and indicates that CreA is capable to bind *in vitro* to these sequences. The presence of the 5'-SYGGRG-3' binding motif (Table 2) in all the studied sequences and the pull-down data support a possible role of CreA in these genes regulation. As expected, GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ was not able to bind to its own 5' UP sequence, since it does not present a 5'-SYGGRG-3' motif. However, the *creA* 5' UP known region is only 242 bp in length, so it is possible that there are CreA-binding motifs upstream of this fragment.

The employment of a second fusion protein as bait (GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾) also permitted the rescue of promoters from several hydrolase genes (Fig. 3), suggesting that PacC might play a role in their regulation. Exceptions were observed for *creA* and *egl3*. The analysis of the short known *creA* 5' UP sequence

Table 2
Putative PacC- and CreA-binding sites within 5' UP regions of *H. grisea* genes.

Gene	Length of known 5' UP region (bp)	PacC-binding sites 5'-GCCARG-3'	CreA-binding sites 5'-SYGGRG-3'
<i>cbh1.1</i>	1618	4	13
<i>cbh1.2</i>	1158	3	9
<i>egl1</i>	562	2	6
<i>egl2</i>	1277	1	4
<i>egl3</i>	607	-	4
<i>egl4</i>	849	1	5
<i>bgl4</i>	288	1	1
<i>xyn1</i>	1020	1	7
<i>pacC</i>	630	8	4
<i>creA</i>	242	1	-

revealed a putative PacC-binding site (5'-GCCAGG-3'), although, interestingly, its recovery in the pull-down assay was not possible. The *egl3* promoter fragment was also not pulled-down, since it does not contain any PacC-binding site. Nonetheless, the *creA* and *egl3* transcript profiles were clearly influenced by culture medium pH (Table 1).

Although the pull-down analyses did not provide the information of which sites were occupied by the GST-tagged proteins, the DNA-binding properties of recombinant PacC and CreA DBDs were clearly demonstrated and confirmed by the negative control assays employing only purified GST.

3.5. EMSA analysis on *pacC* promoter

In order to further investigate the possibility of PacC self-regulation, its possible role in *creA* transcription regulation and also the possible participation of CreA in PacC regulation, EMSAs were carried out with fluorescent-labeled probes (Fig. 4A) and the GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ and GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ fusion proteins. EMSA analyses of *pacC* 5'UP region revealed that PacC DBD was able to bind in a specific manner to all the five motifs tested (Fig. 4B). For probe 4, there was an apparent difference in the intensity of the complexes formed on the two distinct binding sites. PacC preferentially bound to site 2, although two DNA-binding complexes were formed. The

employment of a competitor oligonucleotide, in which site 2 was mutated, abolished the higher shift, thus confirming the specificity of the binding to site 1. This fact is in accordance to the observation that a T nucleotide immediately preceding the 5'-GCCAAG-3' motif enhances the binding efficiency to this site in the *A. nidulans ipnA* gene promoter [29]. A T nucleotide preceding site 2 in probe 4 was also observed (Fig. 4A).

The CreA DBD bound to three out of the four tested sites. The initial occurrence of one DNA-protein complex formed by probe 1 and GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ (Fig. 4B) suggested that there was binding to only one of the possible CreA-binding sites. However, when non-labeled mutated probes were used as competitors, all the three sites were found to be important for the complex formation. A competitor oligonucleotide with an A substituting the third and fourth Gs in all the 5'-SYGGRG-3' motifs did not impair the complex formation, indicating the specificity of ligation to one of the sites. Nonetheless, the importance of all the three sites for the complex formation was accessed by using different versions of the competitors: G to A substitutions in sites 1, 3 or 4 individually; or in a combination of sites, 1 and 3, 3 and 4 or 1 and 4, thus covering all the possible configurations (data not shown). GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ did not bind to the only CreA motif found in probe 2 (Fig. 4B).

3.6. EMSA analysis on *creA* promoter

GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ was not able to form a complex with probe 5, which comprises the 5'-GCCAGG-3' PacC-binding site in the *creA* 5' UP sequence (Fig. 4C), thus explaining why it did not rescue the *creA* DNA fragment in the pull-down assay (Fig. 3).

3.7. EMSA competition analysis

For probe 1 (Fig. 4A), the region located between positions -215 and -173 of the *pacC* promoter contains three CreA-binding sites, one of them (site 3) overlaps with a PacC motif (site 2). This observation motivated a binding assay with probe 1 using simultaneously both recombinant proteins (Fig. 4D). It is remarkable that PacC displaced the CreA-binding, clearly demonstrating that both proteins compete with each other for the overlapping motifs.

