

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC – CNPEM

Análise da co-regulação transcricional e identificação de genes de interesse biotecnológico em *Trichoderma reesei*

Pesquisadora: Dr^a. Juliana Velasco de Castro Oliveira

Co-orientador: Ms. Gustavo P. Borin (Doutorando)

Os biocombustíveis são uma alternativa promissora para substituir os combustíveis fósseis por serem ambientalmente mais vantajosos e promoverem economias locais (Banerjee *et al.*, 2010; Hasunuma & Kondo, 2012). No Brasil, o etanol produzido a partir da sacarose da cana-de-açúcar é denominado de primeira geração (1G) e é obtido através da fermentação do caldo extraído da cana pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Amorim *et al.*, 2011). O Brasil possui grande potencial para ser o maior produtor de etanol do mundo, por sua grande disponibilidade de matéria-prima e tecnologia de produção já consolidada (Leite *et al.*, 2009; Triana, 2011). Além disso, estudos sugerem que se o bagaço gerado como subproduto no processo de produção de etanol e açúcar e a palha de cana fossem convertidos no que é conhecido por etanol de segunda geração (ou lignocelulósico), haveria um aumento significativo (40%) na produção deste biocombustível por hectare (Macedo, 2005; Leite *et al.*, 2009).

O etanol de segunda geração (2G) é obtido através da fermentação dos açúcares liberados da degradação da parede celular vegetal, a qual é realizada por ação de enzimas e proteínas acessórias produzidas e secretadas por microrganismos, dentre eles o fungo filamentosso *Trichoderma reesei* (Lynd *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2014). *T. reesei* é utilizado amplamente na indústria para produção de celulasas e hemicelulasas nativas e tem servido como fungo modelo para estudos da degradação de material lignocelulósico (Shoemaker *et al.*, 1983; Penttilä *et al.*, 1986; Peterson & Nevalainen, 2012).

Neste projeto pretende-se trabalhar com a cepa hipercelulolítica *T. reesei* RUT C30, que se mostrou ser uma das melhores cepas produtoras de celulasas (Eveleigh & Montenecourt, 1979; dos Santos Castro *et al.*, 2014). A análise do genoma de *T. reesei* (Martinez *et al.*, 2008; Le Crom *et al.*, 2009) permitiu a identificação de diversos genes de celulasas (celobiohidrolase, endoglucanase e β -glicosidase) e hemicelulasas (xilanase, arabinofuranosidase, xyloglucanase, mananase) envolvidas na degradação da parede celular vegetal, sendo que as celobiohidrolases e endoglucanases compõem juntas até 90% do número total de enzimas secretadas (Rahman *et al.*, 2009). Adicionalmente no genoma de *T. reesei* também foram identificadas 13 proteínas com atividade auxiliar de seis famílias diferentes (AA1, AA3, AA5, AA6, AA8 e AA9) (Levasseur *et al.*, 2013). Dentre

essas proteínas estão ferroxidases (AA1), GMC (*Glucose-methanol-choline*) oxidoreduções (AA3), uma glioxal oxidase (AA5), uma benzoquinona redutase (AA6), redutases de ferro (AA8) e monooxigenases (AA9). Acredita-se que a ação oxidativa dessas enzimas não seja restrita somente à lignina, mas também a todos os outros componentes da parede vegetal, como celulose, hemicelulose e pectina (Levasseur *et al.*, 2013).

Recentemente, em nosso grupo foi analisado o transcriptoma de *T. reesei* crescido em duas fontes complexas de carbono, colmo e bagaço de cana após 6, 12 e 24 horas de crescimento. Como resultado, foram identificados diversos genes diferencialmente expressos em colmo e bagaço, os quais podem estar relacionados a algum processo celular ativado ou inibido em resposta ao crescimento do fungo nesses substratos lignocelulósicos. Além de vários genes de enzimas com função conhecida na desconstrução da parede vegetal estarem hiper-expressos, também foram identificados genes com perfil de expressão interessante sem função conhecida mas que podem atuar na desconstrução da biomassa. Vários deles foram preditos como sendo enzimas ou proteínas com atividade auxiliar pelo banco de dados específico dbCAN (<http://csbl.bmb.uga.edu/dbCAN/>) e também tiveram um peptídeo sinal predito (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>), sugerindo um papel na degradação da parede.

