

PROPOSTA PARA BOLSA PIBIC – CTBE/CNPem

Identificação de um novo fator de transcrição relacionado a degradação de biomassa no fungo hipercelulolítico *Trichoderma reesei*

Orientador/Pesquisadora responsável: Dr^a. Juliana Velasco de Castro Oliveira

Co-orientadores: Gustavo P. Borin (Doutorando)

Roberta Dal'Mas (Mestranda)

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

O desenvolvimento de novas tecnologias para produção de biocombustíveis que priorizem sustentabilidade, inovação e eficiência tem recebido papel de destaque nos últimos anos, devido principalmente à preocupação mundial com o aumento da demanda de combustíveis fósseis e possível esgotamento das reservas naturais (Clark *et al.*, 2012). Os biocombustíveis são uma alternativa promissora por serem ambientalmente mais vantajosos, promoverem economias locais e haver uma grande disponibilidade de matéria-prima (Hasunuma & Kondon, 2012). No Brasil, o etanol pode ser produzido a partir da sacarose da cana-de-açúcar (primeira geração, 1G) ou do bagaço e palha da cana que são gerados como subprodutos do setor sucroenergético (segunda geração, 2G ou lignocelulósico) (Leite *et al.*, 2009).

O processo de produção do etanol 1G já é muito bem consolidado, garantindo o Brasil como um dos maiores produtores do mundo. Entretanto, estudos sugerem que se o bagaço e a palha da cana forem convertidos em etanol 2G, haveria um aumento de 40% na produção deste biocombustível por hectare (Leite *et al.*, 2009). Mas a produção deste apresenta vários gargalos industriais e biotecnológicos que ainda precisam ser superados para que este processo seja economicamente viável. Como principais desafios tecnológicos pode-se citar: 1) quebra da lignocelulose através de pré-tratamento e hidrólise mais eficazes e a um menor custo; 2) assimilação e fermentação de pentoses (xilose e arabinose) por leveduras modificadas geneticamente e 3) o uso de microrganismos mais robustos e tolerantes às condições adversas das dornas de fermentação (Banerjee *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2014).

O etanol 2G é obtido através da fermentação dos açúcares liberados da degradação da parede celular vegetal, um composto complexo composto basicamente por celulose, hemicelulose e lignina (Kricka *et al.*, 2014). Para liberação dos açúcares provenientes destes polímeros e posterior fermentação, faz-se necessária a desconstrução de todo esse material por pré-tratamentos físicos e químicos e/ou hidrólise catalisada por enzimas, como celulasas e hemicelulasas (Rubin, 2008). O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é um dos maiores produtores de celulasas, sendo utilizado por sua grande capacidade hipercelulolítica em diversos ramos da indústria, como de celulose e papel, clareamento de vinhos e produção de coquetéis enzimáticos para degradação de biomassa vegetal (Schmoll

& Schuster, 2010; Cannella & Jørgensen, 2014). Apesar de anos de pesquisa e desenvolvimento com *T. reesei*, os mecanismos moleculares envolvidos na produção das enzimas hidrolíticas não são bem conhecidos. Neste sentido, é de grande relevância avaliar quais os fatores de transcrição (FT) envolvidos no processo de degradação da biomassa, uma vez que eles são os maiores reguladores da expressão da rede gênica de um organismo/célula, tendo papel fundamental em todos os processos biológicos.

