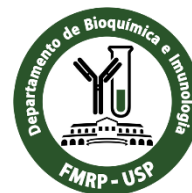




**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOQUÍMICA**



**Caracterização funcional de proteínas transportadoras da via  
de sinalização dependente de cálcio na regulação da  
expressão de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei***

**Letícia Harumi Oshiquiri**

**RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO**

**2024**

**LETÍCIA HARUMI OSHIQUIRI**

**Caracterização funcional de proteínas transportadoras da via  
de sinalização dependente de cálcio na regulação da  
expressão de celulasas pelo fungo *Trichoderma reesei***

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina  
de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências.**

**Área de Concentração: Bioquímica**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto do  
Nascimento Silva**

**Co-orientador: Prof. Dr. Renato Graciano  
de Paula**

**RIBEIRÃO PRETO – SÃO PAULO**

**2024**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Oshiquiri, Letícia Harumi

Caracterização funcional de proteínas transportadoras da via de sinalização dependente de cálcio na regulação da expressão de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei*. Ribeirão Preto, 2024.

97 p. : il. ; 30 cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Roberto do Nascimento Silva

Co-orientador: Renato Graciano de Paula.

1. *Trichoderma reesei*. 2. Cálcio. 3. Transporte. 4. Vacúolos. 5. Celulases

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Letícia Harumi Oshiquiri**

Caracterização funcional de proteínas transportadoras da via de sinalização dependente de cálcio na regulação da expressão de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei*.

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Bioquímica**

**Orientador: Prof. Dr. Roberto do Nascimento Silva**

**Co-orientador: Prof. Dr. Renato Graciano de Paula**

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

### Banca examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

***Dedico esta tese aos meus queridos pais, Sérgio e Márcia,  
por todo o apoio e por todo o amor. Eu amo muito vocês!!!***

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Roberto, pela oportunidade e por acreditar neste trabalho, pela compreensão e força nos momentos difíceis, pela orientação durante o andamento deste projeto. Muito obrigada.

Ao professor Dr. Renato, por sempre ser solícito, por toda a ajuda, pela coorientação. Muito obrigada.

À banca examinadora, pela disponibilidade e por contribuírem com este trabalho. Muito obrigada.

Aos amigos do laboratório, muito obrigada pela companhia e ajuda durante todos estes anos.

Ao Julio, Bete e Flávio, muito obrigada pela colaboração para que este trabalho pudesse ser concluído.

Às técnicas do laboratório, por sempre manterem tudo em funcionamento, muito obrigada.

À equipe da secretaria, pela ajuda e por esclarecerem minhas dúvidas quando precisei. Muito obrigada.

Aos professores das disciplinas que cursei, pelo conhecimento adquirido. Muito obrigada.

Ao meu namorado, Sidnei, por ser o companheiro que você é. Você é muito importante para mim. Muito obrigada.

Aos meus pais e meus irmãos, por todo o apoio. Muito obrigada. Eu amo muito vocês.

À Deus, pela vida. Muito obrigada.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à FAPESP (Processo 2019/19569-0) pelo auxílio financeiro. Muito obrigada.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

OSHIQUIRI, L. H. **Caracterização funcional de proteínas transportadoras da via de sinalização dependente de cálcio na regulação da expressão de celulases pelo fungo *Trichoderma reesei***. 2023. 97 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Este estudo teve como objetivo contribuir para o entendimento do papel das proteínas vacuolares transportadoras de cálcio na regulação da expressão dos genes de *T. reesei* que atuam na desconstrução da biomassa lignocelulósica. Para isto, realizamos a caracterização funcional de 4 proteínas transportadoras de cálcio que foram identificados previamente pelo grupo. Para tanto, obtemos linhagens mutantes com a ausência de cada uma destas proteínas. Ensaio de crescimento mostraram que as linhagens mutantes crescem mais que a linhagem parental na presença de xilose e galactose. Isto indica que as proteínas em estudo estão envolvidas com o metabolismo destes açúcares. Adicionalmente, não observamos diferenças significativas de crescimento na presença de diferentes concentrações de cálcio em glicose, mostrando que as proteínas vacuolares transportadoras de cálcio não estão envolvidas com a resistência ao íon. Por meio de ensaios de atividade enzimática foi observado que o aumento da atividade celulolítica que ocorre na linhagem parental com a adição de cálcio não ocorreu nas linhagens mutantes. Este evento foi investigado também por meio da avaliação da expressão gênica de celulases, onde a mesma inibição foi observada. É possível que com a ausência das proteínas transportadoras de cálcio, o cálcio fique retido dentro dos vacúolos, já que 3 mutantes avaliados apresentam ausência do canal de cálcio YVC1, responsável pela saída do cálcio nos vacúolos. Estes resultados mostram o envolvimento da via de sinalização mediada por cálcio, especialmente dos transportadores vacuolares, na regulação da expressão de celulases em *T. reesei*, possibilitando a identificação de novos alvos para a otimização do processo de degradação de biomassa lignocelulósica.

Palavras-chave: *Trichoderma reesei*, cálcio, transporte, vacúolos, celulases

## ABSTRACT

OSHIQUIRI, L. H. **Functional characterization of transport proteins of the calcium-dependent signaling pathway in the regulation of cellulase expression by the fungus *Trichoderma reesei***. 2023. 97 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

This study aimed to contribute to the understanding of the role of vacuolar calcium transport proteins in regulating the expression of *T. reesei* genes that act in the deconstruction of lignocellulosic biomass. To achieve this, we carried out the functional characterization of 4 calcium transport proteins that were previously identified by the group. To this end, we obtained mutant strains with the absence of each of these proteins. Growth assays demonstrated that the mutant strains grow more than the parental strain in the presence of xylose and galactose. This indicates that the proteins under study are involved in sugar metabolism. Furthermore, we did not observe significant differences in growth in the presence of different concentrations of calcium in glucose, showing that vacuolar calcium transport proteins are not involved in resistance to the metal. Through enzymatic activity assays, it was observed that the increase in cellulolytic activity that occurs in the parental strain with the addition of calcium did not occur in the mutant strains. This event was also investigated through the evaluation of cellulase gene expression, where the same change was observed. It is possible that with the absence of calcium transport proteins, calcium is retained within the vacuoles, since 3 mutants evaluated present an absence of the YVC1 calcium channel, responsible for the exit of calcium from the vacuoles. These results show the involvement of the calcium-mediated signaling pathway, especially vacuolar transporters, in the regulation of cellulase expression in *T. reesei*, enabling the identification of new targets for optimizing the lignocellulosic biomass manipulation process.

Keywords: *Trichoderma reesei*, calcium, transport, vacuoles, cellulases



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cassete de deleção para os genes envolvidos no transporte de cálcio em <i>T. reesei</i> . As regiões em amarelo representam aproximadamente 1000 pb das regiões upstream e downstream dos genes em estudo.....	36
<b>Figura 2.</b> Plasmídeos utilizados para a construção dos cassetes de deleção.....	37
<b>Figura 3.</b> Expressão de genes homólogos a YVC1. Cel = celulose; Glu = glicose; Soph = soforose; Gly = glicerol. A) Linhagens parentais. B) Linhagens mutantes. ....	49
<b>Figura 4.</b> Expressão de genes homólogos a VCX1. Cel = celulose; Glu = glicose; Soph = soforose; Gly = glicerol. A) Linhagens parentais. B) Linhagens mutantes. ....	50
<b>Figura 5.</b> Expressão de genes homólogos a PMC1. Cel = celulose; Glu = glicose; Soph = soforose; Gly = glicerol. A) Linhagens parentais. B) Linhagens mutantes. ....	51
<b>Figura 6.</b> Estratégia para confirmação da linhagem mutante. Os <i>primers</i> para detectar o gene alvo estão em verde. Os <i>primers</i> para detectar a inserção do cassete na orientação correta estão em preto e azul.....	53
<b>Figura 7.</b> Confirmação da deleção dos genes <i>tryvc1</i> (55731) (A-C), <i>tryvc2</i> (56440) (D-F), <i>trpmc1</i> (58952) (G-I) e <i>tryvc3</i> (74057) (J-L).....	54
<b>Figura 8.</b> Expressão dos genes em estudo em celulose (A) e xilose (B). ns = não significativo, * = p-valor < 0.05. ** = p-valor < 0.01. *** = p-valor < 0.001 para o teste t de Student.....	55
<b>Figura 9.</b> Crescimento em placa para análise das linhagens mutantes. A) 1% CMC em MA por 3 dias. B) 1% CMC em MA por 5 dias. C) 2% Glicose em MA por 3 dias. D) 2% Glicose + CR em MA por 3 dias. E) 2% Glicose + 10 mM CaCl <sub>2</sub> em MEX por 3 dias. F) 2% Glicose + 200 mM CaCl <sub>2</sub> em MEX por 3 dias. G) 25 mM Xilose em MM por 5 dias. H) 25 mM Xilitol em MA por 5 dias. Ns = não significativo. * = p-valor < 0.05, ** = p-valor < 0.01 e *** = p-valor < 0.001 para o teste t de Student. ....	57
<b>Figura 10.</b> Crescimento em meio MA líquido com a adição de 25 mM de xilose.....	58
<b>Figura 11.</b> Perfil de crescimento em microplaca das linhagens parental e mutantes na presença das fontes de carbono celobiose, galactose, glicerol, glicose, lactose, maltose, manose e xilose. ....	59

<b>Figura 12.</b> Perfil de crescimento em microplaca das linhagens parental e mutantes na presença de diferentes concentrações de CaCl <sub>2</sub> : 0; 2,7; 5; 10; 15; 50; 100 e 150 mM. .60	
<b>Figura 13.</b> Expressão gênica de fatores de transcrição e celulasas durante cultivo em celulose com pré-crescimento em glicerol. Os p-valores estão representados por: * < 0.03; ** < 0.002 e *** < 0,001, em relação à linhagem parental. A análise estatística realizada foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey. ....62	62
<b>Figura 14.</b> Expressão gênica de fatores de transcrição e celulasas durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar com pré-crescimento em glicerol. Os p-valores estão representados por: * < 0.03; ** < 0.002 e *** < 0,001, em relação à linhagem parental. A análise estatística realizada foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey. ....63	63
<b>Figura 15.</b> Expressão gênica de fatores de transcrição durante cultivo em glicose. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p-valor < 0.03) em relação à linhagem parental. A análise estatística realizada foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey. ....64	64
<b>Figura 16.</b> Expressão gênica de celulasas durante cultivo direto em meio MA com 1% de celulose por 24h. Os p-valores estão representados por: * < 0.05; ** < 0.01 e *** < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl <sub>2</sub> (teste t de Student). ....66	66
<b>Figura 17.</b> Expressão gênica de componentes da via de sinalização mediada por cálcio e fatores de transcrição durante cultivo direto em meio MA com 1% de celulose por 24h. Os p-valores estão representados por: * < 0.05; ** < 0.01 e *** < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl <sub>2</sub> (teste t de Student). ....67	67
<b>Figura 18.</b> Expressão gênica de componentes da via de sinalização mediada por cálcio durante cultivo direto em meio MA com 25 mM de xilose por 48h. Os p-valores estão representados por: * < 0.05; ** < 0.01 e *** < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl <sub>2</sub> (teste t de Student). ....68	68
<b>Figura 19.</b> Expressão gênica de componentes do metabolismo de xilose durante cultivo direto em meio MA com 25 mM de xilose por 48h. Os p-valores estão representados por: * < 0.05; ** < 0.01 e *** < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl <sub>2</sub> (teste t de Student). ....69	69

<b>Figura 20.</b> Expressão gênica de componentes da produção de sorbicilinoídes durante cultivo direto em meio MA com 25 mM de xilose por 48h. Os p-valores estão representados por: * < 0.05; ** < 0.01 e *** < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl <sub>2</sub> (teste t de Student).....	69
<b>Figura 21.</b> Concentração de proteínas no sobrenadante de <i>T. reesei</i> cultivado em meio MA com 1% celulose por 24h. Os p-valores estão representados por: * < 0.05; ** < 0.01 e *** < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl <sub>2</sub> (teste t de Student).....	70
<b>Figura 22.</b> Atividade de CMCase. Linhagens de <i>T. reesei</i> foram cultivadas por a) 24, b) 48, c) 72 e d) 96h com ou sem a suplementação de CaCl <sub>2</sub> (*p < 0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Teste t de Student).....	71
<b>Figura 23.</b> Atividade de FPase, β-glicosidase, β-xilosidase e xilanase. Linhagens de <i>T. reesei</i> foram cultivadas 24h com ou sem a suplementação de CaCl <sub>2</sub> (*p < 0.05, **p<0.01, ***p<0.001 Teste t de Student).....	72
<b>Figura 24.</b> Microscopia confocal de <i>T. reesei</i> em meio MA + 25 mM xilose. O cálcio intracelular foi marcado por meio do Fluo-4/AM.....	73
<b>Figura 25.</b> Espessura da parede celular de <i>T. reesei</i> em meio MA com 25 mM de xilose com e sem a adição de 10 mM de CaCl <sub>2</sub> . .....	74
<b>Figura 26.</b> Microscopia confocal de <i>T. reesei</i> em meio MEX tratado com CFW.....	75

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Genomas de <i>Trichoderma reesei</i> disponíveis no JGI. ....	24
<b>Tabela 2.</b> Proteínas vacuolares transportadoras de cálcio em fungos.....	29
<b>Tabela 3.</b> Primers utilizados para a construção dos cassetes de deleção.....	38
<b>Tabela 4.</b> Primers utilizados para o screening dos transformantes de <i>T. reesei</i> .....	39
<b>Tabela 5.</b> Possíveis transportadores e canais de cálcio vacuolares de <i>T. reesei</i> . As proteínas em estudos estão destacadas em negrito e sublinhado.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

CBH1 – celobiohidrolases  
EG – Endoglucanase  
BGL – Beta-glicosidase  
XYN – Xilanase  
BXL – Beta-xilosidase  
CDREs – do inglês, *calcineurin-dependent response elements*  
CaM – Calmodulina  
Cna1 – Calcineurina, subunidade a  
Cnb1 – Calcineurina, subunidade b  
PLC – do inglês, *phospholipase C*  
cAMP – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico  
LPMO – Mono-oxigenase lítica de polissacarídeos  
SWO – Swolenina  
CCR – Repressão catabólica do carbono  
JGI – Joint Genome Institute  
XYR1 – do inglês, *xylanase regulator 1*  
SW1/SNF – do inglês, *switch/sucrose non-fermentable*  
RCE1 – do inglês, *regulator of cellulase expression*  
RXE1 – do inglês, *regulator 1 of xyr1 expression*  
CRE1 – do inglês, *carbon catabolite repressor 1*  
ACE1 – do inglês, *activator of cellulase expression*  
AZF1 – do inglês, *asparagine-rich zinc-finger protein 1*  
NHEJ – União de extremidades não homólogas  
LB – Luria-Bertani  
MEX – do inglês, *malt extract*  
YPD – do inglês, *yeast peptone dextrose*  
RNA-Seq – do inglês, *RNA sequencing*

pb – pares de bases

SERCA – do inglês, *sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*

PMCA – do inglês, *plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase*

CFW – do inglês, *calcofluor white*

MAPK – do inglês, *mitogen-activated protein kinase*

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. LEVANTAMENTO TEÓRICO .....	22
2.1. O papel das enzimas na produção de biocombustíveis.....	22
2.2. A produção de enzimas por <i>Trichoderma reesei</i> .....	23
2.3. O papel do cálcio na sinalização celular .....	26
2.4. Proteínas vacuolares transportadoras de cálcio .....	29
3. OBJETIVO .....	32
3.1. Objetivos específicos .....	32
4. METODOLOGIA.....	34
4.1. Manutenção dos microrganismos .....	34
4.2. Identificação das proteínas transportadoras de cálcio presentes nos vacúolos de <i>T. reesei</i> .....	35
4.3. Construção das linhagens mutantes .....	35
4.4. Crescimento dos fungos .....	41
4.5. Determinação de atividade enzimática .....	42
4.6. Extração RNA Total, síntese de cDNA e análise de expressão .....	43
4.7. Detecção do cálcio intracelular .....	43
5. RESULTADOS .....	46
5.1. Identificação de proteínas vacuolares transportadoras de cálcio em <i>T.</i> <i>reesei</i> .....	46
5.2. Obtenção de linhagens mutantes com a deleção dos genes alvo .....	52
5.3. Expressão das proteínas vacuolares transportadoras de cálcio em celulose e em xilose com e sem a suplementação de cálcio.....	55
5.4. Análise do crescimento das linhagens mutantes .....	56

5.5. Expressão gênica de celulasas, hemicelulasas e componentes da via de sinalização dependente de cálcio .....	61
5.6. Atividade enzimática nas linhagens mutantes .....	70
5.7. Microscopia.....	72
6. DISCUSSÃO .....	77
7. CONCLUSÃO .....	83
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	86



# **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia global descarta anualmente mais de 500 milhões de toneladas de resíduos orgânicos provenientes de plantas. Estes resíduos são compostos principalmente por celulose, hemicelulose e lignina, que juntos constituem a biomassa lignocelulósica (SAINI; SAINI; TEWARI, 2015; ZHANG et al., 2016). Devido à natureza destas moléculas, pesquisadores e indústrias têm demonstrado um interesse crescente em explorar sua utilização para a produção de biocombustíveis de segunda-geração, aqueles que possuem substratos não comestíveis, diferentemente dos biocombustíveis de primeira-geração (DE PAULA et al., 2018b; JANSEN et al., 2017). Entretanto, apesar dos biocombustíveis representarem uma alternativa promissora aos combustíveis fósseis, a sua produção em escala industrial ainda enfrenta desafios significativos, sendo que um dos principais obstáculos está na necessidade de enzimas para catalisar a conversão de biomassa em biocombustíveis. Como estas enzimas devem ser produzidas em grandes quantidades, o custo de produção é elevado, atingindo cerca de 48% do valor mínimo de venda, no caso do bioetanol (LIU; ZHANG; BAO, 2016). Portanto, é essencial que pesquisas futuras se concentrem em desenvolver métodos mais econômicos para a sua produção.

