

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC - CNPEM

Projeto: Estudo da expressão de genes de *Aspergillus niger* relacionados à degradação de biomassa vegetal

Pesquisador: Dra. Juliana Velasco de Castro Oliveira – PPB - CTBE

A dependência de fontes de combustíveis fósseis bem como a preocupação com o meio ambiente tem gerado mundialmente um grande interesse no desenvolvimento de outras fontes de energia. Neste sentido, o uso de etanol é vantajoso por se tratar de uma fonte inesgotável de energia, além de ser considerada de baixo impacto ambiental. Atualmente, através da fermentação do caldo da cana-de-açúcar, o Brasil é o segundo maior produtor de bioetanol. Entretanto, estudos sugerem que se forem utilizados o bagaço e a palha da cana, o Brasil pode dobrar sua produção, sem a necessidade do aumento de áreas cultiváveis (o que é denominado etanol de segunda geração). No entanto, o uso dessa biomassa apresenta como desafio a degradação da estrutura da parede celular vegetal formada por açúcares complexos, em açúcares mais simples, fermentáveis. Para isso, são necessários diversos tipos de enzimas hidrolíticas (celulases e hemicelulases), que naturalmente são produzidas por uma variedade de microorganismos; dentre eles destaca-se o fungo *Aspergillus niger*, capaz de produzi-las e secretá-las em grandes quantidades. Embora diversos estudos sejam realizados com este microorganismo, ainda não são conhecidos em detalhes seus mecanismos de degradação destes substratos lignocelulósicos.

O gênero *Aspergillus* é um grupo de fungos filamentosos que cresce predominantemente em material em decomposição de plantas ricos em polissacarídeos (celulose, xilose, pectina, etc). Este grupo é formado por mais de 250 espécies, sendo algumas espécies parasitas e outras de interesse industrial, que possuem como características importantes uma boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção protéica. Em particular, de interesse para produção de etanol, há diversos *Aspergillus* que produzem uma grande gama de enzimas que degradam os polissacarídeos presentes na parede celular de plantas, como o *A. niger*, um dos fungos mais utilizados industrialmente e de grande importância biotecnológica.

Em relação aos mecanismos que regulam a produção das enzimas hidrolíticas e degradação da biomassa vegetal, sabe-se que existe um fator de transcrição, denominado XlnR, que é responsável pela ativação da expressão da maioria das celulases e hemicelulases. Além destas enzimas, também vêm sendo verificado a produção de diversas outras que clivam pectinas (poligalacturonases e liases) em diversos substratos como pectina derivada de beterraba, de maçã

e em uma combinação de ramnose e ácido galacturônico. Entretanto, muitas destas enzimas não são produzidas em meio com açúcares monoméricos (por exemplo, glicose e galactose). Isto porque a presença de carboidratos prontamente metabolizáveis reprime a síntese das enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas, assegurando assim a utilização preferencial da fonte de carbono mais fácil de ser metabolizada. Para a célula isto é benéfico porque a fonte de carbono mais favorável é usada e a energia não é desperdiçada na síntese de outros sistemas catabólicos. Este fenômeno é conhecido por “repressão por carbono” ou “repressão catabólica por carbono”. A principal proteína repressora em *Aspergillus* que regula a repressão catabólica de genes envolvidos em seu metabolismo é a CreA. Surpreendentemente, até o momento, CreA é a única proteína regulatória cujo papel em mediar a repressão ao carbono foi demonstrada, e pouco é conhecido sobre os eventos moleculares envolvidos nesta interação.

Recentemente, a sequência do genoma de *A. niger* foi disponibilizada. Seu genoma contém 14.165 genes e estima-se que mais de 200 estão envolvidos na degradação de polissacarídeos. A disponibilização do genoma deste microorganismo possibilita que estudos mais amplos com o objetivo de elucidar os mecanismos de controle na produção das enzimas hidrolíticas sejam realizados, uma vez que estes mecanismos variam entre os diferentes organismos e substratos onde os estudos são realizados.

O projeto do qual esta proposta de iniciação científica (IC) faz parte tem como objetivo geral analisar por RNA-seq a expressão global dos genes de *A. niger* crescido em meio com bagaço e colmo de cana-de-açúcar como fonte exclusiva de carbono. Os dados serão comparados com os obtidos de seu crescimento na presença de açúcar facilmente assimilável (frutose). Assim espera-se identificar genes ou vias que apresentem padrões de expressão interessantes, como por exemplo, sendo muito expresso apenas na fonte de carbono recalcitrante. Estes genes serão estudados com maior detalhamento através de PCR em tempo real e do estabelecimento de linhagens mutantes nulas, com o objetivo de verificar a importância dos mesmos na hidrólise enzimática da biomassa derivada da cana-de-açúcar. Os dados que estão sendo gerados neste projeto permitirão um melhor entendimento do processo de degradação de biomassas. Todo conhecimento em âmbito molecular resultante refletirá em novas perspectivas para o desenvolvimento de coquetéis enzimáticos mais eficazes e a custos mais baixos, que poderá possibilitar a produção de etanol de segunda geração em escala industrial.

Até o momento, como resultado deste projeto financiado pela FAPESP (Auxílio à Pesquisa Regular: 2011/08945-9), já temos as análises preliminares dos dados de RNA-seq. Já foi possível verificar genes que não estão identificados no genoma e sem homologia com outros depositados nos bancos de dados, e que apresentaram uma hiper-expressão na condição de crescimento em bagaço. Também identificamos fatores de transcrição putativos, sendo expressos apenas nesta

condição. Dando continuidade ao projeto, espera-se que o aluno de iniciação científica PIBIC se envolva na validação dos dados obtidos. Além disso, vamos verificar a expressão de genes de interesse em outras fontes de carbono, e também em uma cepa de *A.niger* que possui o regulador *creA* deletado, assim poderemos verificar se os genes selecionados estão sujeitos à repressão catabólica. Assim, a proposta é que o aluno faça a validação e o estudo por PCR em tempo real de 10 genes de interesse em diferentes fontes de carbono (avicel, xilano, xilose, CMC, bagaço etc), na cepa *A. niger* selvagem e na $\Delta creA$, e construa uma linhagem mutante nula do gene que apresentar resultado mais interessante, com a finalidade de gerar *insights* sobre sua funcionalidade e importância. Neste projeto, espera que o aluno de IC desenvolva algumas habilidades e aprenda algumas técnicas e metodologias, tais como:

- (i) Busca de sequência em banco de dados públicos, como o NCBI ou AspGD (*Aspergillus Genome Database*);
- (ii) Manipulação/crescimento de fungos, em meio sólido e líquido, em diferentes fontes de carbono;
- (iii) Extração de RNA e análise de qualidade do mesmo;
- (iv) Tratamento de RNA com DNase;
- (v) Síntese de cDNA;
- (vi) Desenho de oligonucleotídeos para uso em PCR em tempo real, usando *softwares* específicos, como por exemplo, *primer express*;
- (vii) Preparo de PCR em tempo real e análise dos resultados (expressão gênica relativa);
- (viii) Geração de linhagem mutante, com a deleção de gene através da construção de cassete específico.

Embora possa parecer que a quantidade de metodologias a ser aprendida é grande, todas elas já são bem estabelecidas e são realizadas rotineiramente em nosso laboratório. Todos os integrantes do grupo poderão auxiliá-lo nas inúmeras etapas do projeto. Além disso, as ferramentas que ele irá aprender poderão ser utilizadas em outros projetos ou linhas de pesquisas voltadas à biologia molecular, que ele venha a desempenhar no futuro.