Estes FTs são induzidos de modo diferente dependendo da espécie do fungo filamentoso. Em *Aspergillus niger*, outro fungo muito estudado devido às suas enzimas hidrolíticas, a expressão das principais enzimas dos complexos celulolítico e hemicelulolítico é co-regulada pela mesma molécula indutora (D-xilose). Entretanto, em *T. reesei* os mecanismos de indução são mais diversos, onde no mínimo quatro moléculas indutoras diferentes foram descritas (D-xilose, xilobiase, soforose e lactose), mas nenhuma delas tem o potencial para iniciar a expressão de todas as principais celulasas e hemicelulasas (Stricker *et al.*, 2008). Como já mencionado, a glicose ativa a via de repressão por carbono mediada pela proteína Cre1, que entre outros, atua reprimindo a expressão do FT Xyr1 (Portnoy *et al.*, 2011), o principal ativador dos genes que codificam enzimas hidrolíticas (xilanases, celobiohidrolases e endoglucanases (Mach-Aigner *et al.*, 2008). Também foi verificado que Cre1 se liga às sequências específicas do promotor de *cbh1*, que codifica a celobiohidrolase I, uma enzima que constitui cerca de 60% das proteínas secretadas por *T. reesei* (Ilmén *et al.*, 1996), bem como na região promotora de *xyn1*, que codifica uma xilanase (Mach *et al.*, 1996), inibindo a expressão destes genes diretamente. Vários trabalhos foram realizados descrevendo outros FTs que interferem significativamente na expressão de hidrolases, como, por exemplo, Ace1 e Ace2. Esses fatores fazem o *fine-tuning* da regulação dos genes das enzimas hidrolíticas, sendo o primeiro um regulador negativo e o último, um regulador positivo (Stricker *et al.*, 2008). Recentemente, o FT Ace3 foi descrito como um novo regulador positivo, uma vez que sua deleção compromete a transcrição e produção de diversas celulasas e xilanases (Hakkinen *et al.*, 2014). Além destes, outros FTs vêm sendo identificados e muitos vêm sendo patenteados em processos para produção industrial destas enzimas (Pakula *et al.*, 2011), o que demonstra a importância desse trabalho.

Através dos dados de RNA-Seq gerados e analisados, e de outras análises já realizadas pelo doutorando Gustavo P. Borin e mestrandia Roberta Dal’Mas, foram obtidos novos genes de interesse biotecnológico na degradação de biomassa, ainda não estudados, como o FT putativo identificado como um dos mais hiper-expressos em *T. reesei* crescido em bagaço (Tabela 1).

Tabela 1. Fator de transcrição putativo hiper-expresso em bagaço no transcriptoma de *T. reesei*. A identificação (ID) está disponível no banco de dados do JGI do *T. reesei* RUT C30 v1.0. Os domínios da proteína foram buscados contra o PFAM. B: bagaço. 6, 12 e 24h: tempos de crescimento.

ID JGI	PFAM (e-value)	Log ₂ (fold change)		
		B6h	B12h	B24h
33351	PF11951, Fungal specific transcription factor domain (1.7E-29) PF00172, Fungal Zn(2)-Cys(6) binuclear cluster domain (2E-10)	4.06	3.87	3.02

A técnica *knockout* para deleção gênica vem sendo empregada com sucesso há muito tempo para diversos microrganismos-modelo, como *T. reesei* (Penttilä *et al.*, 1987), *Neurospora crassa* (Colot *et al.*, 2006) e *Aspergillus sp.* (Arnaud *et al.*, 2012), com o objetivo de se investigar a função de genes desconhecidos. Até pouco tempo atrás, a construção de mutantes *knockout* em *T. reesei* consistia em inativar a via NHEJ (non-homologous end joining) de reparo do DNA, de modo a facilitar o reconhecimento de regiões homólogas do cassete de deleção e, assim, sua incorporação no genoma (Schuster *et al.*, 2012). Recentemente, entretanto, uma nova tecnologia de DNA recombinante surgiu, o sistema CRISPR-Cas9 (Deveau *et al.*, 2010; Sternberg *et al.*, 2012). Esta tecnologia usa uma fita de RNA guia para direcionar especificamente o lugar do DNA onde a endonuclease caspase deverá fazer uma quebra no DNA dupla-fita, adjacente a uma sequência denominada PAM (*protospacer-adjacent motif*). Esta tecnologia tem revolucionado diversas áreas do conhecimento pois é muito reprodutível e pode ser utilizada para diversas finalidades e organismos (Cong *et al.*, 2013; Ran *et al.*, 2013; Kanchiswamy *et al.*, 2016). Liu e colaboradores (2015) foram os primeiros a transformar o fungo *T. reesei* através do sistema CRIPR-Cas9, obtendo mais de 90% de recombinação homóloga em seus transformantes. Os autores construíram plasmídeos expressando a proteína eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*) para confirmação da transformação e integração no genoma, e além de mutantes com uma única deleção, os autores conseguiram obter até mesmo um mutante com tripla deleção, demonstrando que o sistema CRISPR/Cas9 é flexível e capaz de ter vários alvos simultaneamente (Liu *et al.*, 2015).