É proposto ao aluno de iniciação científica PIBIC a construção de cepas mutantes *knockout* de **dois genes** de função desconhecida identificados previamente (Tabela 1) e a análise do crescimento das cepas resultantes em meios contendo diferentes fontes de carbono, como por exemplo, bagaço de cana, CMC, avicel xilano e xilose. Assim, pretendemos avaliar a participação dos genes deletados na resposta do fungo quando exposto à fonte recalcitrante de carbono. A expressão de genes que sabidamente atuam na degradação da biomassa vegetal também poderá ser avaliada. Espera-se então identificar uma nova enzima ou proteína envolvida direta ou indiretamente com a sacarificação da biomassa vegetal.

Tabela 1. Genes de proteínas sem função conhecida hiper-expressos no transcriptoma de *T. reesei* e escolhidos para construção das cepas mutantes. A identificação (ID) de cada proteína é a disponível no banco de dados do JGI do *T. reesei* RUT C30 v1.0, e é apresentado o *hit* da primeira proteína encontrada com alguma função descrita na busca feita pelo BLASTp. A espécie, cobertura e identidade do alinhamento, respectivamente, são mostrados. Também são indicadas as famílias de CAZymes preditas pelo dbCAN e a presença de peptídeo sinal. C: colmo; B: bagaço.

ID Proteína	BlastP [espécie]	Família CAZy predita	Log ₂ (fold change)				Signal P		
			C6h	C12h	C24h	B6h		B12h	B24h
11817	<i>putative FAD-dependent isoamyl alcohol oxidase [Trichoderma reesei RUT C-30] 99/100%</i>	AA7	1,5	2,2	1,4	1,8	2,6	0,0	Sim
111088	<i>Zn-dependent exopeptidase, partial [Trichoderma reesei RUT C-30] 100/100%</i>	GH5	-	5,6	4,7	4,8	5,3	7,1	Sim

Durante a iniciação científica, espera-se que o aluno desenvolva algumas habilidades e aprenda algumas técnicas e metodologias, tais como:

- (i) Busca de sequência em banco de dados, como o NCBI e o JGI (Joint Genome Institute);
- (ii) Desenho de oligonucleotídeos;

- (iii) PCR e qPCR;
- (iv) Extração e purificação de DNA total e plasmidial;
- (v) Transformação em levedura (SC 9721), bactéria (*E. coli* DH5 α) e fungo filamentoso (*T. reesei*);
- (vi) Preparo de meios de cultura para microrganismos diferentes;
- (vii) Análises de sequenciamento, entre outros.

Embora possa parecer que a quantidade de metodologias a ser aprendida é grande, praticamente todas elas já são bem estabelecidas e realizadas rotineiramente em nosso laboratório. Outros integrantes do grupo poderão auxiliá-lo nas inúmeras etapas do projeto. Além disso, as ferramentas que o aluno irá aprender poderão ser utilizadas em outros projetos ou linhas de pesquisas voltadas à biologia molecular, que ele venha a desempenhar no futuro. O aluno irá contribuir com o projeto de doutorado do aluno Gustavo Pagotto Borin, mas dependendo do seu interesse, dedicação e tempo disponível poderá se envolver em outros trabalhos desenvolvidos pelo grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amorim, H.V., Lopes, M.L., de Castro Oliveira, J.V., Buckeridge, M.S., Goldman, G.H. (2011) Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. *Appl Microbiol Biotechnol*, 91(5): 1267-75.