O fungo filamentosso *Trichoderma reesei* é amplamente reconhecido por sua capacidade de produzir enzimas que degradam a biomassa lignocelulósica, principalmente celulasas e hemicelulasas. No genoma de *T. reesei*, foram identificadas duas celobiohidrolases, *cbh1/cel7a* e *cbh2/cel6a*, 8 endoglucanases, *egl/cel7b*, *egl/cel5a*, *egIII/cel12a*, *egIV/cel61a* e *egV/cel45a*, *cel74a*, *cel61b* e *cel5b*, 7 beta-glicosidases, *bgIII/cel3a*, *bgIII/cel1a*, *cel3b*, *cel3d*, *cel1b*, *cel3c*, *cel3e*, além de 4 xilanases, *xynI*, *xynII*, *xynIII* e *xynIV*, 1 beta-xilosidase, *bxI1* e outras enzimas celulolíticas (HÄKKINEN et al., 2012). Embora seu genoma possua menos genes que codificam celulasas e hemicelulasas em comparação com outros fungos, *T. reesei* é capaz de produzir grandes quantidades dessas enzimas. Isso é atribuído ao seu sistema de regulação e secreção altamente eficiente (DOS SANTOS CASTRO et al., 2014; MARTINEZ et al., 2008a). Além disso, *T. reesei* foi isolado há mais de sete décadas. Desta forma, ele foi e tem sido objeto de numerosos estudos, facilitando a manipulação

do microrganismo e o desenvolvimento de linhagens otimizadas para a produção de enzimas.(BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016).

Existem diversos fatores que influenciam a produção de celulasas e hemicelulasas, por exemplo, o substrato pode ser indutor, como a celulose ou lactose, ou repressor, como a glicose (DOS SANTOS CASTRO et al., 2014). Outros fatores são as condições do meio, como o pH, o tempo de cultivo e a temperatura. Além disso, a presença de metais, como os íons de zinco, manganês, estrôncio e cálcio (CHEN et al., 2016a, 2016b, 2018a; LI et al., 2022, 2023), sendo o último, o foco deste trabalho. Já foi demonstrado que a suplementação do meio de cultivo com 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  induz a produção de celulasas, sendo que isto acontece por meio da via de sinalização dependente de cálcio (CHEN et al., 2016b).

Em fungos, foi demonstrado que a partir de estímulos externos que causam estresse, os canais de cálcio da membrana plasmática ou dos compartimentos intracelulares se abrem, permitindo a entrada de íons de cálcio (LANGE; PEITER, 2020). Três íons de cálcio interagem com a calmodulina (CaM), que se torna ativa e se liga a subunidade A da calcineurina (Cna1). Enquanto isso, outros íons de cálcio se ligam a subunidade B da calcineurina (Cnb1), ativando-a. A calcineurina é uma fosfatase serina-treonina específica, formada pela subunidade catalítica Cna1 e pela subunidade regulatória Cnb1. A Cna1 interage com um de seus alvos, o fator de transcrição Crz1, desfosforilando-o. Assim, ele é translocado para o núcleo da célula por meio da Nmd5, o que possibilita a sua ligação a CDREs (*calcineurin-dependent response elements*) nos promotores alvos, assim induzindo a produção de enzimas como celulasas e proteínas transportadoras de cálcio, como PMC1 e PMR1, levando a redução do cálcio no citoplasma da célula, até que ele atinja a sua concentração basal (LIU et al., 2015a; YANG et al., 2022).

Em *T. reesei*, vários genes que codificam proteínas envolvidas na sinalização de cálcio foram identificados. São 3 canais iônicos, 10 ATPases, 10 transportadores, 5 fosfolipases C (PLC), 1 CaM, 1 Cna1, 1 Cnb1, 9 genes que interagem com cálcio ou CaM e 8 outros genes envolvidos na sinalização de dependente de cálcio (SCHMOLL et al., 2016a). Nosso grupo identificou a modulação da expressão de genes relacionados ao cálcio durante o cultivo de *T. reesei* na presença de celulose, soforose, glicose, bagaço

de cana-de-açúcar e glicerol. Entre eles, proteínas transportadoras de cálcio (DE PAULA et al., 2018b; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014). Adicionalmente, foi demonstrado que o fator de transcrição CRZ1 é necessário para a indução do fator de transcrição *xyr1* (*xylanase regulator 1*) e então de celulases, hemicelulases e transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  e açúcares, sendo a presença de cálcio determinante para que isto ocorra (MARTINS-SANTANA et al., 2019a).

Outros trabalhos também investigaram os efeitos do cálcio em *T. reesei*. Em 2016, CHEN et al. demonstraram que CRZ1 compete com o repressor ACE1 pelo promotor de *xyr1*, resultando na indução de celulases. Em 2018, CHEN et al. demonstraram que o aumento da concentração de  $\text{Mn}^{2+}$  leva ao aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, isto através da ATPase do tipo P, TPMR1, o que resulta na indução de genes que codificam celulases, através da via de sinalização dependente de cálcio. Em 2019, CHEN et al. demonstraram que a adição de N, N-dimetilformamida também induz a produção de celulases, e que esta indução está relacionada a ativação da PLC-E. Em 2021, o mecanismo envolvido na produção de celulases a partir de  $\text{Mn}^{2+}$  e DMF foi investigada com mais detalhes. Assim, CHEN et al. demonstraram que ambas as substâncias elevam a quantidade de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) no citosol das células, o que leva ao aumento da concentração de cálcio intracelular, sendo este aumento dependente de PLC-E. Em 2022, LI et al. demonstraram que a adição de  $\text{Sr}^{2+}$  no meio de cultivo também provoca o aumento da concentração de cálcio intracelular, ativando CRZ1 e resultando no aumento da atividade de celulases. Por fim, em 2023, LI et al. (2023) demonstraram que o  $\text{Zn}^{2+}$  aumenta a atividade de celulases e xilanases e que a PLC está envolvida neste processo, indicando que a sinalização de cálcio tem um papel no efeito observado.

A partir destes trabalhos, observamos que vários fatores podem ativar a produção de celulases a partir da via de sinalização dependente de cálcio. Seus mecanismos moleculares ainda em processo de investigação. Desta forma, a influência de seus componentes na regulação de enzimas relacionadas à degradação da biomassa lignocelulósica é de grande importância para a descoberta de novos alvos para a otimização da produção dos biocombustíveis.

## ***2. Levantamento teórico***

---

## **2. LEVANTAMENTO TEÓRICO**

### **2.1. O papel das enzimas na produção de biocombustíveis**

Os biocombustíveis são uma fonte de energia renovável proveniente de matéria orgânica. Eles podem ser classificados de acordo com a matéria-prima utilizada, sendo biocombustíveis de primeira geração aqueles produzidos a partir de matéria comestível, como milho, batata e beterraba; já os biocombustíveis de segunda geração são produzidos a partir de matéria não comestível, como o bagaço da cana-de-açúcar e outros resíduos de plantas, como madeira e grama. Por fim, os biocombustíveis de terceira geração são aqueles produzidos a partir de macro e microalgas. Dentre estas categorias, as indústrias de biorefinaria tem um interesse principalmente na fabricação de biocombustíveis de segunda geração, devido a matéria-prima utilizada, que é encontrada em abundância no mundo, já que toneladas de resíduos orgânicos de plantas são descartados anualmente (NANDA et al., 2018; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015).

Entre os biocombustíveis de segunda geração produzidos, estão o etanol, butanol e biometano. Uma das principais vantagens da utilização destes biocombustíveis, é que a biomassa lignocelulósica, composta por celulose, hemicelulose e lignina é renovável e um material de custo relativamente baixo (RESTREPO-VALENCIA; WALTER, 2023; SAINI; SAINI; TEWARI, 2015). Ainda sobre a estrutura da biomassa lignocelulósica, ela é composta por aproximadamente 30-40% de celulose, 25-35% de hemicelulose e 10-25% de lignina (DATTA; SAPRA, 2011). A celulose é um homopolíssacarídeo, composto por unidades de D-glicose conectadas por ligações beta(1,4)glicosídicas; a hemicelulose é um heteropolíssacarídeo composto por pentoses, como a D-arabinose e D-xilose, e hexoses, como D-glicose, D-galactose, D-manose e ácidos de açúcares; e a lignina é um polifenol complexo. Desta forma, devido à sua composição, a quebra de suas estruturas para a liberação de açúcares não é simples e requer a utilização de grandes quantidades de enzimas (BARCELOS et al., 2015; SANDERSON, 2011).

As celulasas ocupam o terceiro lugar entre as enzimas mais utilizadas na indústria, vindo depois das proteases e amilases (BAJAJ; MAHAJAN, 2019). As celulasas englobam três enzimas: as endoglucanases (endo-1,4-beta-D-glucanases ou EGs), que aleatoriamente hidrolisam as regiões internas da celulose; as celobiohidrolases ou

exoglucanases (exo-1,4-beta-D-glucanases ou CBH), que hidrolisam as extremidades da celulose e as beta-glicosidases (1,4-beta-D-glucanase), que hidrolisam a celobiose em D-glicose e celo-oligossacarídeos em celobiose e glicose. Além das celulasas, outras enzimas são utilizadas para a degradação da biomassa lignocelulósica: as hemicelulasas. As hemicelulasas são compostas por diversas enzimas, que podem ser classificadas como glicosil hidrolases, esterases e carboidrato liases, de acordo com sua função. Exemplos de hemicelulasas são as xilanases, as beta-1,4-xilosidases e as beta-glucuronidases, que agem para hidrolisar a hemicelulose em produtos como xilooligossacarídeos, xilose e glicose (DATTA; SAPRA, 2011; DE SOUZA; KAWAGUTI, 2021; MEENA et al., 2018).

Por fim, existem as proteínas auxiliares: mono-oxigenases líticas de polissacarídeos (LPMOs), expansinas e swoleninas (SWOs). As LPMOS são enzimas dependentes de cobre que, de maneira oxidativa, clivam as ligações glicosídicas na celulose, facilitando a ação das celulasas. As expansinas são proteínas produzidas por plantas e promovem a expansão da parede celular, desfazendo a estrutura cristalina de celulose. Já as swoleninas são produzidas por fungos e bactérias e também auxiliam a reduzir a rigidez da celulose, o que melhora o acesso das outras enzimas à celulose (OBENG et al., 2017; RANI SINGHANIA et al., 2021).

## **2.2. A produção de enzimas por *Trichoderma reesei***

Como a celulose é o principal componente da biomassa lignocelulósica, coquetéis enzimáticos são preparados com ênfase em celulasas, sendo que entre os microrganismos mais estudados e utilizados para a obtenção destas enzimas está o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* (forma sexuada: *Hypocrea jeciconae*), descoberto há mais de 70 anos devido a superprodução de enzimas hidrolíticas (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016). Esta linhagem foi denominada QM6a e a partir dela, várias outras linhagens hiper produtoras de celulasas foram construídas. Um exemplo é a linhagem QM9414, que foi obtida por meio da irradiação dos conídios de QM6a utilizando um acelerador nuclear. Esta linhagem produz 2-4 vezes mais celulasas do que a linhagem parental, entretanto, ainda sofre a repressão catabólica do carbono (CCR), que é a inibição da produção de celulasas na presença de fontes de carbono simples como a

glicose. Outro exemplo é a linhagem RUT-C30, que foi obtida por meio de mutações randômicas provocadas por UV e pela N-nitroguanidina. Esta linhagem possui atividade de celulase total maior em cerca de 15-20 vezes do que a linhagem QM6a, isto devido ao gene *cre1* (do inglês, *catabolite responsive element*) que está truncado em seu genoma. Este gene codifica um fator de transcrição que leva a CCR. Além disso, RUT-C30 possui mais de 85 kb de DNA deletado em relação a QM6a (PETERSON; NEVALAINEN, 2012).

Os dados genômicos de *T. reesei* podem ser acessados através do banco de dados do Joint Genome Institute (JGI) com as identificações: *Trichoderma reesei* v2.0, *Trichoderma reesei* QM6a e *Trichoderma reesei* RUT C-30 v1.0. *T. reesei* possui 7 cromossomos. Em 2008, o genoma *Trichoderma reesei* v2.0 foi sequenciado utilizando a linhagem QM6a. Entretanto, como ainda existiam alguns gaps, em 2017, esta mesma linhagem foi resequenciada e denominada *Trichoderma reesei* QM6a. Além disso, a linhagem RUT-C30 também teve seu genoma sequenciado (Tabela 1).

**Tabela 1.** Genomas de *Trichoderma reesei* disponíveis no JGI.

Nome	Tamanho (bp)	Nº de genes	Publicação	Link de acesso
<i>Trichoderma reesei</i> v2.0	33.454.791	9.143	MARTINEZ et al. (2008)	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html</a>
<i>Trichoderma reesei</i> QM6a	34.922.528	10.052	LI et al. (2017)	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire_Chr/Trire_Chr.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire_Chr/Trire_Chr.home.html</a>
<i>Trichoderma reesei</i> RUT C-30 v1.0	32.689.233	9.852	KOIKE et al. (2013)	<a href="https://mycocosm.jgi.doe.gov/TrireRUTC30_1/TrireRUTC30_1.home.html">https://mycocosm.jgi.doe.gov/TrireRUTC30_1/TrireRUTC30_1.home.html</a>

Em relação às enzimas envolvidas na degradação da biomassa lignocelulósica, no genoma de *T. reesei*, foram identificadas duas celobiohidrolases, *cbh1/cel7a* e *cbh2/cel6a*, 8 endoglucanases, *egl/cel7b*, *egl/cel5a*, *egIII/cel12a*, *egIV/cel61a* e *egV/cel45a*, *cel74a*, *cel61b* e *cel5b*, 7 beta-glicosidases, *bgII/cel3a*, *bgIII/cel1a*, *cel3b*, *cel3d*, *cel1b*, *cel3c*, *cel3e*, além de 4 xilanases, *xynI*, *xynII*, *xynIII* e *xynIV*, 1 beta-xilosidase, *bx11* e outras enzimas celulolíticas (HÄKKINEN et al., 2012). Curiosamente,



*T. reesei* é um dos microrganismos com o menor repertório de enzimas hidrolíticas voltadas para a degradação de biomassa lignocelulósica dentro da classe *Sordariomycetes* (DOS SANTOS CASTRO et al., 2014; LI et al., 2017; MARTINEZ et al., 2008a). Apesar disso, *T. reesei* ainda é o produtor enzimático mais utilizado comercialmente, devido à sua potente habilidade de indução e secreção de enzimas em elevadas concentrações e às inúmeras pesquisas e tecnologias já desenvolvidas em torno dele, sendo que a deficiência na produção de determinadas enzimas tem sido superada através de técnicas de engenheiramento genético, como a inserção e superexpressão de genes (BISCHOF; RAMONI; SEIBOTH, 2016; DRUZHININA; KUBICEK, 2017; SINGH et al., 2012).