4. Discussion

Adaptation to different environmental conditions, such as the availability of carbon sources and changes in pH, is a crucial challenge to microorganism survival and proliferation. In most situations, this adaptation requires the modulation of gene expression, leading to changes in metabolic pathways, or to the synthesis of exported molecules that could, in turn, modify the environment. The regulation of extracellular hydrolytic enzyme production takes part in this process. The presence of simple and readily metabolizable carbon sources triggers a mechanism known as glucose repression, carbon repression or carbon catabolic repression (CRR)

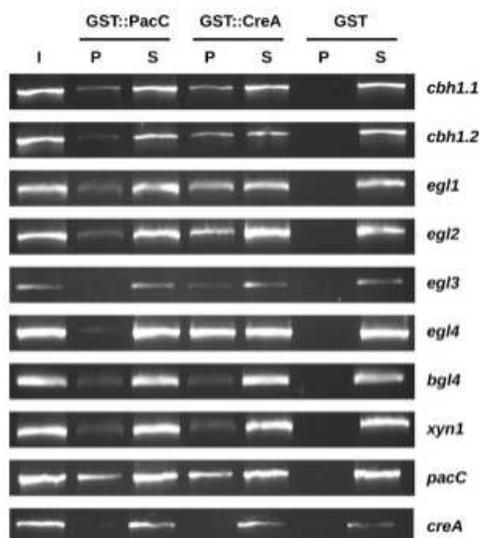


Fig. 3. *In vitro* pull-down assays for PacC and CreA-binding to *H. grisea* genes 5' UP regions. Columns are indicated as follows: (I) input DNA before pull-down; (P) recovered DNA from pulled-down pellets; (S) recovered DNA from supernatants.