Assim, o projeto envolve a construção de uma cepa mutante *knockout* do FT apresentado (Tabela 1), por uma das metodologias descritas acima: homologia entre regiões do cassete de deleção e o genoma do fungo, ou pelo sistema CRISPR-Cas9. Após a construção e confirmação do mutante, serão realizados ensaios de crescimento, atividade enzimática e também de PCR em tempo real para que se possa entender se, e de que modo, esse fator de transcrição está influenciando genes de sacarificação da biomassa.

2. OBJETIVOS

O aluno terá como objetivos:

- Padronizar a técnica de *knockout* para *T. reesei*, de acordo com os protocolos adotados pelo grupo de pesquisa;
- Deletar pela técnica padronizada de *knockout* o gene de um fator de transcrição putativo identificado como hiper-expresso nos dados de RNA-Seq;
- Confirmada a deleção, realizar ensaios de atividade enzimática, crescimento e PCR em tempo real para validação do mutante.

3. METODOLOGIA

Neste trabalho, serão utilizadas as seguintes cepas para construção do mutante *knockout*: 1) QM6a $\Delta tmus53 \Delta pyr4$, 2) TU-6 $\Delta ku70 \Delta pyr4$ e 3) RUT C30 $\Delta tmusP53 pyr4$ -. A deleção dos genes *tmus53* e *ku70* inativa a via de reparo NHEJ (descrito acima), facilitando a recombinação homóloga dos cassetes. Além disso, as três cepas são auxotróficas para a biossíntese de uridina (Steiger *et al.*, 2011), o que será usado como marcador de seleção do transformante. O meio mínimo (MM) (pH 5,5) de crescimento será composto de 0,05% de extrato de levedura, 50 mL/L de solução de sais (6 g/L NaNO₃, 1,5 g/L KH₂PO₄, 0,5 g/L KCl e 0,5 g/L MgSO₄) e 200 µL/L de solução de oligoelementos (10 g/L ácido etilenodiamino tetra-acético, 4,4 g/L ZnSO₄·H₂O, 1,0 g/L MnCl₂·4H₂O, 0,32 g/L CoCl₂·6H₂O, 0,315 g/L CuSO₄·5H₂O, 0,22 g/L (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 1,47 g/L CaCl₂·2H₂O e 1 g/L FeSO₄·H₂O).

Para a construção do vetor de deleção para o gene selecionado (Tabela 1), o gene da orotidina-5'-fosfato descarboxilase (*pyr4*, jgi|139783) será utilizado como marcador de seleção. O cassete de deleção será construído por recombinação homóloga *in vivo* na levedura *S. cerevisiae* SC9721 (genótipo MATa his 3-D200 URA 3-52 leu2D1 lys 2D202 trp 1D63), como anteriormente descrito (Colot *et al.*, 2006). Basicamente, oligonucleotídeos (oligos) serão desenhados para amplificar regiões flangeadoras de aproximadamente 1.000 pb nas extremidades 5' e 3' do gene a ser deletado (mutante *knockout*). Os oligos externos 5'-UTR *forward* e 3'-UTR *reverse* terão uma tag de 20 pb para anelar no plasmídeo pRS426, e os oligos internos 5'-UTR *Reverse* e 3'-UTR *Forward* outra tag de 20 pb para anelar nas extremidades do gene *pyr4*. As duas regiões flangeadoras do gene alvo e o gene *pyr4* serão amplificados por PCR pela DNA polimerase *Phusion*® *High-Fidelity* (New England Biolabs) e utilizados para transformação e recombinação na levedura SC9721 pelo método de acetato de lítio, como descrito anteriormente por Schuster e colaboradores (2012). As colônias transformadas serão selecionadas em meio seletivo sólido YNB ura- (7g/L de YNB, 20g/L de glicose, 20g/L de ágar) e crescidas em meio YNB ura- líquido para extração do DNA total. Em seguida, será feita a transformação por eletroporação na cepa *E. coli* DH5α e os transformantes serão crescidos em meio LB sólido (10 g/L de NaCl, 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 12 g/L de ágar) com ampicilina (100 µg/mL).