Para evitar gastos energéticos desnecessários, a expressão de genes que codificam celulasas e hemicelulasas é precisamente regulada. A indução ocorre na presença de fontes de carbono não prontamente assimiláveis como a celulose, xilose, sofrorose e lactose, e a repressão ocorre na presença de fontes de carbono mais simples e preferenciais como a glicose e a frutose (SCHMOLL; KUBICEK, 2003).

O fator de transcrição XYR1 é o principal responsável pela indução da expressão de genes que codificam xilanases e celulasas, sendo que a sua deleção leva a abolição da expressão destes genes e sua superexpressão é capaz de levar à produção de celulasas mesmo na ausência de fontes indutoras (LV et al., 2015). Como mecanismo de ação, foi proposto que XYR1 interage com uma subunidade do complexo SW1/SNF (*Switch/Sucrose non-fermentable*), para que ocorra a remodelação da cromatina na região promotora de celulasas de *T. reesei* (CAO et al., 2019), isto poderia facilitar então a interação entre XYR1 e os motivos de ligação que foram identificados em seus principais genes que codificam celulasas (SILVA-ROCHA et al., 2014). XYR1 é modulado negativamente por outros fatores de transcrição denominados RCE1 (*regulator of cellulase expression*) (CAO et al., 2017), RXE1 (*regulator 1 of xyr1 expression*) (WANG et al., 2019), CRE1 (CAMPOS ANTONIÊTO et al., 2015; MACH-AIGNER et al., 2008) e ACE1 (*activator of cellulase expression*) (SALOHEIMO et al., 2000).

Através da deleção de *xyr1* em *T. reesei*, foram identificados, pelo nosso grupo, 16 genes relacionado às enzimas celulolíticas que são regulados diretamente por XYR1 (DOS SANTOS CASTRO et al., 2016a). Também foi identificado, pelo grupo, um fator de

transcrição em *T. reesei* que é homólogo a AZF1 (*asparagine-rich zinc-finger protein 1*) de *Saccharomyces cerevisiae*, e que atua na indução da expressão de celulases e hemicelulases (ANTONIETO et al., 2019). Outros fatores de transcrição estão envolvidos na expressão de genes lignocelulolíticos, entre eles os reguladores positivos ACEII, ACEIII, LAE1, VEL1, BgIR, YPR2, o complexo HAP2/3/5 e TRVIB-1 (DE PAULA et al., 2018b).

### 2.3. O papel do cálcio na sinalização celular

A regulação da expressão de celulases e hemicelulases sofre influência de certos fatores ambientais, entre eles a presença de íons de cálcio (CHEN et al., 2018b). O cálcio é um metal que atua como mensageiro secundário durante o ciclo celular, organização do citoesqueleto, resposta a estresses ambientais e outros processos que são essenciais para a sobrevivência de organismos eucariotos (CHEN et al., 2015; KUMAR; TAMULI, 2014; WANG et al., 2016). Entretanto, elevados níveis deste íon podem ser tóxicos às células devido à interação com proteínas ou outras moléculas orgânicas do citoplasma, o que leva a alteração de suas estruturas e a consequente perda de suas funções, portanto, para assegurar a sobrevivência das células, a concentração de  $Ca^{2+}$  necessita de um meticuloso mecanismo de regulação (CYERT; PHILPOTT, 2013).

Devido à sua simplicidade, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada como modelo para o estudo da homeostase de cálcio em fungos (GHANEGOLMOHAMMADI et al., 2017). Em *S. cerevisiae*, a entrada dos íons de cálcio para o interior da célula é induzida por estímulos como alcalinização do meio, diminuição da temperatura, aumento da salinidade, depleção de manganês, entre outros (MATSUMOTO et al., 2002; RUTA et al., 2014), e ocorre através dos canais voltagem-dependente Mid1p/Cch1p, presentes na membrana citoplasmática. A proteína Mid1p (*Mating pheromone-induced death*), homóloga da subunidade  $\alpha\delta$  dos canais de cálcio voltagem dependentes (VGCCs – *Voltage-gated calcium channels*) de mamíferos, é formada por 4 regiões hidrofóbicas (H1 a H4) e duas regiões ricas em cisteína (C1 e C2), responsáveis por sua localização, que também pode ocorrer no retículo endoplasmático (BONILLA; CUNNINGHAM, 2003); já a proteína Cch1p, homóloga da subunidade  $\alpha$  dos VGCCs, é formada por 22 a 24 domínios transmembrana organizados em quatro repetições hidrofóbicas (RUTA et al., 2014).

Como a deleção de ambos os genes que codificam os canais Mid1p e Cch1p resulta em um mutante idêntico àqueles obtidos através da deleção de apenas um dos genes, é possível que eles atuem de forma conjunta (PAIDHUNGAT; GARRETT, 1997). Ainda em *S. cerevisiae*, foi demonstrado que a deleção do gene que codifica a proteína Ecm7, relacionada a subunidade  $\gamma$  das VGCCs, prejudica a absorção de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma semelhante ao observado na ausência de Cch1p ou Mid1p, sendo proposta a atuação indireta de Ecm1 na regulação da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  (MARTIN et al., 2011).

Além da entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a partir do meio extracelular, a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  pode aumentar também, como resposta à estímulos, pela liberação de reservas que são mantidas nos vacúolos, retículo endoplasmático (RE) ou complexo de Golgi (CG), sendo que pequena parte do  $\text{Ca}^{2+}$  encontra-se no RE, CG ou citosol e a grande maioria se encontra nos vacúolos, em forma livre e utilizável (30  $\mu\text{M}$ ) ou complexada a polifosfatos e não-utilizável (2 mM) (LOCKE et al., 2000). O transporte do  $\text{Ca}^{2+}$  dos vacúolos para o citosol é realizado pelo canal iônico Yvc1 (*yeast vacuolar channel 1*), pertencente à família de receptores de potencial transiente, que formam 6 domínios transmembrana. Em *S. cerevisiae*, Yvc1 está presente nos vacúolos, já em eucariotos superiores, está localizado na membrana citoplasmática (LIU et al., 2015b).

No citoplasma, o  $\text{Ca}^{2+}$  se liga a proteína calmodulina (Cmd1), formada por 4 motivos chamados de mão EF. Geralmente, cada mão EF é capaz de se ligar a um  $\text{Ca}^{2+}$ , entretanto, em *S. cerevisiae*, o quarto motivo não possui tal capacidade. Uma das funções da calmodulina é ativar a fosfatase 2B chamada de calcineurina (CYERT, 2001), altamente conservada de fungos a mamíferos, e composta por 2 subunidades: A, catalítica, codificada por *cmp2* (*calmodulin binding protein 2*) ou *cna1* (*calcineurin subunit A*), e B, regulatória, codificada por *cnb1* (*calcineurin subunit B*). A calcineurina então reconhece um motivo denominado *calcineurin docking domain* em diversas proteínas, como o fator de transcrição CRZ1 (*calcineurin-responsive zinc finger 1*), e as regula (RUSNAK; MERTZ, 2000). CRZ1 possui 2 dedos de C2H2 em sua região C-terminal. Em seu estado fosforilado, CRZ1 está no citoplasma, já em seu estado desfosforilado, CRZ1 é entra no núcleo e se liga aos motivos CDREs (*calcineurin-dependent regulatory elements*) presentes na região promotoras de determinados genes, como *pmr1* (*plasma membrane ATPase related*) e *pmc1* (*plasma membrane calcium*), regulando-os

positivamente (CRABTREE, 2001). Em *Fusarium graminearum*, a deleção de *crz1* indicou que o fator regula diversos processos como desenvolvimento, patogenicidade e resposta a estresses (CHEN et al., 2019a).

Como a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma deve ser mantida entre 50 e 200 nM, o excedente pode ser armazenado em vacúolos ou passar por processos secretórios no RE e CG. Os transportadores Pmc1 e Vcx1 (*vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*) são responsáveis pelo transporte aos vacúolos. Pmc1 é uma ATPase do tipo P formada por 3 domínios conservados entre seus homólogos em eucariotos superiores: E1-E2 ATPase, motivo hidrolase semelhante à haloácido desidrogenase, e domínio ATPase C-terminal (PITTMAN, 2011). Como esperado, mutantes com a deleção de Pmc1 apresentam menor concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  nos vacúolos, entretanto, os valores normais são reestabelecidos pela inativação da calcineurina, que influencia, de forma pós-traducional, a atividade do transportador Vcx1 (KMETZSCH et al., 2013b). Vcx1, também conhecido como Hum1 (*high copy number undoes manganese*), é um trocador de  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$  semelhante a outros trocadores de cátions presentes nos vacúolos. Foi demonstrado que a proteína Nyv1, do tipo v-SNARE inibe a atividade de Pmc1 nos vacúolos (TAKITA et al., 2001). No RE e CG, o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  é realizado por Pmr1, uma ATPase do tipo P de  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ , que tem sua atividade regulada por modificações em seus aminoácidos D778A e Q783A, localizados no segmento transmembrana M6 (MANDAL; WOOLF; RAO, 2000).

Em *T. reesei*, 10 ATPases relacionadas ao  $\text{Ca}^{2+}$  foram identificadas (SCHMOLL et al., 2016b), além disso, nosso grupo identificou a modulação da expressão de transportadores e outras proteínas envolvidas na sinalização dependente de cálcio durante o cultivo de *T. reesei* na presença de celulose, sofrorose e glicose (ANTONIÊTO et al., 2014; DOS SANTOS CASTRO et al., 2016b) assim como bagaço de cana-de-açúcar, glicose e glicerol (DE PAULA et al., 2018c). (CHEN et al., 2018) demonstraram que o aumento da concentração de  $\text{Mn}^{2+}$  leva ao aumento do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, isto através da ATPase do tipo P, homóloga da Pmr1 de *N. crassa* e denominada de Tpmr1 em *T. reesei*, o que resulta na indução de genes que codificam celulases, através da via de sinalização dependente de cálcio. Além disso, nosso grupo recentemente demonstrou que o fator de transcrição CRZ1 é necessário para a indução da transcrição

de *xyr1*, e então de celulasas, hemicelulasas e transportadores de  $\text{Ca}^{2+}$  e açúcares, sendo a presença de cálcio determinante para que isto ocorra (MARTINS-SANTANA et al., 2019b). Assim, a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na via de sinalização dependente de cálcio e a influência de seus componentes na regulação de celulasas e outras enzimas relacionadas à degradação da biomassa lignocelulósica é de grande importância para a otimização da produção de biocombustíveis.

#### 2.4. Proteínas vacuolares transportadoras de cálcio

Para que a concentração de cálcio no citosol chegue ao seu nível basal ou para que o cálcio de compartimentos intracelulares, como os vacúolos, seja liberado, é necessária a ação de algumas proteínas transportadoras.

A entrada do cálcio nos vacúolos ocorre por meio da ATPase PMC1 e do trocador de  $\text{H}^+$ /  $\text{Ca}^{2+}$  VCX1. Já a saída do cálcio acontece por meio do canal YVC1, também conhecido como TRPY1. Várias destas proteínas já foram caracterizadas e estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Proteínas vacuolares transportadoras de cálcio em fungos.

Organismo	Proteína	Número de acesso	Ref.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YVC1/TRPY1	SGD: S000005613	(PALMER et al., 2001)
	VCX1	SGD: S000002286	(POZOS; SEKLER; CYERT, 1996)
	PMC1	SGD: S000002974	(CUNNINGHAM; FINK, 1994a)
<i>Candida albicans</i>	Yvc1	JGI (SC5314): 58760	(YU et al., 2014a)
	Pmc1	JGI (SC5314): 57421	(JIA et al., 2018)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	YvcA	JGI (Af293 from AspGD): 4483	(DE CASTRO et al., 2014a)
	PMCA	NCBI: XP_752453.1	(DINAMARCO et al., 2012a)
	PMCB	NCBI: XP_754550.1	
	PMCC	NCBI: XP_746828.1	
<i>Colletotrichum graminicola</i>	CgTRPF1	Ensembl Fungi (M1_001_V1): GLRG_09114	(LANGE et al., 2016a)

	CgTRPF2	Ensembl Fungi (M1_001_V1): GLRG_10771	
	CgTRPF3	Ensembl Fungi (M1_001_V1): GLRG_08368	
	CgTRPF4	Ensembl Fungi (M1_001_V1): GLRG_09848	
<i>Fusarium oxysporum</i>	FoYVC1	NCBI: KNB11617.1	(KIM et al., 2015)
	Yvc1/Trpy1	Ensembl Fungi (MG8): MGG_09828T0	
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Pmc1	Ensembl Fungi (MG8): MGG_02487T0	(NGUYEN et al., 2008)
	Pmc1	Ensembl Fungi (MG8): MGG_04890	
	Pmc1	Ensembl Fungi (MG8): MGG_07971T0	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	VCX1	NCBI: XP_012046471.1	(KMETZSCH et al., 2010)
	PMC1	NCBI: XP_012049404.1	(KMETZSCH et al., 2013a)
	Vcx1A	NCBI: XP_008594718.1	
	Vcx1B	NCBI: EJP63266.1	
	Vcx1C	NCBI: EJP69457.1	(HU et al., 2014)
<i>Beauveria bassiana</i>	Vcx1D	NCBI: EJP67299.1	
	Vcx1E	NCBI: EJP69455.1	
	PmcA	NCBI: EJP70918.1	
	PmcB	NCBI: EJP64689.1	(WANG et al., 2017a)
	PmcC	NCBI: EJP63186.1	
<i>Hansenula polymorpha</i>	PMC1	NCBI: XP_013935643.1	(FOKINA et al., 2012)
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	PMC1	NCBI: NP_593890.1	(CORTÉS et al., 2004)
<i>Aspergillus nidulans</i>	AnPmcA	NCBI: XP_658793.1	(JIANG et al., 2014)
<i>Neurospora crassa</i>	CAX	NCU07075	(BOWMAN et al., 2011a)

### ***3. Objetivo***

---

### **3. OBJETIVO**

O objetivo principal deste projeto de pesquisa é contribuir para o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização dependente de cálcio em *T. reesei*, com foco no papel das proteínas vacuolares transportadoras de cálcio e o seu envolvimento na regulação de enzimas que atuam na desconstrução da biomassa lignocelulósica. Para isto propomos a caracterização funcional de proteínas vacuolares transportadoras de cálcio através dos objetivos específicos a seguir:

#### **3.1. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste projeto são:

- a) Identificar proteínas transportadoras de cálcio nos vacúolos de *T. reesei* através de análises de bioinformática.
- b) Construir linhagens mutantes com a deleção de proteínas transportadoras de cálcio.
- c) Determinar atividade celulolítica nas linhagens mutantes.
- d) Determinar expressão gênica de celulasas e componentes da via de sinalização dependente de cálcio.
- e) Determinar localização do cálcio intracelular
- f) Construir um modelo sobre a função das proteínas em estudo em *T. reesei*.