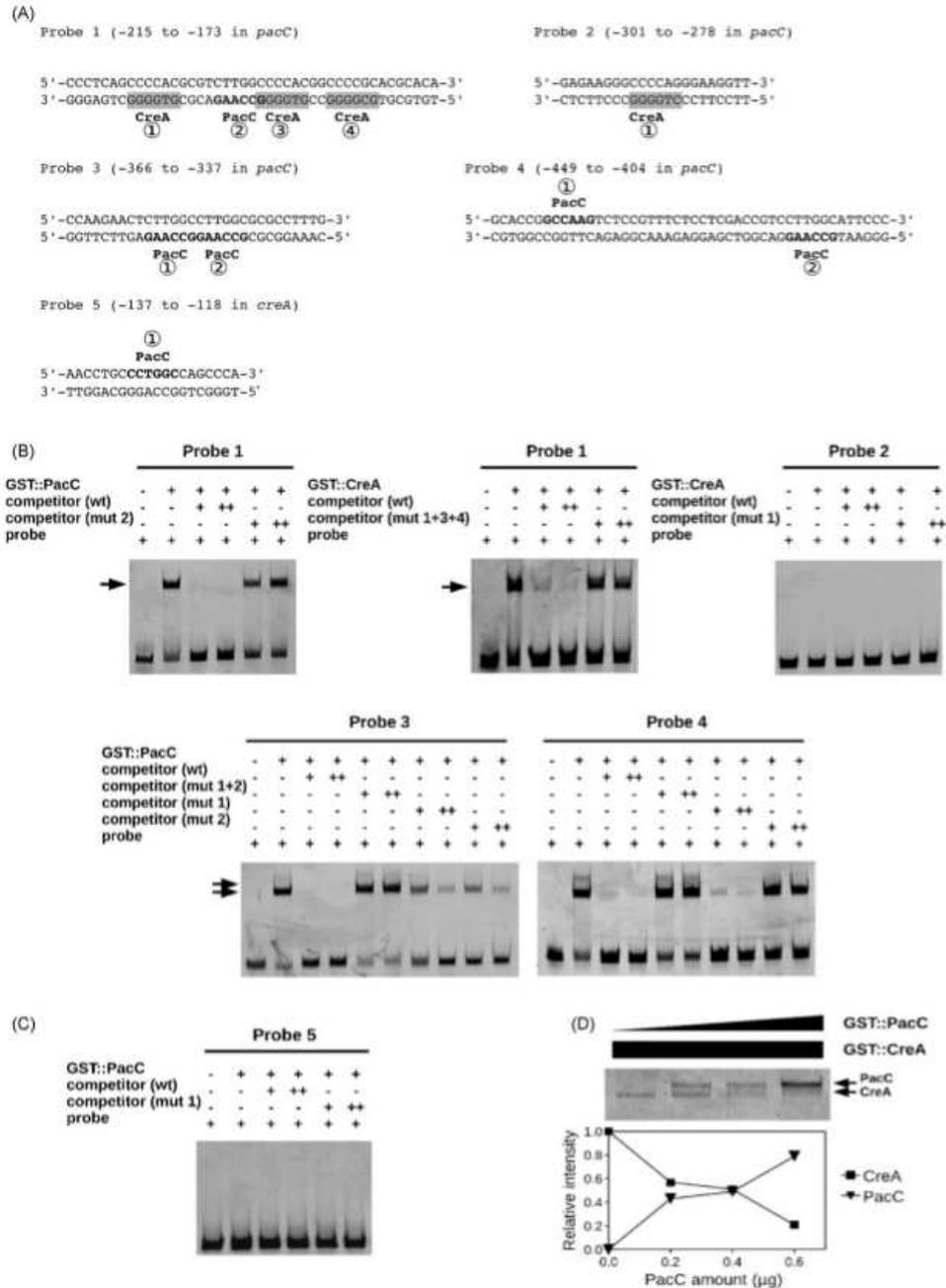


Fig. 4. EMSA analyses of *pacC* and *creA* 5' UP regions. (A) Probes sequences. The binding sites were numbered and represented in bold for PacC or shaded for CreA. Probes 1–4 are located within the *pacC* regulatory sequence, while probe 5 corresponds to part of the *creA* 5' UP region. Probes positions are relative to the translation initiation codon (ATG). EMSAs were carried out on native 8% polyacrilamide gels with 0.5 µg of GST::PacC⁽⁸¹⁻²⁰⁰⁾ or GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾, and *pacC* (B) or *creA* (C) fluorescent probes. Non-labeled wild type (wt) and mutated (mut) probes were used as specific competitors in 100- and 200-fold molar excess. The mutated sites are indicated according to the sites numbering in (A). Mutations that impair PacC-binding were performed by inserting a T in the positions occupied by the second C and the fourth A in the 5'-GCCARG-3' motif [29]. In turn, to mutate CreA-binding sites, an A was chosen to replace the third and fourth Gs in the 5'-SYGGRG-3' motif [30]. Arrows indicate the formed DNA–protein complexes. The binding specificity was evaluated by the capacity of the non-labeled competitors to impair the complexes visualization. (D) Competition assay on *pacC* probe 1 was accomplished on native 15% gel with 0.5 µg of GST::CreA⁽⁵¹⁻¹³⁰⁾ and increasing amounts of GST::PacC⁽⁸¹⁻²¹⁰⁾ (0, 0.2, 0.4 and 0.6 µg). Relative intensities DNA–protein complexes were estimated by densitometric analysis.

[34], CRR is mediated by the CreA/CREI transcription repressor which down-regulates several glycosyl hydrolase genes in *Trichoderma reesei* and *Aspegilli* [35–37]. Additionally, the self-regulated PacC system, which is responsible for pH-dependent transcriptional regulation [28], participates not only in the synthesis control of permeases and metabolites [38–40], but also of extracellular enzymes, such as hemicellulases [41,42].

To date, little was known about the regulation of *H. grisea* hydrolytic enzyme genes. Our group had previously demonstrated that *cbh1.1* and *cbh1.2* are subject to induction by complex carbon sources such as ball-milled straw and sugarcane bagasse [20,21]. A northern blot study focused a time-course analysis of cellulase transcripts accumulation and revealed that *egl1*, *egl2*, *egl3*, *egl4* and *exo1* (*cbh1.2*) are highly induced by microcrystalline cellulose (Avicel) [23]. We have also shown by northern blot analysis the early presence (6 h) of *cbh1.1* mRNA when mycelium was induced with sugarcane bagasse as the sole carbon source, whereas no transcript could be detected when glucose was used [15]. However, a refined quantitative approach for *H. grisea* transcriptional regulation studies had not yet been performed.

In the present study, a 0.5–18 h cultivation time-course analysis of glycosyl hydrolase transcripts accumulation was performed by qRT-PCR (Table 1). Our data reinforce not only the inducing properties of complex carbon sources and alkaline pH, but also shed some light to the underlying mechanism of induction. The peak of mRNA accumulation for most of the hydrolase encoding genes was in 2 h, with sugarcane bagasse as carbon source, in an alkaline milieu. This indicates a fast and parallel induction response for the majority of the studied genes. Such a response had already been observed for *T. reesei* [43] and *Polyporus arcularius* cellulase transcripts [44]. The present data may also indicate that *H. grisea* gene induction detected by northern blot studies in longer periods of cultivation could be due to *de novo* synthesis. In this respect, we intend to investigate *H. grisea* cellulase transcripts turnover in future studies.

There were some differences between the expression profiles observed in this work and the results obtained from previous expression analyses [21,23]. These may be explained by differences in the chemical and physical structures of the carbon sources used. Our present data, taken together with another study from our group [15], indicate steam-exploded sugarcane bagasse as the most potent inducer of *H. grisea* hydrolase genes.