Colônias isoladas serão crescidas em meio LB líquido mais ampicilina e os plasmídeos com os cassetes serão purificados utilizando-se o kit de extração *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen). Este DNA será utilizado como *template* para amplificação dos cassetes utilizando-se os oligos *forward* 5' e *reverse* 3' de cada gene. Os cassetes amplificados serão separados por tamanho por eletroforese em gel de agarose, terão suas bandas purificadas e sequenciadas para confirmação, utilizando o kit de reação *Big Dye*® *Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Life Technologies) no sequenciador *Applied Biosystems*® *3500xL Genetic Analyzer* (Life Technologies).

Em seguida, serão utilizados para transformar os protoplastos de uma ou das três linhagens de *T. reesei* (dependendo da eficiência de cada transformação) obtidos a partir da digestão das hifas do fungo por um complexo enzimático comercial (*Lysing Enzymes*, Sigma). A transformação dos cassetes nos protoplastos será feita

de acordo com o protocolo proposto por Penttilä e colaboradores (1987), e a eficácia da transformação será avaliada pelo crescimento dos transformantes em meio sólido sem uridina e uracila. Os transformantes positivos serão crescidos em meio seletivo líquido e o DNA genômico extraído será usado como *template* em uma reação de PCR com os oligos do gene deletado e do marcador de seleção para confirmação da deleção. A metodologia utilizada para construir o mutante *knockout* por CRISPR-cas9 é similar ao descrito acima, contudo alguns passos intermediários são necessários a fim de que a caspase seja expressa dentro do fungo juntamente com o RNA guia (Liu *et al.*, 2015).

Confirmada a transformação, será avaliado se houve alteração no poder lignocelulolítico da cepa transformada, em relação à cepa parental. Serão analisados: (i) o crescimento das cepas em meios contendo diferentes fontes de carbono, como por exemplo bagaço de cana, soforose, CMC, avicel, xilose e glicose (Stricker *et al.*, 2008; Dos Santos Castro *et al.*, 2014), (ii) a atividade enzimática do sobrenadante da cepa mutante e controle crescida nestas condições contra diferentes substratos (Borin *et al.*, 2015), (iii) potencial de sacarificação, analisando a quantidade de açúcares liberados no sobrenadante e a expressão gênica de celulasas e hemicelulasas importantes por PCR em tempo real (Portnoy *et al.*, 2011).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnaud *et al.*, 2012. "The Aspergillus Genome Database (AspGD): Recent Developments in Comprehensive Multispecies Curation, Comparative Genomics and Community Resources." *Nucleic acids research* 40(Database issue):D653–59.
- Banerjee *et al.*, 2010. "Improving Enzymes for Biomass Conversion: A Basic Research Perspective." *BioEnergy Research* 3(1):82–92.
- Banerjee *et al.*, 2010. "Commercializing Lignocellulosic Bioethanol: Technology Bottlenecks and Possible Remedies." *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 4(1):77–93.
- Borin *et al.*, 2015. "Comparative Secretome Analysis of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus niger* during Growth on Sugarcane Biomass." *PloS One*, 10(6), e0129275.
- Cannella *et al.*, 2014. "Do New Cellulolytic Enzyme Preparations Affect the Industrial Strategies for High Solids Lignocellulosic Ethanol Production?" *Biotechnology and Bioengineering* 111(1):59–68.
- Clark *et al.*, 2012. "Green Chemistry, Biofuels, and Biorefinery." *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* 3(1):183–207.
- Colot *et al.*, 2006. "A High-Throughput Gene Knockout Procedure for *Neurospora* Reveals Functions for Multiple Transcription Factors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(27):10352–57.
- Cong *et al.*, 2013. "Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems." *Science (New York, N.Y.)* 339(6121):819–23.
- Deveau *et al.*, 2010. "CRISPR/Cas System and Its Role in Phage-Bacteria Interactions." *Annual review of microbiology* 64:475–93.
- Dos Santos Castro *et al.*, 2014. "Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses." *Biotechnology for Biofuels*, 7(1), 41.
- Hakkinen *et al.*, 2014. "Screening of candidate regulators for cellulase and hemicellulase production in *Trichoderma reesei* and identification of a factor essential for cellulase production." *Biotechnology for Biofuels*, 7: 14.