## ***4. Metodologia***

---

## 4. METODOLOGIA

### 4.1. Manutenção dos microrganismos

O fungo *T. reesei*, linhagem Qm6a $\Delta$ tmus53 $\Delta$ pyr4, (DERNTL et al., 2015) foi cedido pelo Instituto de Engenharia Química & Biociências Técnicas da Universidade Técnica de Vienna, Áustria, e mantido em meio MEX (extrato de malte 3% (m/v) e ágar bacteriológico 2% (m/v)) com repiques periódicos. Esta linhagem é a referida neste trabalho como a linhagem parental, sendo ela caracterizada por apresentar deficiência no mecanismo de reparo por via de união de extremidades não homologas (NHEJ – *non homologous end joining*) e por apresentar auxotrofia para uridina. As linhagens de *T. reesei* obtidas durante este trabalho são caracterizadas pela deleção de genes que codificam proteínas vacuolares envolvidas no transporte de cálcio. Elas foram obtidas a partir da linhagem parental e são denominadas  $\Delta$ Tryvc1 (Qm6a $\Delta$ tmus53 $\Delta$ 55431),  $\Delta$ Tryvc2 (Qm6a $\Delta$ tmus53 $\Delta$ 56440),  $\Delta$ Tryvc3 (Qm6a $\Delta$ tmus53 $\Delta$ 74057) e  $\Delta$ Trpmc1 (Qm6a $\Delta$ tmus53 $\Delta$ 58952). Estas linhagens também foram mantidas em meio MEX com repiques periódicos. Já para o armazenamento a longo prazo, todas as linhagens foram cultivadas por 7-12 dias em meio MEX a 30°C. Após este período, seus conídios foram coletados utilizando uma solução de esporos (0,8% (p/v) NaCl e 0,05% (v/v) Tween 80), resultando então em uma suspensão de esporos. Esta suspensão foi ajustada para 30% (v/v) de glicerol e desta forma as linhagens foram armazenadas a -80°C. Para uso, 2  $\mu$ L desta suspensão foi inoculada em meio MEX e incubada a 30°C por 7-12 dias.

A cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli*, do Laboratório de Biotecnologia Molecular da Universidade de São Paulo - Brasil, foi mantida em 25% (v/v) glicerol a -80°C. Para uso, 10  $\mu$ L de solução foram estriados em meio LB (Luria-Bertani – tripton 1% (p/v), NaCl 1% (p/v) e extrato de levedura 0,5% (p/v)). As placas foram mantidas a 37 °C por 16h e então foram utilizadas nos experimentos.

A linhagem SC9721 de *S. cerevisiae* (*MAT $\alpha$  his3- $\Delta$ 200 URA3-52 leu2 $\Delta$ 1 lys2 $\Delta$ 202 trp1 $\Delta$ 63*) (*Fungal Genetic Stock Center* – [www.fgsc.net](http://www.fgsc.net)) foi mantida em 50% glicerol a -80°C. A partir da solução estoque, 10  $\mu$ L foram plaqueados em meio YPD (extrato de levedura 1% (p/v), glicose 2% (p/v), peptona 2% (p/v) e ágar bacteriológico 2% (p/v)) para uso.

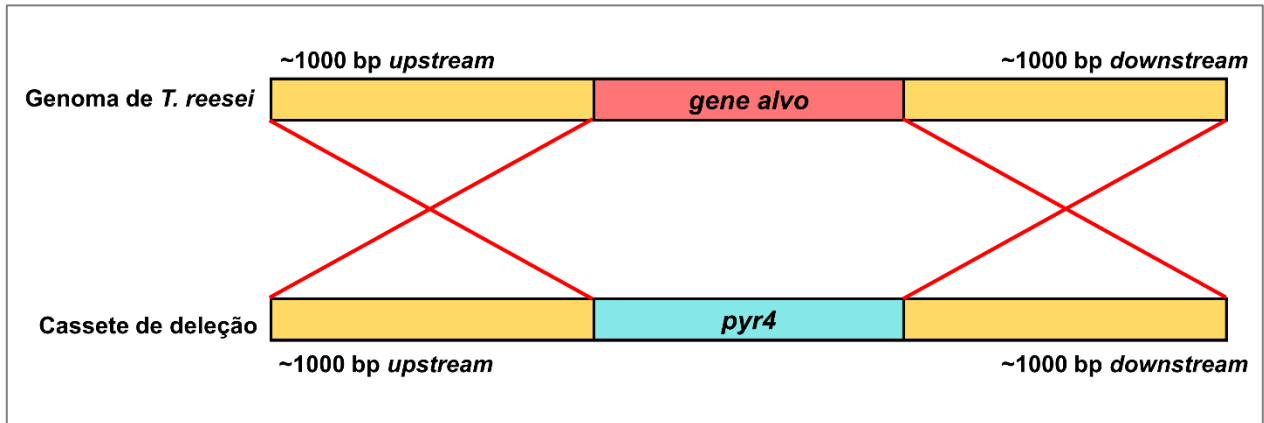
## **4.2. Identificação das proteínas transportadoras de cálcio presentes nos vacúolos de *T. reesei***

Para a identificação dos transportadores e canais de cálcio presentes nos vacúolos de *T. reesei*, um conjunto de proteínas homólogos já caracterizados em outros fungos foi selecionado como referência (Tabela 2). A partir das sequências de aminoácidos destas proteínas, três alinhamentos foram realizados utilizando o MAFFT (KATO; ROZEWICKI; YAMADA, 2018) e três perfis foram criados utilizando o hmmbuild (POTTER et al., 2018): a) YVC1, b) VCX1 e c) PMC1. Estes perfis foram então utilizados para realizar uma busca no genoma de *T. reesei* (MARTINEZ et al., 2008b) utilizando o hmmsearch (POTTER et al., 2018). As anotações foram feitas por meio do InterProScan (BLUM et al., 2021). Utilizando um *cut-off* de 1.0e-45 para o *full e-value*, as proteínas selecionadas foram identificadas nos ensaios de RNA-Seq realizados pelo grupo e os níveis de expressão gênica frente a diversas condições foram utilizados para criar um heatmap utilizando o R (R CORE TEAM, 2021).

## **4.3. Construção das linhagens mutantes**

Os cassetes de deleção foram construídos com o objetivo de remover os seguintes genes que codificam proteínas vacuolares envolvidas no transporte de cálcio: 55731 (*tryvc1*), 56440 (*tryvc2*), 74057 (*tryvc3*) e 58952 (*trpmc1*). No lugar destes genes, foi inserido o marcador de seleção 74020 (*pyr4*), que codifica a enzima Orotidina-5-fosfato descarboxilase, envolvida na catálise da biossíntese do monofosfato de uridina, o que permite a identificação dos transformantes através da complementação auxotrófica da cepa parental de *T. reesei*. As sequências completas dos genes citados neste estudo podem ser pesquisadas no genoma de *Trichoderma reesei* v2.0 disponível no banco de dados JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire2/Trire2.home.html>), exceto 74057 (*tryvc3*), cuja anotação completa da região de codificante pode ser encontrada no genoma *Trichoderma reesei* QM6a com o número de identificação 116397 ([https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire\\_Chr/Trire\\_Chr.home.html](https://mycocosm.jgi.doe.gov/Trire_Chr/Trire_Chr.home.html)). Para facilitar a integração genômica por meio da via recombinação homóloga, os cassetes foram construídos incluindo regiões com homologia de aproximadamente 1000 pares de bases (pb) antes

(*upstream*) e depois (*downstream*) dos genes alvo na cepa parental de *T. reesei* (Figura 1).

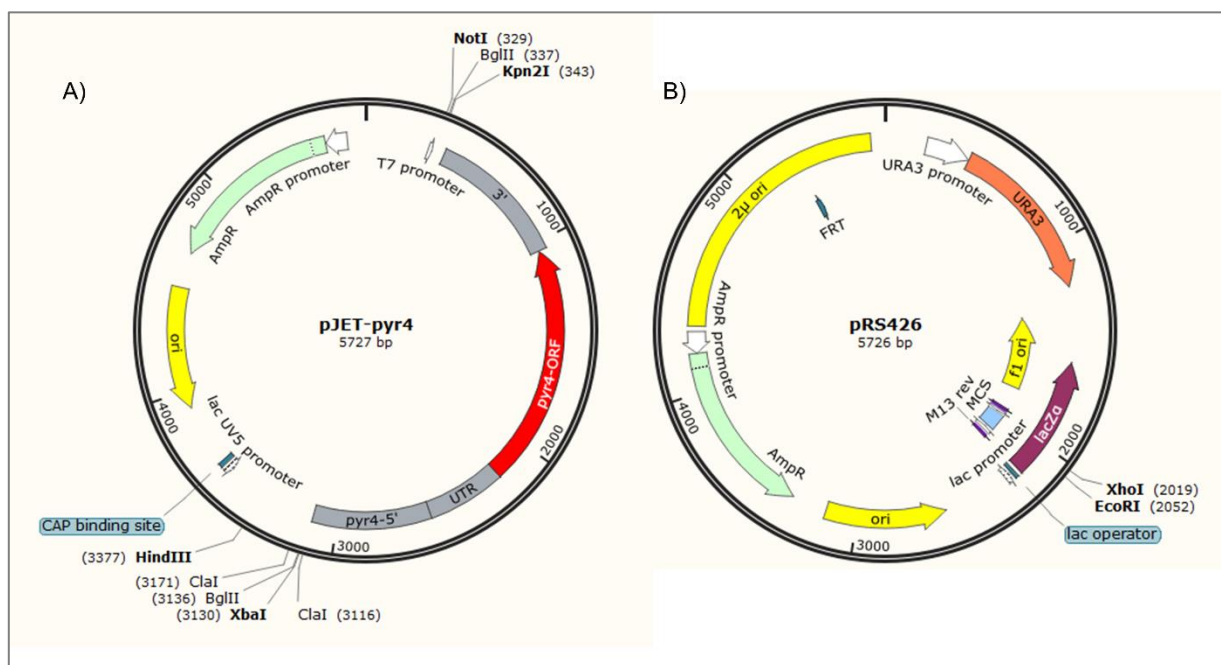


**Figura 1.** Cassete de deleção para os genes envolvidos no transporte de cálcio em *T. reesei*. As regiões em amarelo representam aproximadamente 1000 pb das regiões *upstream* e *downstream* dos genes em estudo.

Neste processo, foram utilizadas duas estratégias. Para construir os plasmídeos contendo os cassetes dos genes *tryvc1* e *tryvc2*, foram desenhados *primers* para amplificação de suas regiões *upstream* e *downstream* com adição de sítios de restrição, permitindo a ligação ao plasmídeo pJET-pyr4, que já contém a sequência do gene *pyr4* inclusa (Figura 2.A). A enzima T4 DNA Ligase (*Thermo Fisher Scientific*) foi utilizada para unir os fragmentos, conforme instruções do fabricante. Para a transformação das reações de ligação, foi utilizado o método de choque térmico em células termocompetentes da cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli*, conforme (SAMBROOK; RUSSELL, 2006). Após o crescimento bacteriano, o DNA plasmidial foi extraído, como em (BIMBOIM; DOLY, 1979), e digerido com as respectivas enzimas de restrição para confirmar a ligação. Nesta estratégia, a região a *upstream* foi ligada primeiro, seguida pela região *downstream*.

Para construir os plasmídeos contendo os cassetes dos genes *tryvc3* e *trpmc1*, foram desenhados *primers* para a amplificação de suas regiões *upstream* e *downstream*, bem como para a região codificadora do gene *pyr4*. Nestes *primers*, foi incluída uma região de sobreposição de aproximadamente 20 pb entre os fragmentos a serem unidos e o plasmídeo pRS426, permitindo a utilização da técnica de recombinação homóloga

mediada por levedura (Figura 2.B). O plasmídeo foi digerido com as enzimas de restrição EcoRI e XhoI (*Thermo Fisher Scientific*) e purificado com o *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*) antes da transformação. Todos os fragmentos e o plasmídeo foram inseridos na cepa SC9721 de *S. cerevisiae* (*MAT $\alpha$  his3- $\Delta$ 200 ura3-52 leu2 $\Delta$ 1 lys2 $\Delta$ 202 trp1 $\Delta$ 63*) (*Fungal Genetic Stock Center* – [www.fgsc.net](http://www.fgsc.net)) de acordo com (NOGUEIRA et al., 2018). Os transformantes foram selecionados através de complementação auxotrófica de uracila. Após a extração do DNA, os cassetes foram amplificados para transformação na cepa parental de *T. reesei*.



**Figura 2.** Plasmídeos utilizados para a construção dos cassetes de deleção.

Todas as amplificações foram realizadas a partir do DNA genômico da cepa parental de *T. reesei*, isolado de acordo com (VITIKAINEN et al., 2010). Após amplificação, os fragmentos foram purificados utilizando o *QIAquick PCR Purification Kit* (*Qiagen*). As sequências dos *primers* estão listadas na Tabela 3.

**Tabela 3.** Primers utilizados para a construção dos cassetes de deleção.

<b>Primers ligase</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
55731_5F_NotI	ggg <b>GCGGCCGCT</b> ACCTAATCTTGGATCTG
55731_5R_BglII	ggggg <b>AGATCT</b> CAAATGTCCGAAGTGGCGTC
55731_3F_XbaI	ggggg <b>TCTAGAG</b> ATGGAGCACGAAGGAAAGC
55731_3R_HindIII	ggggg <b>AAGCTT</b> GGACCCTCTGGATTACCAT
56440-5'_F_HindIII	ggggg <b>AAGCTT</b> GAGTACAACACTACTGTACA
56440-5'_R_ClaI	ggggg <b>ATCGAT</b> GCAATGTAGGGCAGCT
56440-3'_F_Kpn2I	gggg <b>TCCGGA</b> AGTAGAGGCGCAGATTAT
56440-3'_R_BglII	gggg <b>AGATCT</b> GTCTCGCCAACGCAAA
68169-5'_F_HindIII	ggggg <b>AAGCTT</b> TCATGTAGGGCTCATCTGCTT
68169-5'_R_XbaI	ggg <b>TCTAGAG</b> CTGGCGGATTTTGC GAA
68169-3'_F_Kpn2I	gggg <b>TCCGGA</b> AGTCTAGCTATCCCATGACAT
68169-3'_R_NotI	ggg <b>GCGGCCGCA</b> ACTCGATCAACTTTAAT
<b>Primers recombinação</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
Pyr4_F_74057	<u>TGAGGCTTCGGGGCATCTGCTCTTGCCTTGTCTTGTCTGGGTT</u>
Pyr4_R_74057	<u>CTGGCTGGTCATTGGAAACTGCGGTTGATTGTTGCCGTCCGTTTC</u>
74057-5F_pRS426	<u>GTAACGCCAGGGTTTTCCCAATCCGACAAGGGGCATCTTGA</u>
74057-5R_pyr4	<u>AACCCAGACAAGACAAGGCAAGAGCAGATGCCCCGAAGCCTCA</u>
74057-3F_pyr4	<u>GAAACGGACGGCAACAATCAACCGCAGTTTCCAATGACCAGCCAG</u>
74057-3R_pRS426	<u>GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGTGGGAGCTTAGGGAGA</u> CAG
Pyr4_F_58952	<u>ATTATGGCGAAGAAGGACGACGATCTTGCCTTGTCTTGTCTGGG</u>

Pyr4_R_58952	<u>TACATGCAGAAGCATTTCGTC</u> CGGTTGATTGTTGCCGTCCGTTTC
58952-5F_pRS426	<u>GTAACGCCAGGGTTTTCCCACTCAAGAATGGAGTAGCTATATTG</u>
58952-5R_pyr4	<u>CCCAGACAAGACAAGGCAAGATCGTCGTCCTTCTTCGCCATAAT</u>
58952-3F_pyr4	<u>GAAACGGACGGCAACAATCAACCGGACGAATGCTTCTGCATGTA</u>
58952-3R_pRS426	<u>GCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCGCTCAACTGTGCCATCAT</u> CTTCA

Para transformar a cepa parental de *T. reesei*, os plasmídeos resultantes da primeira estratégia foram linearizados. Assim, após dosar os plasmídeos (para deleção de *tryvc1* e *tryvc2*) e os cassetes (para de deleção *tryvc3* e *trpmc1*) usando um espectrofotômetro (Série DS-11, DeNovix), 10-40 µg do plasmídeo ou cassete foram usados para transformação pelo método de protoplasto (GRUBER et al., 1990). Os transformantes foram submetidos a 3 rodadas em meio Mandels-Andreotti (SCHMOLL et al., 2009) + 2% de glicose sem uridina, intercaladas por 3 rodadas nas mesmas condições, com adição de 0,1% (v/v) de Triton X-100, para seleção de homocárions. Para confirmar a obtenção das cepas mutantes, utilizamos PCR convencional e RT-qPCR. As sequências dos primers estão listadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Primers utilizados para o screening dos transformantes de *T. reesei*.