The transcription analysis presented here (Table 1) clearly demonstrate that *H. grisea* cellulolytic system is indeed subject to glucose repression, as it was previously suggested [15,21,22]. Furthermore, CreA is indicated as an effector of this mechanism, since *creA* mRNA accumulation kinetics is opposite to the accumulation kinetics of the hydrolase transcripts when the fungus is grown in glucose. This is reinforced by the demonstration, in the pull-down assay (Fig. 3), that the CreA-DNA-binding domain interacts with the promoters of the hydrolase genes.

Nonetheless, using glucose as the sole carbon source did not lead to a complete shut down of the hydrolase gene transcription (Table 1). In this view, a mere de-repression mechanism can be ruled out. *H. grisea* also seems to require a lignocellulolytic system inducer, as previously described for fungi such as *T. reesei* [5]. Sophorose is a strong cellulase inducer [36] and it is assumed to be produced from cellobiose by beta-glucosidase activities [45]. We had previously demonstrated that low amounts of cellobiose induce *H. grisea cbh1.1* and *cbh1.2* expression [21]. Our data on *bgl4* expression profile (Table 1) support the assumption that beta-glucosidase production can be related to the generation of soluble inducers for *H. grisea* cellulase encoding genes, since it presented the earliest peak in mRNA accumulation and maintained the high expression level throughout the cultivation period.

The high expression level of *cbh1.2* found in this study is remarkable. An induction superior to 10,000-fold was observed (Table 1). CBH1.2 is the major secreted protein when *H. grisea* is grown in cellulase induction conditions [17]. This renders the *cbh1.2* promoter an interesting candidate for further structural characterization and biotechnological application.

Culture medium pH was clearly a key factor in the accumulation of *H. grisea* hydrolase transcripts. A pH effect has also been observed in the regulation of fungal xylanase encoding genes expression [41,46,47]. Since the literature indicates PacC self-regulation in several fungi [28,31–33] and considering that culture medium pH increased in the 24 h pre-cultivation period, we infer that *pacC* transcription reached a steady-state level prior to the transferring to the induction media. This could explain the maintenance of the transcript level in the experimental conditions (Table 1).

The influence of pH on *H. grisea* glycosyl hydrolase gene regulation was corroborated by the observed interaction of the GST::PacC fusion protein with the 5' UP regions (Fig. 3). This is the first report on the involvement of a pH-mediated regulatory system on fungal cellobiohydrolase encoding genes (*cbh1.1* and *cbh1.2*). Sugarcane bagasse in an alkaline milieu strongly induced expression of the studied genes, except for *egl4*, whose mRNA preferably accumulated in acidic conditions (Table 1). This observation could be related to the PacC dual regulatory role [41]. In this view, PacC is an activator for the majority of *H. grisea* hydrolase genes and a repressor for *egl4*. In the future, once we have solved the problems regarding the efficient and stable transformation of *H. grisea* by traditional gene transferring methods, the obtaining of *pacC* mutants will be useful to further investigate this regulatory puzzle.

The evidence of an acidic-expressed cellulase gene (*egl4*) strengthens the assumption that besides a large number of genes, their differential expression profiles also contribute to the adaptation to diverse environment conditions.

The influence of acidic pH on *A. nidulans creA* expression through a PacC-independent mechanism was reported [48]. Our findings indicate that this may also be true for *H. grisea creA* regulation. Despite the presence of a 5'-GCCARG-3' motif in the *creA* 5' UP region, PacC fusion protein failed in binding to it. The glucose consumption kinetics (Fig. 1) renders a plausible explanation for the higher accumulation of *creA* transcript in an acidic environment (Table 1 and Fig. 2). Alkaline pH led to a faster glucose consumption, therefore depleting this sugar from the culture medium. Since glucose is a *creA* inducer [34], the reduction of *creA* mRNA accumulation in alkaline pH is expected.

On the other hand, we could suggest a direct repression of *pacC* expression mediated by CreA. In our work, genes encoding the two transcription factors presented opposite patterns of expression during the acidic to alkaline shift (Fig. 2). Furthermore, CreA DBD bound directly to the *pacC* promoter (Fig. 3) and both transcription factors were shown to compete for binding to overlapping sites (Fig. 4). The CreA-mediated glucose repression observed on another transcription factor expression, the *A. nidulans* XlnR xylanase activator, was already demonstrated [49].

In conclusion, our data show that *H. grisea* cellulase and a xylanase encoding genes are strongly induced by sugarcane bagasse and alkaline pH. PacC seems to be the pH response effector. The observed glucose repression is possibly attributed to the CreA regulator and it is capable of overriding the alkaline pH inducing property. We have evidence that CreA is also involved in *pacC* repression, thus establishing a regulatory crosstalk. This is the most detailed study of *H. grisea* glycosyl hydrolase transcriptional regulation described to date. Taken together, these data suggest that CreA may act as a regulator of transcription factors involved in glycosyl hydrolases production. These data will be useful for optimizing *H. grisea* vegetal biomass conversion for industrial purposes.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq and MCT/FINEP - Brazil. Authors are grateful to Dr. David John Bertioli (UnB) for critically reviewing the manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi: 10.1016/j.enzmictec.2010.08.007.