Banerjee, S., Mudliar, S., Sen, R., Giri, B., Satpute, D., Chakrabarti, T., Pandey, R.A. (2010) Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuel Bioprod Bior*, 4: 77-93.

dos Santos Castro, L., Pedersoli, W.R., Antoniêto, A.C., Steindorff, A.S., Silva-Rocha, R., Martinez-Rossi, N.M., Rossi, A., Brown, N.A., Goldman, G.H., Faça, V.M., Persinoti, G.F., Silva, R.N. (2014) Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. *Biotechnol Biofuels*, 7(1): 41.

Eveleigh, D.E., Montenecourt, B.S. (1979) Increasing yields of extracellular enzymes. *Adv Appl Microbiol*, 25:57-74.

Hasunuma, T., Kondon, A. (2012) Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnol Adv*, 30: 1207-1218.

Ho, D.P., Ngo, H.H., Guo, W. (2014) A mini review on renewable sources for biofuel. *Bioresour Technol*, 169C: 742-749.

Le Crom, S., Schackwitz, W., Pennacchio, L., Magnuson, J.K., Culley, J.R., Martin, J., Druzhinina, I.S., Mathis, H., Monot, F., Seiboth, B., Cherry, B., Rey, M., Berka, R., Kubicek, C.P., Baker, S.E., Margeot, A. (2009) Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(38):16151-6.

Leite, R.C.C., Leal, M.R.L.V., Cortez, L.A.B., Griffin, W.M., Scandiffio, M.I.G. (2009) Can Brazil replace 5% of the 2025 gasoline world demand with ethanol? *Energy*, 34:655-661.

Levasseur, A., Drula, E., Lombard, V., Coutinho, P.M., Henrissat, B. (2013) Expansion the enzymatic repertoire of the CAZy database to integrate auxiliary redox enzymes. *Biotechnol Biofuels*, 6:41.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S. (2002) Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(3): 506-577.

Macedo, I. Sugar Cane's Energy – Twelve studies on Brazilian sugar cane agribusiness and its sustainability. UNICA (São Paulo Sugarcane Agro Industry Union), 2005. Disponível em: <<http://sugarcane.org/resource-library/books/Sugar%20Canes%20Energy%20-%20Full%20book.pdf>>.

Martinez D., Berka R.M., Henrissat B., Saloheimo M., Arvas M., Baker S.E., Chapman J., Chertkov O., Coutinho P.M., Cullen D., Danchin E.G., Grigoriev I.V., Harris P., Jackson M., Kubicek C.P., Han C.S., Ho I., Larrondo L.F., de Leon A.L., Magnuson J.K., Merino S., Misra M., Nelson B., Putnam N., Robbertse B., Salamov A.A., Schmoll M., Terry A., Thayer N., Westerholm-Parvinen A., Schoch C.L., Yao J., Barabote R., Nelson M.A., Detter C., Bruce D., Kuske C.R., Xie G., Richardson P.,

- Rokhsar D.S., Lucas S.M., Rubin E.M., Dunn-Coleman N., Ward M., Brettin T.S. (2008) Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat Biotechnol*, 26:553-560.
- Penttilä, Lehtovaara, P., Nevalainen, H., Bhikhabhai, R., Knowles, J. (1986) Homology between cellulose genes of *Trichoderma reesei*: complete nucleotide sequence of the endoglucanase I gene. *Gene*, 45(3):253-63.
- Peterson, R., Nevalainen, H. (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30 – thirty years of strain improvement. *Microbiology*, 158: 58-68.
- Rahman, Z., Shida, Y., Furukawa, T., Suzuki, Y., Okada, H., Ogasawara, W., Morikawa, Y. (2009) Application of *Trichoderma reesei* cellulose and xylanase promoters through homologous recombinant for enhanced production of extracellular β -glucosidase I. *Biosci Biotechnol Biochem*, 73(5):1083-1089.
- Shoemaker, S., Watt, K., Tsitovsky, G., Cox, R. (1983) Characterization and properties of cellulases purified from *Trichoderma reesei* strain L27. *Biotechnology (N. Y.)* 1: 687–690.
- Triana, C.A.R. (2011) Energetics of Brazilian ethanol: comparison between assessment approaches. *Energ Policy*, 39(8):4605-4613.