Primers PCR	Sequência (5'-3')
55731_ORF_F	CCAAGGAGGCCCAGATGTATG
55731_ORF_R	GTTGTACGATGGCCATACATCC
55731_SC_F	GTGGACTGACAAACGCAA
55731_SC_R	CCTCAAGTGCGCAATCTA
56440_ORF_F	TCAAGAAGCTGTCCCAGTACATC
56440_ORF_R	TCAAGAAGCTGTCCCAGTACATC
56440_SC_F	CATCCCTTGAGCATCTGCCT

56440_SC_R	AAACTCACCCGCGTCTCTGATA
58952_ORF_R	TGGGTAGACGGATAAGGAACTC
58952_ORF_F	ATGCTACCCTTACCTACTCTTCCG
58952_SC_F	GTGAGACGGTCGGTTACAAGAAG
58952_SC_R	ACTTGTATGCTGACCCACCAAG
68169_ORF_F	TCATCCCCTTGGGAATAGC
68169_ORF_R	CTCCAGATAATCACTTTTGCCG
68169_SC_F	CGAATTCCATTGCTGATTGCGC
68169_SC_R	CGCTTGCTGTTGGCCACAAAAT
74057_ORF_F	TTCGACAGGCGTGGCTATCAAT
74057_ORF_R	AGGGCGAAGAATATCACAGAC
74057_SC_F	CATGTGCTCTCCCTGATCTGT
74057_SC_R	ATCCCAGTCCACGATACGTC
Pyr4-3fwd_WIEN	TGCAACAACACGCGATGG
Pyr4_5rev2_WIEN	ACAAGGACTGAGGATGTTCCGG
Pyr4F_ORF	TGACGGCTTACCTGTTCAAG
Pyr4R_ORF	GATGCCAATCAGCTTGTGCG
<b>Primers RT-qPCR</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>
55731-RTF	ACGAATCTACCCTTTGCTGG
55731-RTR	CGTAGTCGGTTGTCCTTCATC
56440-RTF	TGAGTGAATGGATAGATGCCG
56440-RTR	AGAGGGTGCCAATGAGAATC



---

58952-RTF	CTCTCCAAATGCTACCCTTACC
58952-RTR	CCGACTACATCCGCCATG
68169-RTF	TCTGGTTCAACTTCCTCGC
68169-RTR	CACTCATAGGACCCAACACG
74057-RTF	CGTCATGGGTGTTCTATACTCG
74057-RTR	AATTGCTCCCACTCTTCCAC
actin_F	TGAGAGCGGTGGTATCCACG
actin_R	GGTACCACCAGACATGACAATGTT

---

O gene *68169* também teve seu cassete construído, embora a transformação do fungo não tenha resultado em nenhuma linhagem mutante positiva. Existe a possibilidade de que este gene seja essencial para a sobrevivência de *T. reesei*, desta forma, outras técnicas poderão ser empregadas para deletar este gene em estudos futuros.

#### 4.4. Crescimento dos fungos

Para os experimentos de crescimento, foram utilizadas placas de Petri e microplacas de 96 poços. Os crescimentos em microplacas foram realizados em meio mínimo (NOGUEIRA et al., 2018) com adição de 25 mM de celobiose, galactose, glicerol, glicose, lactose, maltose, manose ou xilose para obter perfis de crescimento em fontes de carbono, ou com adição de 0; 2,7; 5; 10; 15; 50; 100 ou 150 mM de CaCl<sub>2</sub>, acompanhado de glicose a 2% para verificar a tolerância ao cálcio. Além disso, para o cultivo da linhagem parental, foram adicionados 5 mM de uridina devido à deleção do gene *pyr4*. Nestes experimentos, as microplacas foram incubadas a 30°C durante 96h. Leituras de absorbância a 750 nm foram realizadas a cada 24 horas para determinar o grau de turbidez, indicando crescimento fúngico. Para o crescimento em placa, 10<sup>7</sup> conídios em suspensão de esporos foram inoculados em meio mínimo contendo 2% de glicose ou 25 mM de xilose acrescido de diversos tratamentos, como o congo red. Estas placas foram incubadas por 3 dias e o seu crescimento foi registrado diariamente através

de fotografias. Os experimentos foram realizados em três réplicas técnicas e pelo menos duas réplicas biológicas, e as diferenças estatísticas foram calculadas pelo teste ANOVA de duas vias, seguido do teste de Dunnett, no software GraphPad Prism 8.00.

Para realizar os testes de atividade enzimática

#### **4.5. Determinação de atividade enzimática**

Para a determinação da atividade de celulase total (FPase) foi empregada uma tira de 1 x 6 cm de papel de filtro Whatman n°1 (50 mg), 30 µL de tampão citrato-fosfato 100 mM pH 5,0 e 30 µL de amostra. Essa reação foi incubada a 50 °C por 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 60 µL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico) com aquecimento a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, para determinação da concentração de açúcar redutor, foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 550 nm no equipamento xMark™ Microplate Spectrophotometer da Bio-Rad.

A atividade de endoglucanase (CMCase) foi realizada como descrito por Xiao e colaboradores (XIAO et al., 2001) com algumas modificações. Para este ensaio, 30 µL de enzima foram incubados com o substrato carboximetilcelulose (CMC) 1% em tampão de acetato de sódio pH 4,8 a 50 °C e após 30 minutos, foram adicionados 60 µL de DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico), sendo a reação mantida a 95° C por 5 minutos. Em seguida, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm. Uma unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 µmol de açúcar redutor por minuto.

Para atividade de β-glicosidase foram usados 50 µL de tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,5, 10 µL de enzima e 40 µL de solução de p-Nitrophenol-β-D-glicopiranosídeo (pNP-Gluc) 5 mM. A reação foi incubada por 15 minutos a 50 °C. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 100 µL de carbonato de sódio 1 M e lida a 405 nm. O resultado foi expresso em µmol de p-nitrofenol formado por minuto e por mL de solução enzimática (U/mL).

Para atividade de xilanase, 50 µL de tampão acetato de sódio 100 mM pH 5, 25 µL de amostra e 50 µL de substrato (xilana, 50 mg/mL) foram incubados por 30 minutos a 50 °C. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 75 µL de DNS e incubada por 5 minutos a 95 °C e, em seguida, lida a 540 nm.

Enfim, para atividade de  $\beta$ -xilosidase, 50  $\mu$ L de tampão acetato de sódio 50 mM pH 4.8, 10  $\mu$ L de amostra e 40  $\mu$ L de substrato (PNP-Xyl, 5 mM) foram incubados por 15 minutos a 50° C. Após este tempo, a reação foi interrompida pela adição de 100  $\mu$ L de carbonato de sódio 1M e, em seguida, lida a 405 nm.

#### **4.6. Extração RNA Total, síntese de cDNA e análise de expressão**

Os micélios de *T. reesei* mutantes e da linhagem parental crescidos nas condições citadas acima foram filtrados em miracloth, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80° C até o momento do uso. O RNA total foi extraído através do método do TRIZOL® de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação dos RNAs foi realizada por espectrofotometria OD 260/280 e a integridade dos mesmos foi verificada através do Agilent 2100 Bioanalyzer e eletroforese em gel de agarose 1%. Os RNAs total (1  $\mu$ g) foram primeiramente tratados com DNase I (Fermentas) para remoção de DNA genômico. Após essa etapa, fitas de cDNAs foram sintetizadas usando-se o kit Maxima™ First Strand cDNA Synthesis de acordo com instrução do fabricante, sendo o cDNAs armazenados a -20 °C. Os mesmos foram utilizados para análise por PCR em Tempo Real no equipamento Bio-Rad CFX96™, usando SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) para o sinal de detecção, de acordo com as instruções do fabricante. O gene da  *$\beta$ -actina* foi utilizado como controle endógeno para normalizar a quantidade total de cDNA presente em cada reação. Foi analisada a expressão de genes para enzimas celulolíticas (ANTONIÉTO et al., 2014) e genes envolvidos na via de sinalização dependente de Ca<sup>2+</sup>.

#### **4.7. Detecção do cálcio intracelular**

Para detectar o cálcio intracelular, foi utilizado o reagente Fluo4-AM (*ThermoFisher Scientific*). Primeiramente, 10<sup>7</sup> conídios de cada linhagem (parental e mutantes) foram incubados em meio MA durante 48 horas a 200 rpm e 30 °C com e sem a adição de cálcio. Após incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS e carregadas com 5  $\mu$ M de Fluo4-AM por 30 minutos à 30 °C. Em seguida, a intensidade de fluorescência de Fluo4-AM foi medida por excitação no comprimento de onda de 340 nm com uma emissão de 550 nm.

#### **4.9. Forma de análise dos resultados**

Os resultados foram analisados e comparados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism v8.0.

## ***5. Resultados***

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Identificação de proteínas vacuolares transportadoras de cálcio em *T. reesei*

Para a identificação dos transportadores e canais de cálcio presentes nos vacúolos de *T. reesei*, um conjunto de homólogos já caracterizados em outros fungos foi selecionado como referência. Os dados estão apresentados na Tabela 2. A partir destes dados, foi realizado um alinhamento para cada tipo de proteína: 1) YVC1, 2) VCX1 e 3) PMC1. Estes alinhamentos foram utilizados para criar um perfil e realizar buscas no genoma de *T. reesei*. Como resultado, observa-se que um grande número de proteínas foi encontrado através da busca, um total de 33 (Tabela 5), mas que provavelmente nem todas estão envolvidas com o transporte de cálcio nos vacúolos. Apesar disso, é possível notar como o sistema de controle do fluxo de cálcio é complexo em *T. reesei*.

**Tabela 5.** Possíveis transportadores e canais de cálcio vacuolares de *T. reesei*. As proteínas em estudos estão destacadas em negrito e sublinhado.

JGI ID	Homologo em <i>S. cerevisiae</i>	Tam. (aa)	Anotação	Full e-value (Hmsearch)
<b><u>74057</u></b>	YVC1	625	Nonselective cation channel protein	1.8e-256
<b><u>55731</u></b>	YVC1	1167	Nonselective cation channel protein	7e-164
<b><u>56440</u></b>	YVC1	701	Nonselective cation channel protein	5e-145
63125	YVC1	631	Nonselective cation channel protein	3.7e-121
71037	YVC1	1104	Nonselective cation channel protein	3.4e-117
79599	VCX1	462	Vacuolar calcium ion transporter	1.4e-178
55595	VCX1	421	Vacuolar calcium ion transporter	2e-166
79398	VCX1	339	Vacuolar calcium ion transporter	2.1e-151
56744	VCX1	381	Vacuolar calcium ion transporter	8.5e-100
82544	VCX1	433	Vacuolar calcium ion transporter	4.3e-87

<b>68169</b>	VCX1	394	Vacuolar calcium ion transporter	1e-81
62835	VCX1	1115	Vacuolar calcium ion transporter	7.4e-48
75347	PMC1	1379	Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type	0
<b>58952</b>	PMC1	1204	Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type	0
62362	PMC1	1281	Calcium-translocating P-type ATPase, PMCA-type	0
120627	PMC1	998	Calcium-translocating P-type ATPase, SERCA-type	2.4e-142
119592	PMC1	1062	Calcium-transporting ATPase	1.5e-137
81536	PMC1	1101	Calcium-transporting ATPase	4.3e-111
122972	PMC1	1071	Calcium-transporting ATPase	8.4e-109
81430	PMC1	1023	Calcium-transporting ATPase	1.3e-106
106928	PMC1	1049	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	6.3e-94
78757	PMC1	923	Calcium-transporting ATPase	1.9e-47
76238	PMC1	982	Calcium-transporting ATPase	1.4e-45
123183	PMC1	1309	Cation-transporting ATPase-related	1.1e-38
122043	PMC1	1171	Heavy metal translocating P-type ATPase	2.2e-36
43831	PMC1	1354	Probable phospholipid-transporting ATPase	1.2e-32
23221	PMC1	1318	Cation-transporting ATPase-related	3.6e-31
123735	PMC1	1105	Heavy metal translocating P-type ATPase	5e-30
77025	PMC1	1300	Probable phospholipid-transporting ATPase	7.4e-30
80756	PMC1	1133	Heavy metal translocating P-type ATPase	1e-27
79258	PMC1	1534	Probable phospholipid-transporting ATPase	3.2e-27
47315	PMC1	1392	Probable phospholipid-transporting ATPase	2.7e-23

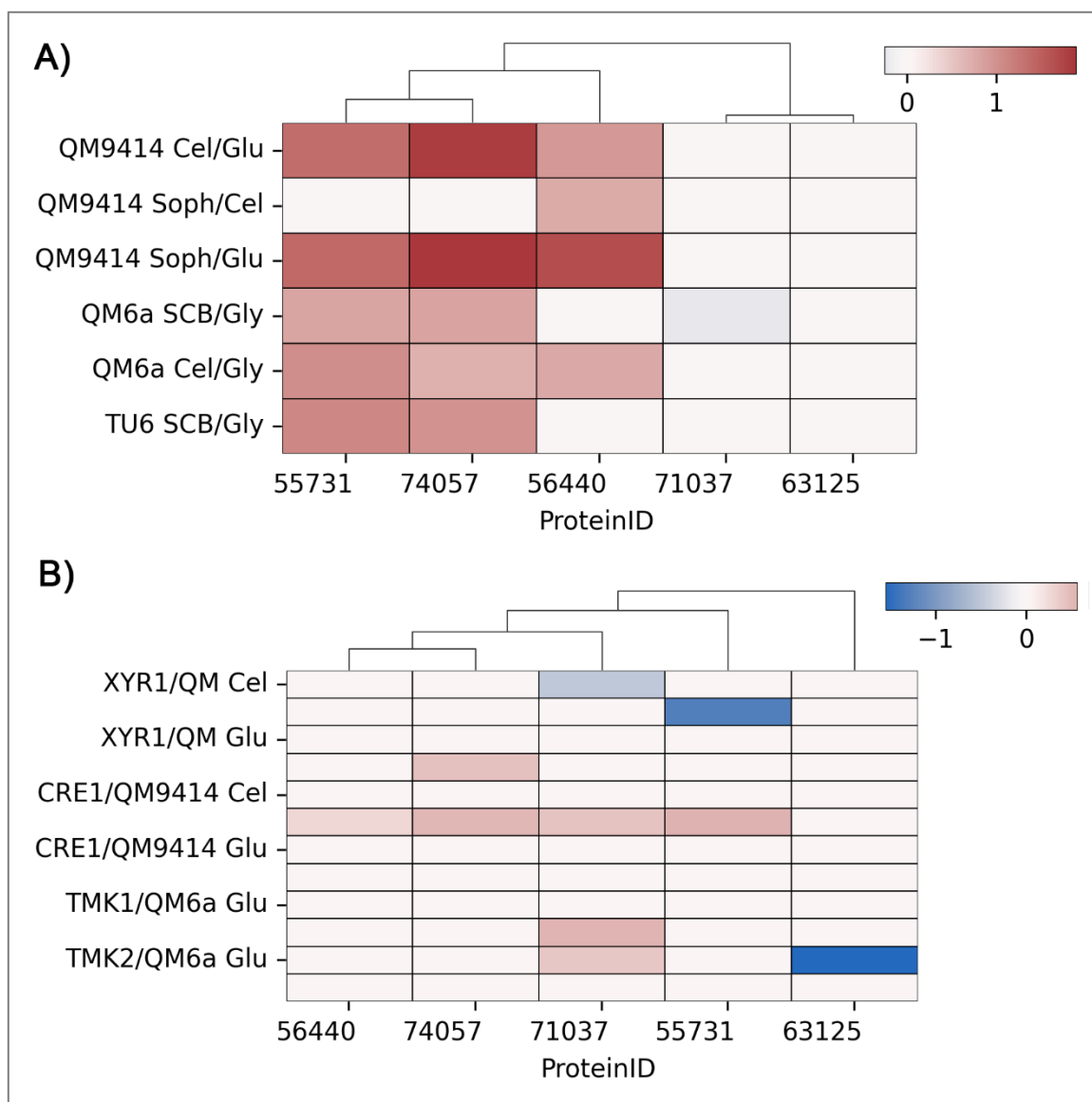
75409	PMC1	1368	Probable phospholipid-transporting ATPase	2.4e-20
-------	------	------	---	---------

Para melhor entender o papel das proteínas identificadas, reunimos os dados de RNA-Seq realizados pelo grupo (ANTONIETO et al., 2019; CASTRO et al., 2014; DE PAULA et al., 2018a; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014; SILVA et al., 2023) e analisamos os seus perfis de expressão.