References

- [1] Alper H, Stephanopoulos G. Engineering for biofuels: exploiting innate microbial capacity or importing biosynthetic potential? *Nat Rev Microbiol* 2009;7:715–23.
- [2] Carroll A, Somerville C. Cellulosic biofuels. *Annu Rev Plant Biol* 2009;60:165–82.
- [3] Hahn-Hägerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund MF, Lidén G, Zacchi G. Bio-ethanol—the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends Biotechnol* 2006;24:549–56.
- [4] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature* 2008;454:841–5.
- [5] Kubicek CP, Mikus M, Schuster A, Schmol M, Seiboth B. Metabolic engineering strategies for the improvement of cellulase production by *Hypocrea jecorina*. *Biotechnol Biofuels* 2009;2:19.
- [6] Margeot A, Hahn-Hägerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Curr Opin Biotechnol* 2009;20:372–80.
- [7] Pala H, Mota M, Gama FM. Enzymatic versus chemical deinking of non-impact ink printed paper. *J Biotechnol* 2004;108:79–89.
- [8] Anish R, Rahman MS, Rao M. Application of cellulases from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp. in biopolishing of denims. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:48–56.
- [9] Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv* 2000;18:355–83.
- [10] Viikari L, Alapuranen M, Puranen T, Vehmaanperä J, Siika-Aho M. Thermostable enzymes in lignocellulose hydrolysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2007;108:121–45.
- [11] Heinzelman P, Snow CD, Wu L, Nguyen C, Villalobos A, Govindarajan S, et al. A family of thermostable fungal cellulases created by structure-guided recombination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:5610–5.
- [12] Zimmermann AL, Terenzi HF, Jorge JA. Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Biochim Biophys Acta* 1990;1036:41–6.
- [13] Campos L, Felix CR. Purification, Characterization of a Glucoamylase from *Humicola grisea*. *Appl Environ Microbiol* 1995;61:2436–8.
- [14] Ferreira-Filho EX. Purification and characterization of a beta-glucosidase from solid-state cultures of *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Can J Microbiol* 1996;42:1–5.
- [15] De-Paula EH, Ramos LP, Azevedo MO. The potential of *Humicola grisea* var. *thermoidea* for bioconversion of sugarcane bagasse. *Bioresour Technol* 1999;68:35–41.
- [16] Da-Silva R, Yin DK, Park YK. Application of thermostable xylanases from *Humicola* sp. for pulp improvement. *J Ferment Bioeng* 1994;77:109–11.
- [17] De-Paula EH, Poças-Fonseca MJ, Azevedo MO. The product of *Humicola grisea* var. *thermoidea* *cbh1.2* gene is the major expressed protein under induction by lignocellulosic residues. *W J Microbiol Biotechnol* 2003;19:631–5.
- [18] Rossi MS, Poças-Fonseca MJ, Azevedo MO. Molecular biology of fungal biodegradation: cellulolytic activity over agricultural wastes. In: Kulhad RC, Singh A, editors. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects*. I.K. International; 2007. p. 97–106.
- [19] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, Uozumi T. Molecular cloning and expression of the novel fungal beta-glucosidase genes from *Humicola grisea* and *Trichoderma reesei*. *J Biochem* 1999;125:728–36.
- [20] Poças-Fonseca MJ, Lima BD, Brigido MM, Silva-Pereira I, Felipe MSS, Radford A, et al. *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* 1997;43:115–20.
- [21] Poças-Fonseca MJ, Silva-Pereira I, Rocha BB, Azevedo M, de O. Substrate-dependent differential expression of *Humicola grisea* var. *thermoidea* cellobiohydrolase genes. *Can J Microbiol* 2000;46:749–52.
- [22] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, Uozumi T. 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* 1998;62:2364–70.
- [23] Takashima S, Nakamura A, Hidaka M, Masaki H, Uozumi T. Isolation and characterization of the actin gene from the cellulolytic fungus *Humicola grisea* and analysis of transcription levels of actin and cellulase genes. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999;63:1091–5.
- [24] Pontecorvo G, Roper JA, Hemmons LM, MacDonald KD, Bufton AWJ. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv Genet* 1953;5:141–238.