- 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 *et al.*, 2014. "A Mini Review on Renewable Sources for Biofuel." *Bioresource Technology* 169:742–49.
- Ilmén *et al.*, 1996. "Functional analysis of the cellobiohydrolase I promoter of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*." *Molecular Genetics and Genomics*, 303–314.
- Kanchiswamy *et al.*, 2016. "Fine-Tuning Next-Generation Genome Editing Tools." *Trends in Biotechnology*.
- Kricka *et al.*, 2014. "Metabolic Engineering of Yeasts by Heterologous Enzyme Production for Degradation of Cellulose and Hemicellulose from Biomass: A Perspective." *Frontiers in Microbiology* 5(April):1–11.
- Leite *et al.*, 2009. "Can Brazil Replace 5% of the 2025 Gasoline World Demand with Ethanol?" *Energy* 34(5):655–61.
- Liu *et al.*, 2015. "Efficient Genome Editing in Filamentous Fungus *Trichoderma Reesei* Using the CRISPR/Cas9 System." *Cell Discovery* 1:15007.
- Mach *et al.*, 1996. "Carbon catabolite repression of xylanase I (xyn1) gene expression in *Trichoderma reesei*." *Molecular Microbiology* 21:1273-1281.
- Mach-Aigner *et al.*, 2008. "Transcriptional regulation of xyr1, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*." *Applied and environmental microbiology* 74:6554-6562.
- Pakula *et al.*, 2011. "Method for improved protein production in filamentous fungi." *U.S. Patent Application* 13/701,919.
- Penttilä *et al.*, 1987. "A Versatile Transformation System for the Cellulolytic Filamentous Fungus *Trichoderma Reesei*." *Gene* 61(2):155–64.
- Portnoy *et al.*, 2011. "The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation." *BMC Genomics* 12: 269.
- Ran *et al.*, 2013. "Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity." *Cell* 154(6):1380–89.
- Rubin *et al.*, 2008. "Genomics of Cellulosic Biofuels." *Nature* 454(7206):841–45.
- Schmoll, M. & Schuster, A., 2010. "Biology and Biotechnology of *Trichoderma*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 87(3):787–99.
- Schuster *et al.*, 2012. "A Versatile Toolkit for High Throughput Functional Genomics with *Trichoderma Reesei*." *Biotechnology for biofuels* 5(1):1.
- Steiger *et al.*, 2011. "Transformation System for *Hypocrea Jecorina* (*Trichoderma Reesei*) That Favors Homologous Integration and Employs Reusable Bidirectionally Selectable Markers." *Applied and Environmental Microbiology* 77(1):114–21.
- Sternberg *et al.*, 2012. "Mechanism of Substrate Selection by a Highly Specific CRISPR Endoribonuclease." *RNA (New York, N.Y.)* 18(4):661–72.
- Stricker *et al.*, 2008. "Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*)". *Applied Microbiology and Biotechnology*, 78, pp.211–220.