Em relação aos genes que codificam YVC1 (Figura 3), é possível observar que nas linhagens parentais QM9414, QM6a e TU6 os genes 55731, 74057 e 56440 são os principais regulados nas condições analisadas (Figura 3.A). Estes genes aparecem regulados positivamente nas condições estudadas, que são condições indutoras da produção de enzimas celulolíticas. Nas linhagens mutantes (Figura 3.B), observamos a regulação negativa de 71037, 55731 e 63125 na ausência de XYR1 em celulose e soforose e de TMK2 em bagaço de cana-de-açúcar, respectivamente. Também observamos a regulação positiva de 74057 e 71037 na ausência de AZF1 em bagaço de cana-de-açúcar e TMK2 tanto em bagaço de cana-de-açúcar quanto em glicose, respectivamente. Além disso, observamos que todos os genes homólogos a YVC1 estão regulados positivamente na ausência de CRE1 em soforose, exceto o 63125.

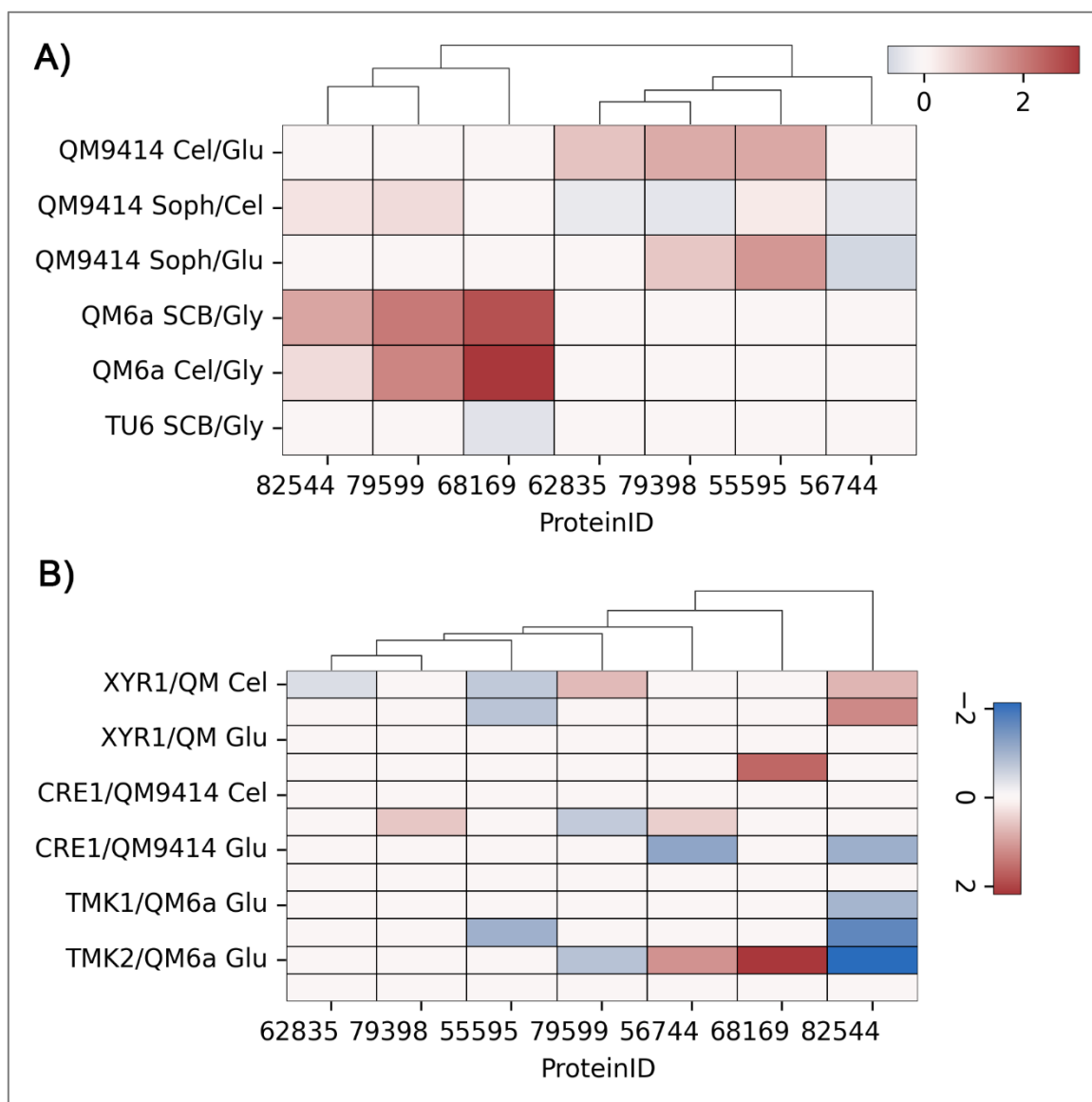
Sobre os genes que codificam VCX1 (Figura 4), observamos que principalmente 68169 é regulado positivamente, sendo esta regulação na linhagem QM6a, tanto em bagaço de cana-de-açúcar como em celulose, ambos em relação à glicose. Em QM9414 temos a regulação positiva de 62835, 79398 e 55595 em celulose em relação a glicose; de 82544 e 79599 em soforose em relação à celulose e de 79398 e 55595 em soforose em relação a glicose. Já os genes 62835, 79398 e 56744 estão levemente regulados negativamente em soforose em relação à celulose. Ainda o gene 56744 está regulado negativamente em soforose em relação a glicose (Figura 4.A). Nas linhagens mutantes, observamos principalmente a regulação positiva de 68169 na ausência de AZF1 em bagaço de cana-de-açúcar e de TMK2 na mesma fonte de carbono. Regulados negativamente, observamos principalmente os genes 82544 na ausência de TMK1 em bagaço de cana-de-açúcar e TMK2 tanto em bagaço de cana-de-açúcar como em glicose, 56744 na ausência de CRE1 em glicose e 55595 na ausência de XYR1 em fontes indutoras e de TMK2 em glicose (Figura 4.B).





**Figura 3.** Expressão de genes homólogos a YVC1. Cel = celulose; Glu = glicose; Soph = sofrorse; Gly = glicerol. A) Linhagens parentais. B) Linhagens mutantes.

Por fim, em relação aos genes homólogos a PMC1 (Figura 5), observamos principalmente a regulação positiva de 81536 em QM6a em bagaço de cana-de-açúcar e celulose em relação a glicerol, assim como em TU6 em bagaço de cana-de-açúcar em relação a glicerol. Este mesmo gene é regulado negativamente em QM9414 em sofrorse em relação a celulose. Em destaque, também observamos o gene 58952 regulado positivamente em QM6a nas duas condições analisadas.

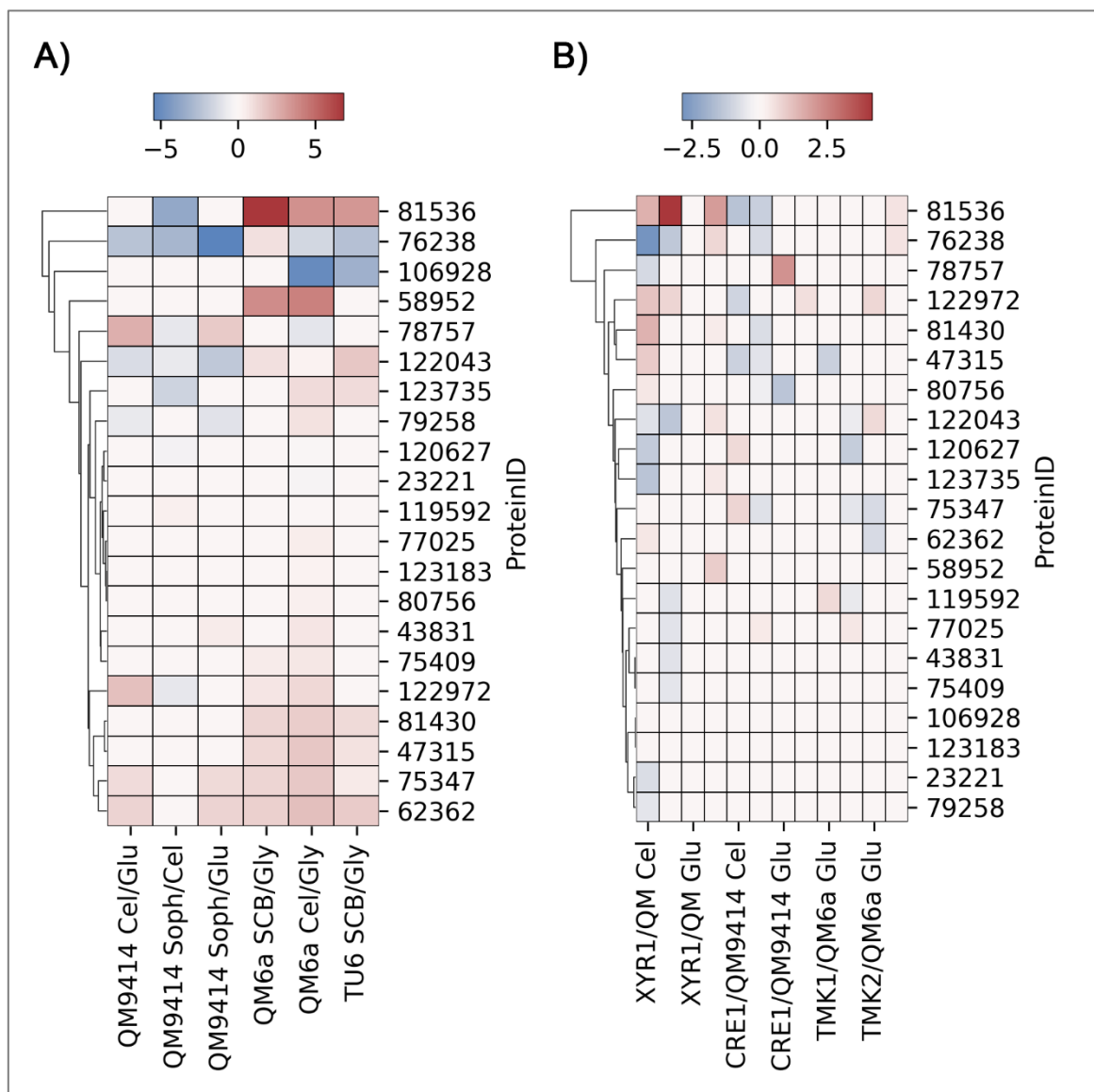


**Figura 4.** Expressão de genes homólogos a VCX1. Cel = celulose; Glu = glicose; Soph = sofrorse; Gly = glicerol. A) Linhagens parentais. B) Linhagens mutantes.

Já os genes 76238 e 106928 estão negativamente regulados negativamente ou não são diferencialmente expressos em todas as condições analisadas (Figura 5.A). Nas linhagens mutantes (Figura 5.B), observamos que o gene 81536 é regulado positivamente na ausência dos fatores de transcrição XYR1 e AZF1. Já em CRE1, ele é regulado negativamente. Diferente deste gene, o 76238 é regulado negativamente na ausência de XYR1, positivamente na ausência de AZF1 e negativamente na ausência de CRE1. O gene mais positivamente regulado na ausência de CRE1 foi o 78757. Interessantemente, o gene 58952 é diferencialmente expresso apenas na ausência de

AZF1, indicando que não existem diferenças de expressão entre as outras condições analisadas.

Desta forma, com base nos resultados de RNA-Seq realizado pelo grupo e pelas anotações já existentes no banco de dados JGI, as proteínas 55371, 56440, 74057, 58952 e 68169 foram selecionadas para serem exploradas neste estudo. Estas proteínas foram nomeadas de TrYVC1, TrYVC2, TrYVC3, TrPMC1 e TrVCX1, respectivamente.



**Figura 5.** Expressão de genes homólogos a PMC1. Cel = celulose; Glu = glicose; Soph = sofrorose; Gly = glicerol. A) Linhagens parentais. B) Linhagens mutantes.

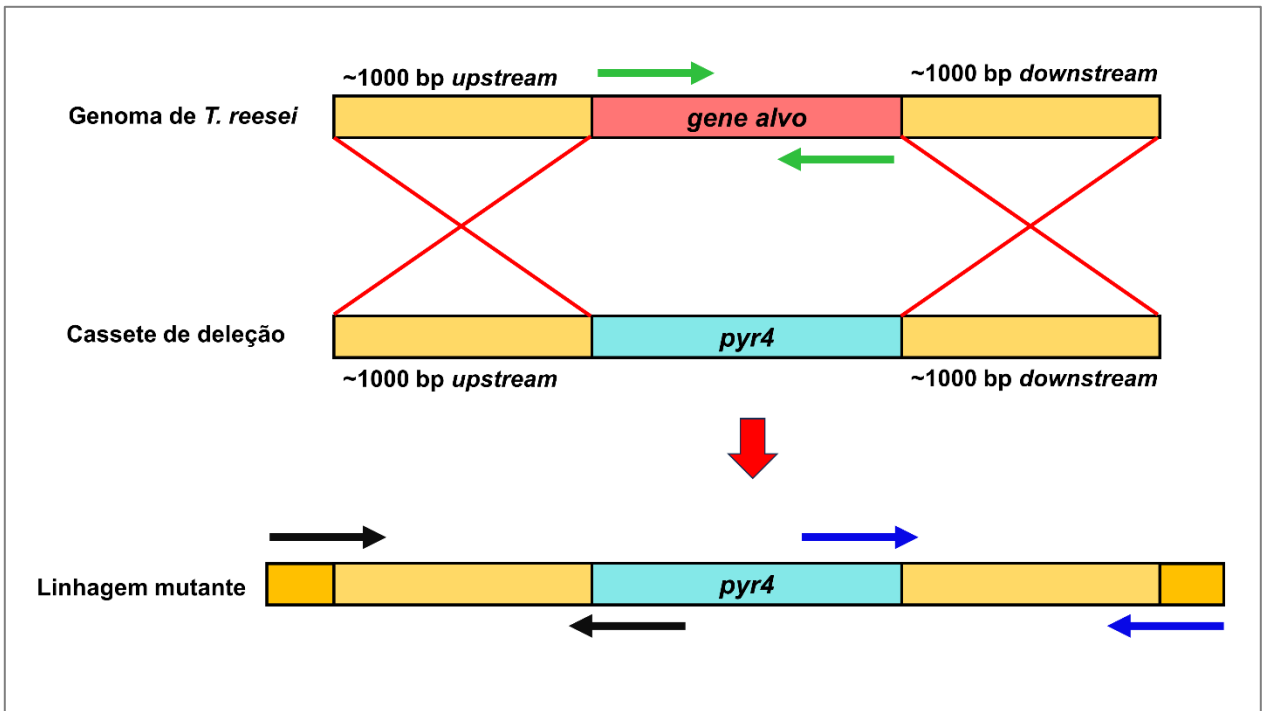
## 5.2. Obtenção de linhagens mutantes com a deleção dos genes alvo

Para a obtenção das linhagens mutantes, primeiro foram construídos cassetes de deleção para cada um dos genes selecionados. Para isto, fragmentos das regiões *upstream* e *downstream* dos genes em estudo foram amplificados. Como foram utilizadas duas estratégias para as construções, para *tyvc1*, *tryvc2* e *trvcx1* os fragmentos foram amplificados com a adição de sítios de restrição, para posterior ligação no plasmídeo pJET-pyr4; já para *tryvc3* e *trpmc1*, os fragmentos foram amplificados com a adição de uma região de homologia para ligação por recombinação homóloga em levedura.