- [25] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- [26] Antal Z, Rasche C, Fèvre M, Bruel C. Single oligonucleotide nested PCR: a rapid method for the isolation of genes and their flanking regions from expressed sequence tags. *Curr Genet* 2004;46:240–6.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 2001;25:402–8.
- [28] Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, et al. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* 1995;14:779–90.
- [29] Espeso EA, Tilburn J, Sánchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HNJ, et al. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J Mol Biol* 1997;274:466–80.
- [30] Cubero B, Scaccocchio C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J* 1994;13:407–15.
- [31] MacCabe AP, Van den Hombergh JP, Tilburn J, Arst HNJ, Visser J. Identification, cloning and analysis of the *Aspergillus niger* gene *pacC*, a wide domain regulatory gene responsive to ambient pH. *Mol Gen Genet* 1996;250:367–74.
- [32] Rollins JA, Dickman MB. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC*/RMT1 homolog. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:75–81.
- [33] You B, Choquer M, Chung K. The *Colletotrichum acutatum* gene encoding a putative pH-responsive transcription regulator is a key virulence determinant during fungal pathogenesis on citrus. *Mol Plant Microbe Interact* 2007;20:1149–60.
- [34] Ruijter GJ, Visser J. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol Lett* 1997;151:103–14.
- [35] Piñaga F, Fernández-Espinar MT, Vallés S, Ramón D. Xylanase production in *Aspergillus nidulans*: induction and carbon catabolite repression. *FEMS Microbiol Lett* 1993;115:319–42.
- [36] Ilmén M, Saloheimo A, Onnela ML, Penttilä ME. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl Environ Microbiol* 1997;63:1298–306.
- [37] Ruijter GJ, Vanhanen SA, Gielkens MM, van de Vondervoort PJ, Visser J. Isolation of *Aspergillus niger* *creA* mutants and effects of the mutations on expression of arabinases and L-arabinose catabolic enzymes. *Microbiology* 1997;143(Pt 9):2991–8.
- [38] Eisendle M, Oberegger H, Buttlinger R, Illmer P, Haas H. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* 2004;3:561–3.
- [39] Then Bergh K, Brakhage AA. Regulation of the *Aspergillus nidulans* penicillin biosynthesis gene *actA* (*pcbAB*) by amino acids: implication for involvement of transcription factor PACC. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:843–9.
- [40] Schmitt EK, Kempken R, Kück U. Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acetamonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol Genet Genomics* 2001;265:508–18.
- [41] MacCabe AP, Orejas M, Pérez-González JA, Ramón D. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. *J Bacteriol* 1998;180:1331–3.
- [42] Gielkens M, González-Candelas L, Sánchez-Torres P, van de Vondervoort P, de Graaff L, Visser J, et al. The *ahbB* gene encoding the major alpha-L-arabinofuranosidase of *Aspergillus nidulans*: nucleotide sequence, regulation and construction of a disrupted strain. *Microbiology* 1999;145(Pt 3):735–41.
- [43] Verbeke J, Coutinho P, Mathis H, Quenot A, Recoré E, Asther M, et al. Transcriptional profiling of cellulase and expansin-related genes in a hypercellulolytic *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Lett* 2009;31:1399–405.
- [44] Ohnishi Y, Nagase M, Ichiyangi T, Kitamoto Y, Aimi T. Transcriptional regulation of two cellobiohydrolase encoding genes (*cel1* and *cel2*) from the wood-degrading basidiomycete *Polyporus arcularius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;76:1069–78.
- [45] Aro N, Pakula T, Penttilä M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol Rev* 2005;29:719–39.
- [46] Chávez R, Schachter K, Navarro C, Peirano A, Aguirre C, Bull P, et al. Differences in expression of two endoxylanase genes (*xynA* and *xynB*) from *Penicillium purpurosolum*. *Gene* 2002;293:161–8.
- [47] Tanaka H, Muguruma M, Ohta K. Purification and properties of a family-10 xylanase from *Aureobasidium pullulans* ATCC 20524 and characterization of the encoding gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 2006;70:202–11.
- [48] Vautard-Mey G, Fèvre M. Carbon and pH modulate the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. *Curr Microbiol* 2003;46:146–50.
- [49] Tamayo EN, Villanueva A, Hasper AA, de Graaff LH, Ramón D, Orejas M. *CreA* mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 2008;45:984–93.

Capítulo de livro I

Chapter 9

**PH-RELATED TRANSCRIPTIONAL REGULATION
OF LIGNOCELLULOLYTIC ENZYMES AND
VIRULENCE FACTORS GENES IN FUNGI**

Marcio José Poças-Fonseca^{1,}, Thiago Machado Mello-de-Sousa² and
Sérgio Martin Aguiar²*

¹Vienna University of Technology (TU Wien), Institute of Chemical Engineering, Gene
Technology Group, Vienna, Austria;

²Department of Cellular Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasilia.
70.910-900, Brasilia-DF. Brazil.

ABSTRACT

In several filamentous fungi and yeasts, the PacC zinc-finger transcription factor regulates gene expression in response to alkaline external pH. This response is dependent on a signal transduction cascade, in which the products of six *pal* genes take part. In the vast majority of species, PacC functional activation involves a two-step proteolytic process. Most recently, the participation of the multivesicular body complex and of the 26S proteasome was implicated in this activation. Functional PacC is capable of activating the transcription of genes which should be preferably expressed at alkaline pH, and to repress those which should be transcribed preferentially at acidic pH. The PacC system influences the production of plasma membrane permeases, exported enzymes, secondary metabolites - such as antibiotics and mycotoxins - and the pathogenicity against plants and humans. In this work, we summarize the most recent information concerning the molecular genetics of the PacC regulatory mechanism. Some unpublished data on the PacC effect over cellulases production by the thermophilic mould *Hemicella grisea* var. *thermoidea*, and on the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* *pacC* gene structure and expression, are also presented.

Correspondence concerning this article should be addressed to: Marcio José Poças-Fonseca, Vienna University of Technology (TU Wien), Institute of Chemical Engineering, Gene Technology Group, Getreidemarkt 9/166/5/2 A-1060, Vienna, Austria

Capítulo de livro II (submetido)



Dr. T. Satyanarayana
Professor

Department of Microbiology
UNIVERSITY OF DELHI SOUTH CAMPUS
BENITO JUAREZ ROAD, NEW DELHI -110021, (INDIA)

Phone: 91-11-24112008 (D)

Fax: 91-11-24115270

email: tsnarayana@gmail.com, tsnarayana@vsnl.net

Prof. Marcio José Poças-Fonseca
Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences
Darcy Ribeiro University Campus
Brasilia-DF, 70.910-900, Brazil

March 8, 2012

Dear Prof. Marcio José Poças-Fonseca,

Your chapter entitled '**The cellulolytic system of thermophilic fungi and actinomycetes: structure, regulation, and biotechnological applications**' submitted by you and your students (Robson Willian de Melo Matos and Thiago Machado Mello-de-Sousa) has been accepted for publication in the book '**Thermophilic Microbes in Environmental and Industrial Biotechnology**'. This book will be published by December 2012 or early 2013.

With best regards,

Sincerely,

(T. Satyanarayana)

THE LIGNOCELLULOLYTIC SYSTEM OF THERMOPHILIC FUNGI AND ACTINOMYCETES: STRUCTURE, REGULATION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

Marcio José Poças-Fonseca^{*}, Robson Willian de Melo Matos and
Thiago Machado Mello-de-Sousa.

Department of Genetics and Morphology. Institute of Biological Sciences.

Darcy Ribeiro University Campus. Brasilia-DF, 70.910-900. Brazil

* Corresponding author:

Phone: + 55 (61) 3107-3090; 3107-2916. Fax: +55 (61) 3107-2923

E-mail: mpossas@unb.br

Contents	
Introduction.....	2
Historical and Applications.....	2
The Fungal Cellulolytic System.....	5
Critical Review and Analysis of Fungi and Actinomycetes Thermophilic Enzymes Involved in Lignocellulose Degradation.....	7
Filamentous Fungi and Yeasts.....	7
Actinobacteria and Actinomycetes.....	35
Future Perspectives and Conclusions.....	44
References.....	46

Abstract

Thermophilic fungi and actinomycetes have been extensively studied in vegetal biomass bioconversion processes for the formulation of industrial enzymatic pools and as gene donors for the heterologous expression of thermostable enzymes. The production of second generation biofuels and the application in industries such as the textiles are of particular interest. In this chapter, we have reviewed the gene structure, gene regulation, biochemical properties and biotechnological applications of lignocellulolytic enzymes, and other potential industrial hydrolases of thermophilic fungi and actinobacteria. Besides *Humicola grisea* var. *thermoidea*, the main focus of our investigations for several years have been on fungi such as *Humicola insolens*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida peltata*, *Chaetomium thermophilum*, *Coprinopsis cinerea*, *Ganoderma colossum*, *Malbranchea pulchella* var. *sulphurea*, *Melanocarpus albomyces*, *Rhizomucor pusillus*, *Myceliophthora thermophila*, *Myriococcum thermophilum*, *Penicillium duponti*, *Sporotrichum pulverulentum*, *Sporotrichum thermophile*, *Stilbella thermophila*, **Talaromyces emersonii**, *Thermoascus aurantiacus*, *Thermomyces lanuginosus* and *Thielavia terrestris*. Amongst the actinomycetes, we explored *Acidothermus cellulolyticus*, *Cellulomonas* spp., *Streptomyces* spp., *Thermobifida fusca* and *Thermomonospora curvata*.

Keywords: Fungi, actinobacteria, thermophilic hydrolytic enzymes, lignocellulosic residues, biomass conversion.