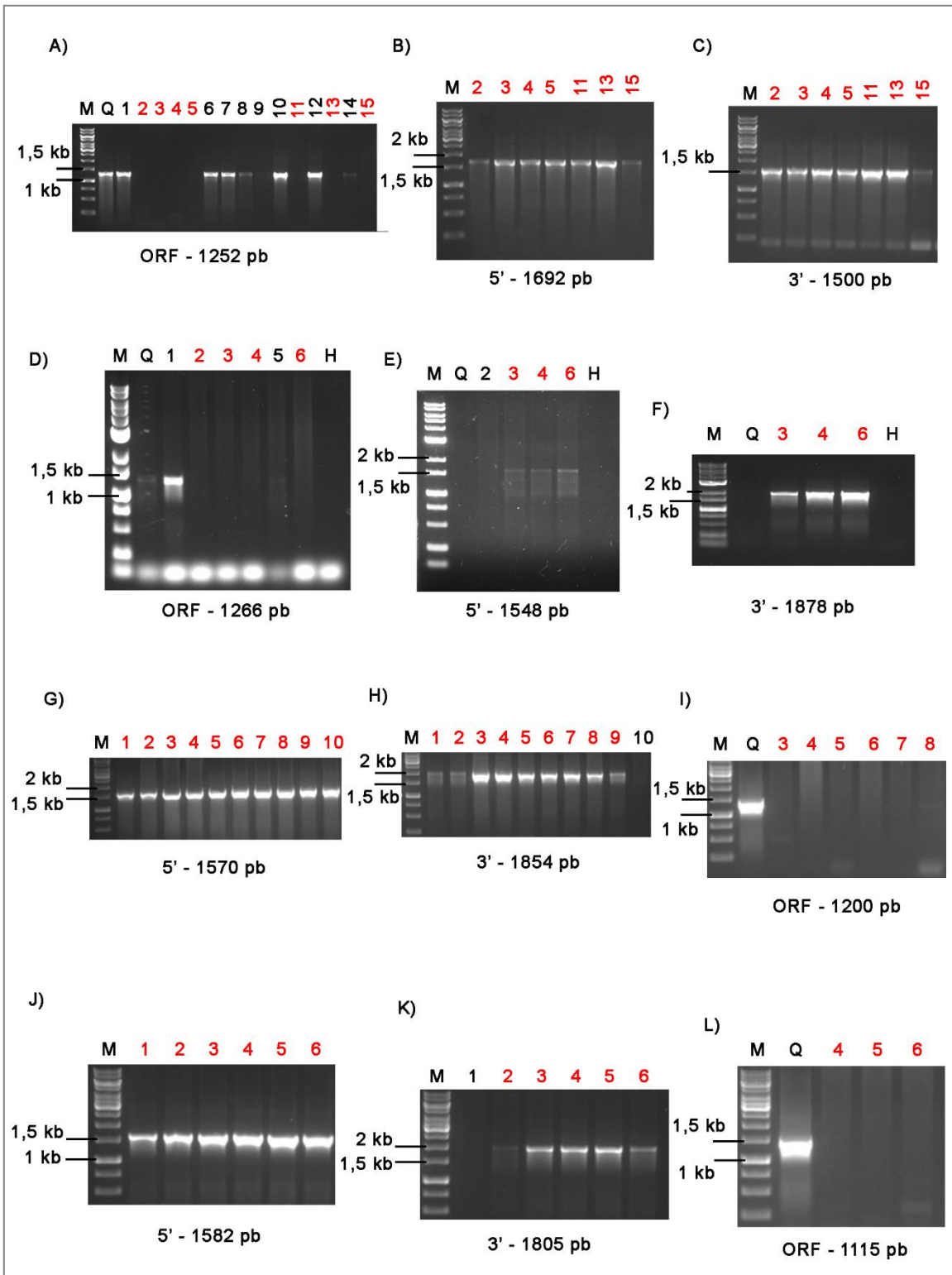
Com os cassetes prontos, foi realizada a transformação na linhagem parental QM6a $\Delta$ *tmus53* $\Delta$ *pyr4*, o que resultou nas linhagens mutantes  $\Delta$ *tryvc1*,  $\Delta$ *tryvc2*,  $\Delta$ *tryvc3* e  $\Delta$ *trpmc1*. Para o gene *trvcx1*, três transformações foram realizadas, mas nenhuma delas resultou em linhagens mutantes com a ausência do gene alvo. A confirmação das linhagens mutantes foi realizada por PCR convencional (Figura 8) e por RT-qPCR.

A estratégia utilizada para a PCR convencional (Figura 6) foi: 1. Detectar a ausência da ORF, 2) Detectar a orientação da inserção do cassete por meio da presença do local em que houve a união da região *upstream* do gene alvo não editada com a região *upstream* mais o gene *pyr4* que estavam no cassete e 3) Detectar a orientação da inserção do cassete por meio da presença do local em que houve a união da região *downstream* do gene alvo não editada com a região *downstream* mais o gene *pyr4* que estavam no cassete.

Desta forma, obtemos 7 linhagens mutantes para TrYVC1, 3 para TrYVC2, 3 para TrYVC3 e 6 para TrPMC1 (Figura 7). Para TrVCX1, apesar do *screening* de vários transformantes, nenhuma linhagem mutante foi obtida.



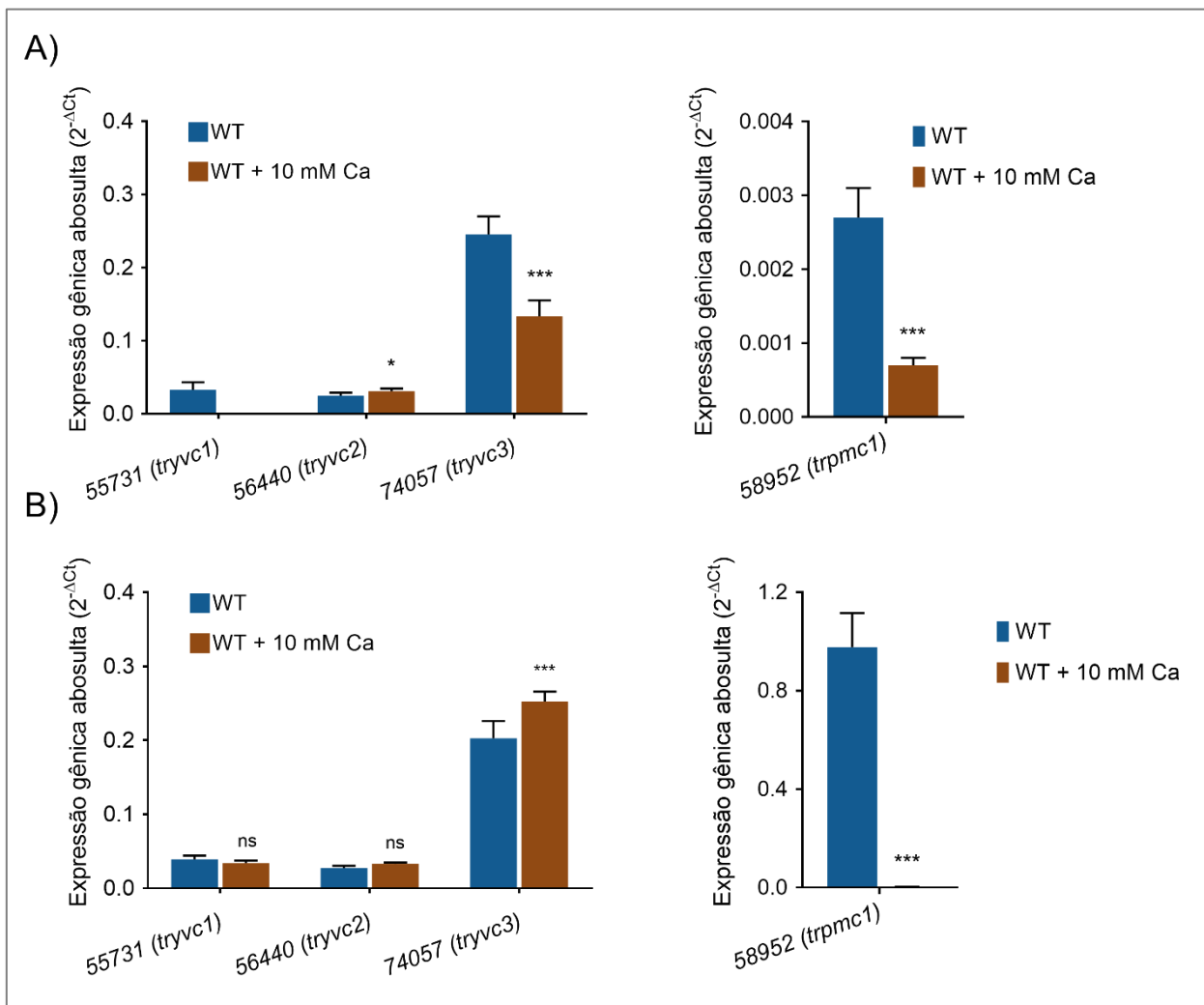
**Figura 6.** Estratégia para confirmação da linhagem mutante. Os primers para detectar o gene alvo estão em verde. Os primers para detectar a inserção do cassete na orientação correta estão em preto e azul.



**Figura 7.** Confirmação da deleção dos genes *tryvc1* (55731) (A-C), *tryvc2* (56440) (D-F), *trpmc1* (58952) (G-I) e *tryvc3* (74057) (J-L).

### 5.3. Expressão das proteínas vacuolares transportadoras de cálcio em celulose e em xilose com e sem a suplementação de cálcio

Para analisar os efeitos do cálcio na expressão dos genes selecionados, foi realizada análise de expressão gênica por meio de RT-qPCR. As fontes de carbono analisadas foram 1% de celulose e 25 mM de xilose, tanto na ausência do metal como com a suplementação do meio com 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Todos os cultivos foram incubados a  $30^\circ\text{C}$  por 24h ou 48h, para celulose e xilose, respectivamente. A linhagem utilizada foi a parental, *QM6aΔtmus53Δpyr4*.



**Figura 8.** Expressão dos genes em estudo em celulose (A) e xilose (B). ns = não significativo, \* = p-valor < 0.05. \*\* = p-valor < 0.01. \*\*\* = p-valor < 0.001 para o teste t de Student.

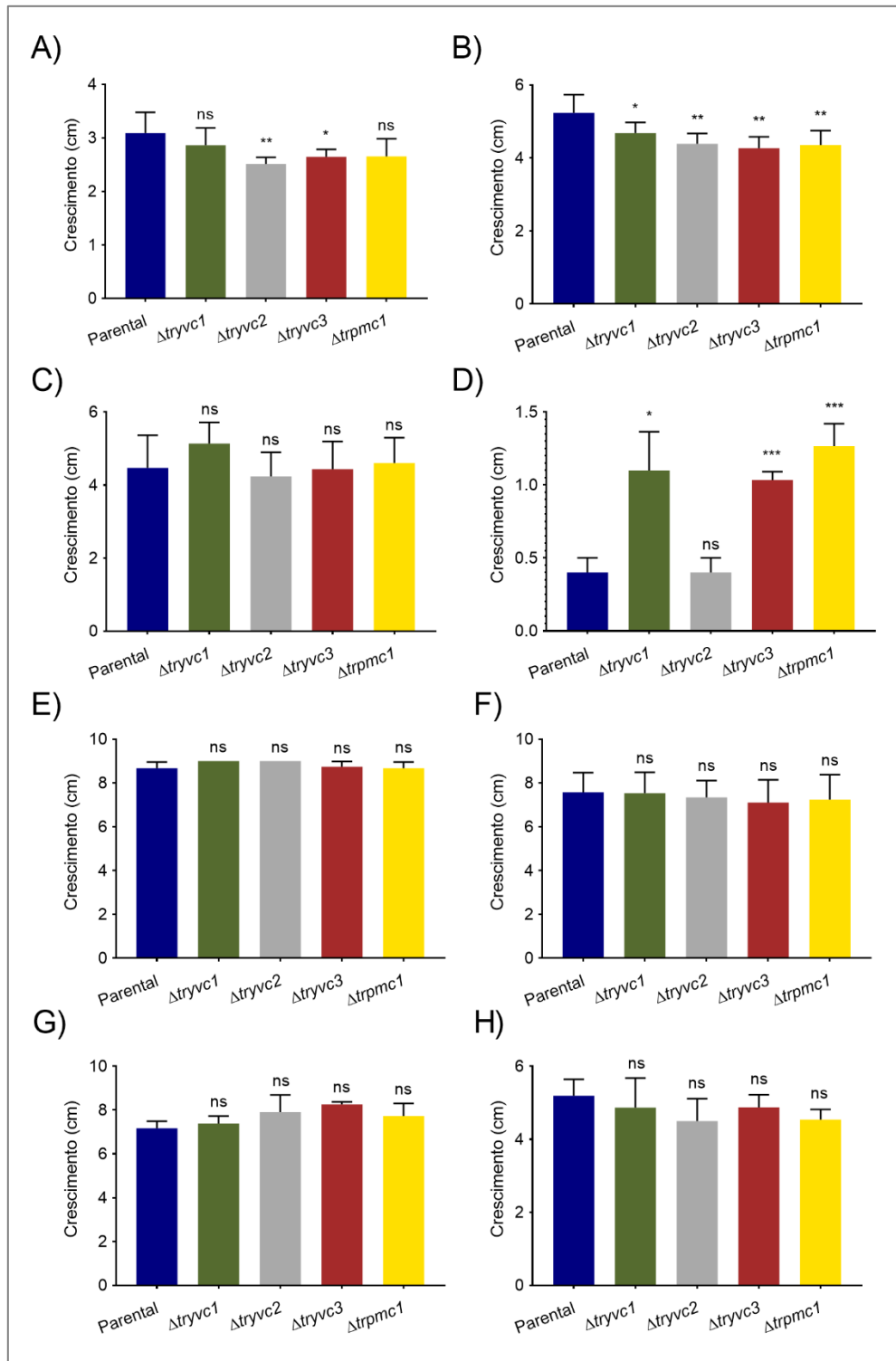
A partir dos resultados obtidos (Figura 8), podemos observar que *tryvc2* é levemente regulado de forma positiva em celulose quando há a adição de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Já o oposto ocorre para *tryvc3* e *trpmc1*, que são regulados negativamente nesta mesma condição. Em xilose, observamos diferenças apenas na expressão de *tryvc3*, que é regulado positivamente na presença de cálcio, e de *trpmc1*, que é regulado negativamente. Ao compararmos celulose e xilose, percebemos que a expressão dos genes que codificam YVC1 é semelhante sem a suplementação de cálcio. Já o gene que codifica PMC1 é muito mais expresso em xilose (0,0027 em celulose e 0,9764 em xilose).

#### **5.4. Análise do crescimento das linhagens mutantes**

Para avaliar os efeitos da ausência dos genes deletados no crescimento das linhagens mutantes, foram realizados experimentos em placas de Petri e microplacas de 96 poços.

Em placas de Petri, foram realizados crescimentos nos meios MM, MA e MEX por 3 ou 5 dias, com as fontes de carbono glicose, CMC, xilose ou xilitol e com ou sem a suplementação de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 9). Assim, foi observado que as linhagens mutantes têm o crescimento reduzido em 1% CMC, sendo  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta tryvc3$  em 3 dias (Figura 9.A) e todas as linhagens em estudo no período de 5 dias (Figura 9.B). Também foi observado que as linhagens  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$  apresentaram maior resistência ao crescimento em glicose com Congo Red (CR) (Figura 9.D), sendo que este efeito ocorre por causa da adição do CR e não devido à fonte de carbono, pois em glicose, não existem diferenças significativas de crescimento entre as linhagens analisadas (Figura 9.C). Observamos também que no meio MEX, com a suplementação de cálcio, não existem diferenças significativas no crescimento, tanto em 10 mM (Figura 9E) como em 200 mM de  $\text{CaCl}_2$  (Figura 9.F). Em xilose (Figura 9.G) e xilitol (Figura 9.H), também não observamos diferenças.