Capítulo de livro III (submetido)



VIJAI KUMAR GUPTA, Ph.D.
FHAS, FICCB, FSAB, YSA-2009 & 2011
Molecular Glycobiotechnology Unit
Department of Biochemistry
School of Natural Sciences
National University of Ireland Galway, Ireland,
E-mail: viyajfd@gmail.com, viyai.gupta@nuigalway.ie
Phone: 00353 86 200 1820

Ref. No. NUIG/MGB/VKG/04-19/12

Dated: 12.04.2012

TO WHOM IT MAY CONCERN

To,
Prof. Marcio José Poças Fonseca,
Departamento de Genética e Morfologia,
Instituto de Ciências Biológicas,
Campus Universitário Darcy Ribeiro,
Universidade de Brasília
BRAZIL

Dear Prof. Marcio José Poças Fonseca,

I am pleased to inform you that following of your book chapter:-

1. **FILAMENTOUS FUNGI CELLOBIOHYDROLASE GENES IN BIOTECHNOLOGY** by Marcio José Poças Fonseca et al., (2012). *In: Applications of Microbial Genes in Enzyme Technology*, V.K. Gupta, M. Tuohy, G.D. Sharma, and S. Gaur (Eds.) (2012). Nova Science Publishers, USA.

-has been accepted for publication in our forthcoming edited book on "**Applications of Microbial Genes in Enzyme Technology**" of Nova Science Publishers, USA.

Thanks and regards,

(Vijai Kumar Gupta)

**FILAMENTOUS FUNGI CELLOBIOHYDROLASE GENES
IN BIOTECHNOLOGY**

Marcio José Poças-Fonseca*, Fabiana Brandão Alves Silva, Robson
Willian de Melo Matos and Thiago Machado Mello-de-Sousa.

Department of Genetics and Morphology. Institute of Biological
Sciences, Building E, ET 18/25. Darcy Ribeiro University Campus.
Brasilia-DF, 70.910-900. Brazil

* Corresponding author:

Phone: + 55 (61) 3107-3090; 3107-2916. Fax: +55 (61) 3107-2923

E-mail: mpossas@unb.br

ABSTRACT

Filamentous fungi cellobiohydrolase genes have been extensively studied aiming the high-level heterologous expression of optimized enzymes which could be employed for vegetal residues conversion in useful products at the industrial level. The generation of biofuels, and of biostoning or biopolishing agents for the textile industry, are of particular interest. In this chapter, we review the main aspects of fungal cellobiohydrolase genes structure and regulation, as well as the most promising studies on their biotechnological applications.

Keywords: filamentous fungi, cellobiohydrolase genes, heterologous expression, biomass conversion, biotechnological applications.

Introduction

Particular interest in cellulolytic microorganisms began during World War II, in the Salomon Islands (Southeast Pacific), when the troops' clothes, tents and other cellulosic fabrics were often degraded by the fungus latter classified as *Trichoderma reesei*. Soon, what was initially seen as an economical problem became a promising scientific research field, aiming the conversion of cellulose in products such as recycled paper, animal feed and plant fertilizers. In the textile industry, cellulases have been employed in the formulation of detergents and in the biostoning and biopolishing processes.

The crude oil crises in the mid-1970s draw the attention to the studies on alternative and renewable energy sources. Second generation bioethanol production from lignocellulosic residues is at the moment the main driving force for cellulolytic microorganisms research.

Artigos não diretamente relacionados com o trabalho da tese

Derengowski, L. S.; Souza-Silva, C. D.; Braz, S. V.; **Mello-de-Sousa, T. M.**; Bão, S. N.; Kyaw, C. M. & Silva-Pereira I (2009). Antimicrobial effect of farnesol, a *Candida albicans* quorum sensing molecule, on *Paracoccidioides brasiliensis* growth and morphogenesis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 8, 13.

Paes, H. C*.; **Mello-de-Sousa, T. M.***; Fernandes, L.; de Melo Teixeira, M.; de Oliveira Melo, R.; da Silveira Derengowski, L.; Torres, F. A. G. & Felipe, M. S. S. (2011). Characterisation of the heat shock factor of the human thermodimorphic pathogen *Paracoccidioides lutzii*. *Fungal Genet Biol*, 48, 947-955.

***Ambos os autores contribuíram igualmente para este trabalho.**

Pereira, L. O.; Bicalho, L. S.; da Paz Lopes, M. C.; **Mello-de-Sousa, T. M.**; Bão, S. N.; de Fátima Menezes Almeida Santos, M. & Fonseca, M. J. P. (2009). DNA damage and apoptosis induced by *Pteridium aquilinum* aqueous extract in the oral cell lines HSG and OSCC-3. *J Oral Pathol Med*, 38, 441-447.