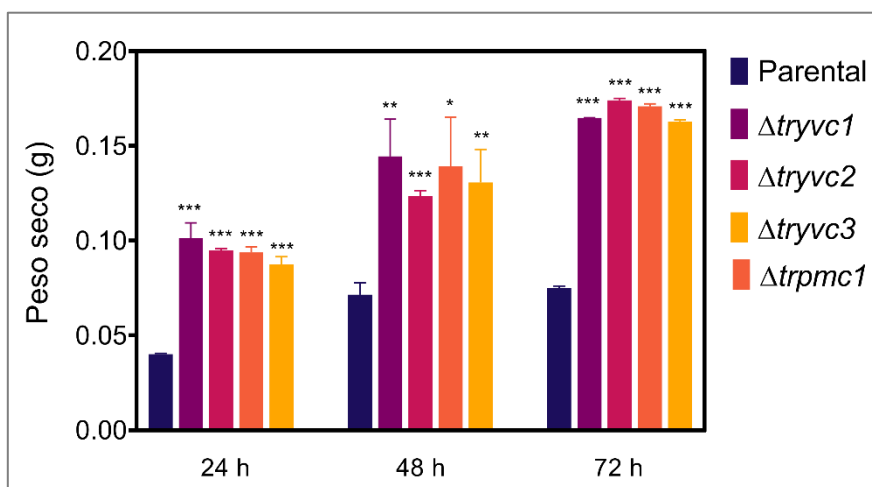




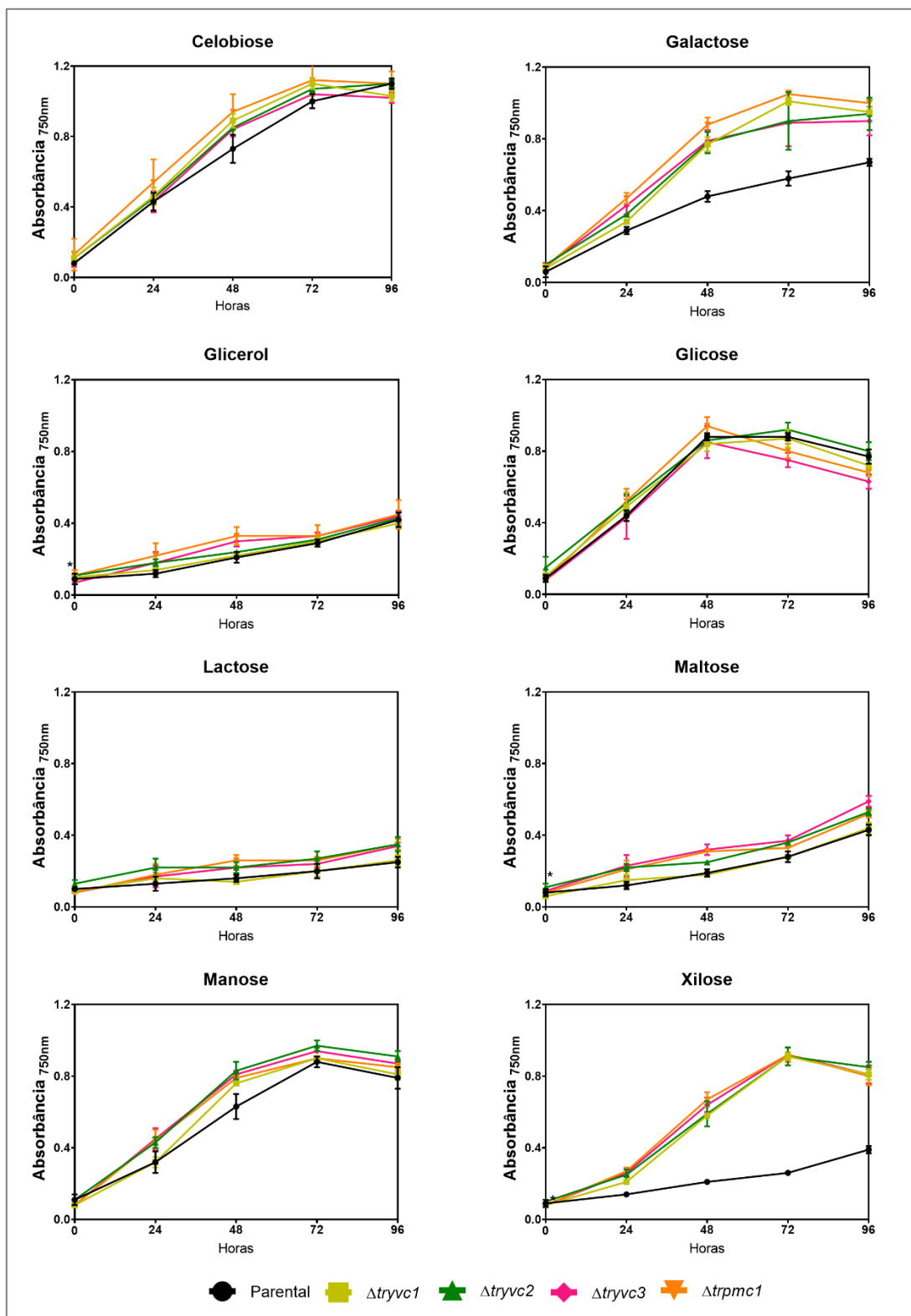
**Figura 9.** Crescimento em placa para análise das linhagens mutantes. A) 1% CMC em MA por 3 dias. B) 1% CMC em MA por 5 dias. C) 2% Glicose em MA por 3 dias. D) 2% Glicose + CR em MA por 3 dias. E) 2% Glicose + 10 mM CaCl<sub>2</sub> em MEX por 3 dias. F) 2% Glicose + 200 mM CaCl<sub>2</sub> em MEX por 3 dias. G) 25 mM Xilose em MM por 5 dias. H) 25 mM Xilitol em MA por 5 dias. Ns = não significativo. \* = p-valor < 0.05, \*\* = p-valor < 0.01 e \*\*\* = p-valor < 0.001 para o test t de Student.

Em microplacas, foram realizados crescimentos em meio MM por um período de 96 horas, com as fontes de carbono celobiose, galactose, glicerol, glicose, lactose, maltose, manose e xilose (Figura 11). Foi possível observar que na presença da maioria das fontes de carbono testadas, as linhagens parental e mutante possuem padrões de crescimento semelhantes, com exceção da galactose e xilose, em que os mutantes apresentaram um crescimento significativamente superior (ANOVA de duas vias, seguida do teste de Tukey para múltiplas comparações – p-valor < 0,001), resultado diferente do crescimento em placa, em que não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas para xilose. Para verificar se a diferença realmente ocorre nesta fonte de carbono, mais um cultivo foi realizado. Desta vez, em meio MA líquido com 25 mM de xilose em frascos que foram incubados em 30 °C durante diferentes períodos. Conforme a Figura 10, de fato observamos uma grande diferença entre o crescimento da linhagem parental e as linhagens mutantes. Desta forma, é possível que a via de sinalização dependente de cálcio esteja envolvida no metabolismo de xilose.

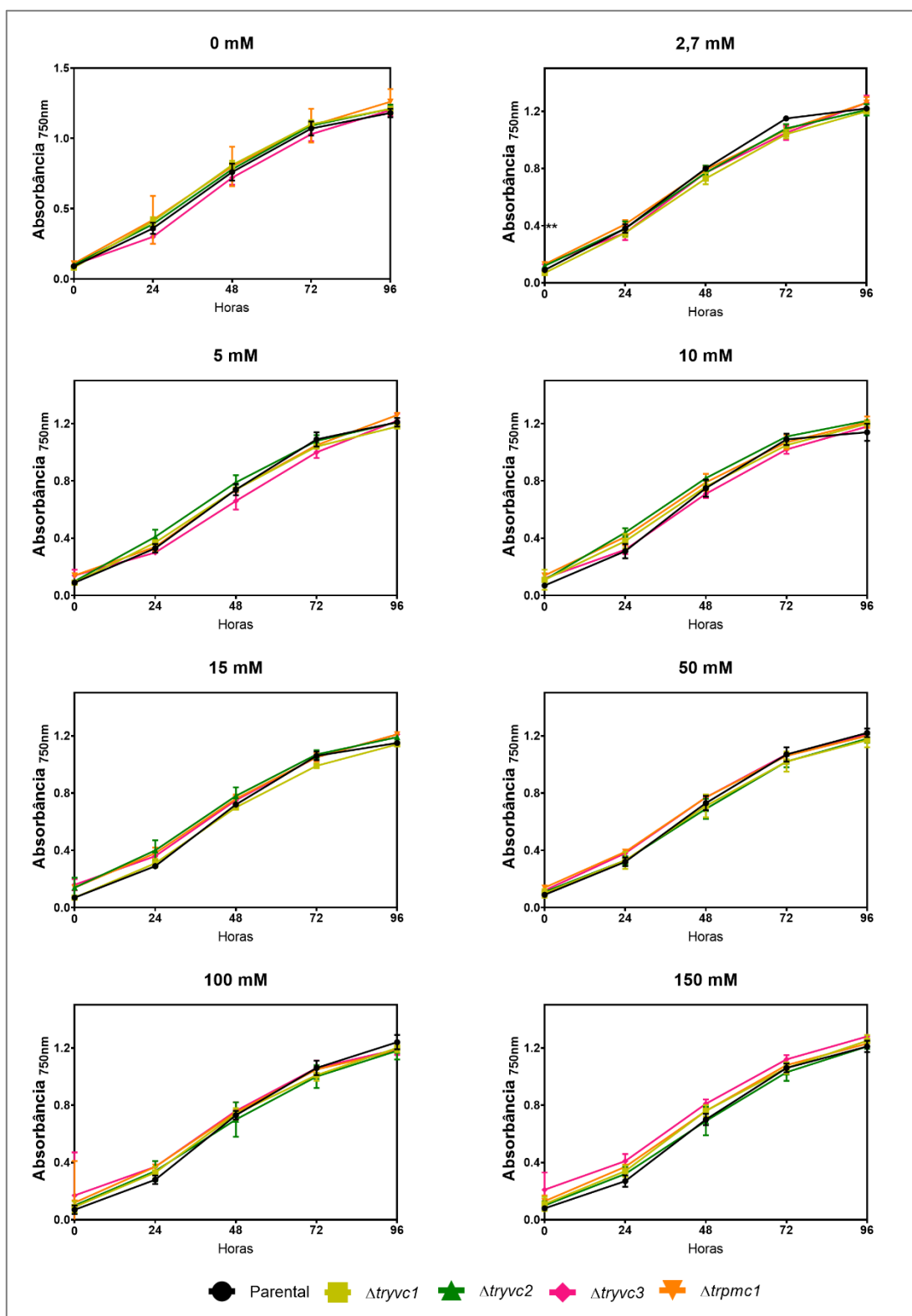
Ainda em microplacas, nas mesmas condições, foram realizados crescimentos com diferentes concentrações de cálcio, com o objetivo de avaliar os efeitos das proteínas em estudo na tolerância deste metal. Entretanto, como observado na Figura 12, não foram detectadas diferenças estatisticamente significativas, o que indica que o transporte do cálcio para os vacúolos não interfere na tolerância de *T. reesei* ao  $\text{CaCl}_2$ .



**Figura 10.** Crescimento em meio MA líquido com a adição de 25 mM de xilose.



**Figura 11.** Perfil de crescimento em microplaca das linhagens parental e mutantes na presença das fontes de carbono celobiose, galactose, glicerol, glicose, lactose, maltose, manose e xilose.



**Figura 12.** Perfil de crescimento em microplaca das linhagens parental e mutantes na presença de diferentes concentrações de  $\text{CaCl}_2$ : 0; 2,7; 5; 10; 15; 50; 100 e 150 mM.

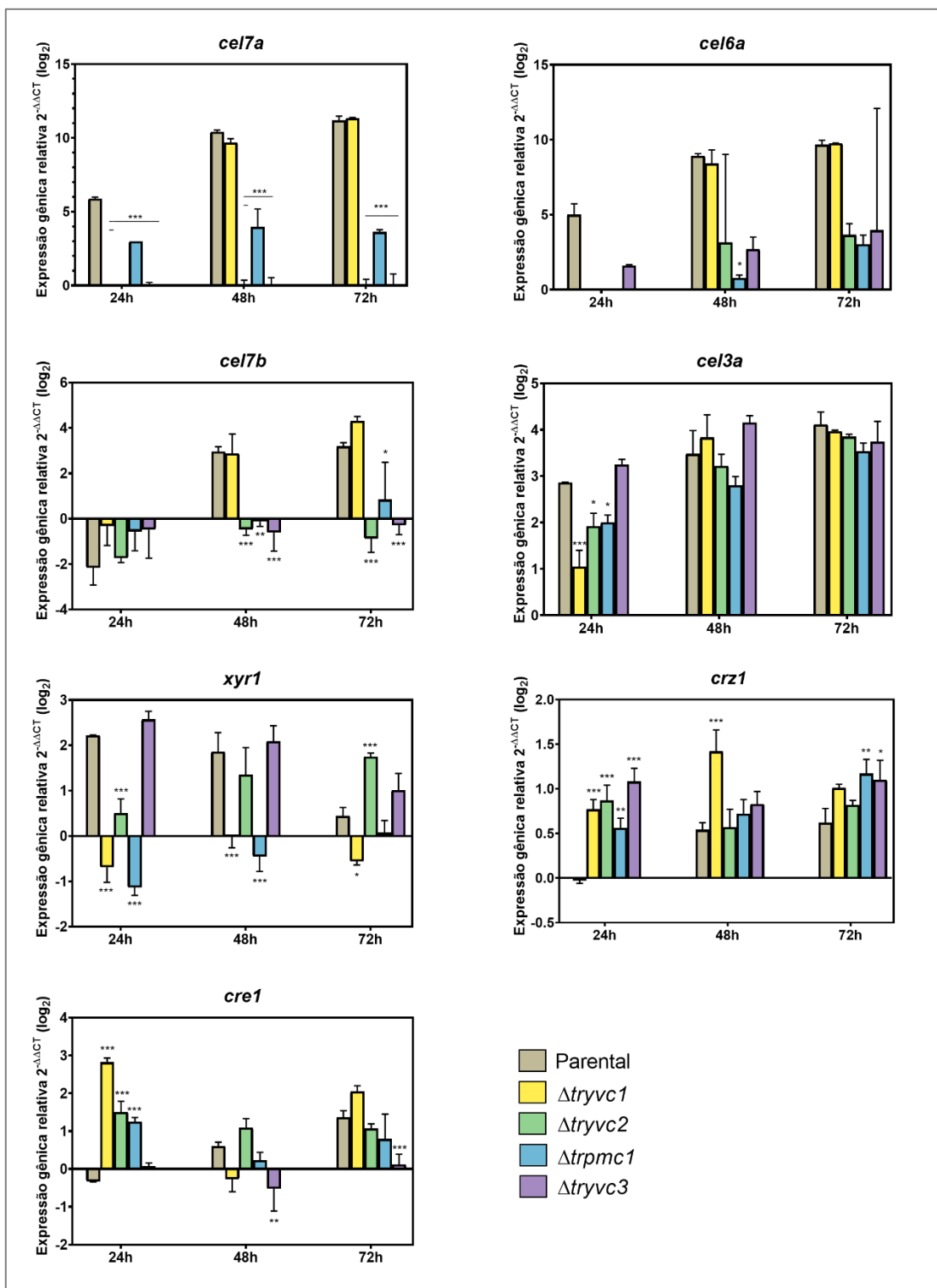
## 5.5. Expressão gênica de celulases, hemicelulases e componentes da via de sinalização dependente de cálcio

Para avaliar o papel das proteínas em estudo na expressão gênica de celulases, hemicelulases e componentes da via de sinalização dependente de cálcio, foram realizados cultivos iniciais em glicose, celulose e bagaço de cana-de-açúcar, sendo os cultivos em celulose e bagaço de cana-de-açúcar precedidos por 24h de crescimento em glicerol para a formação de biomassa.

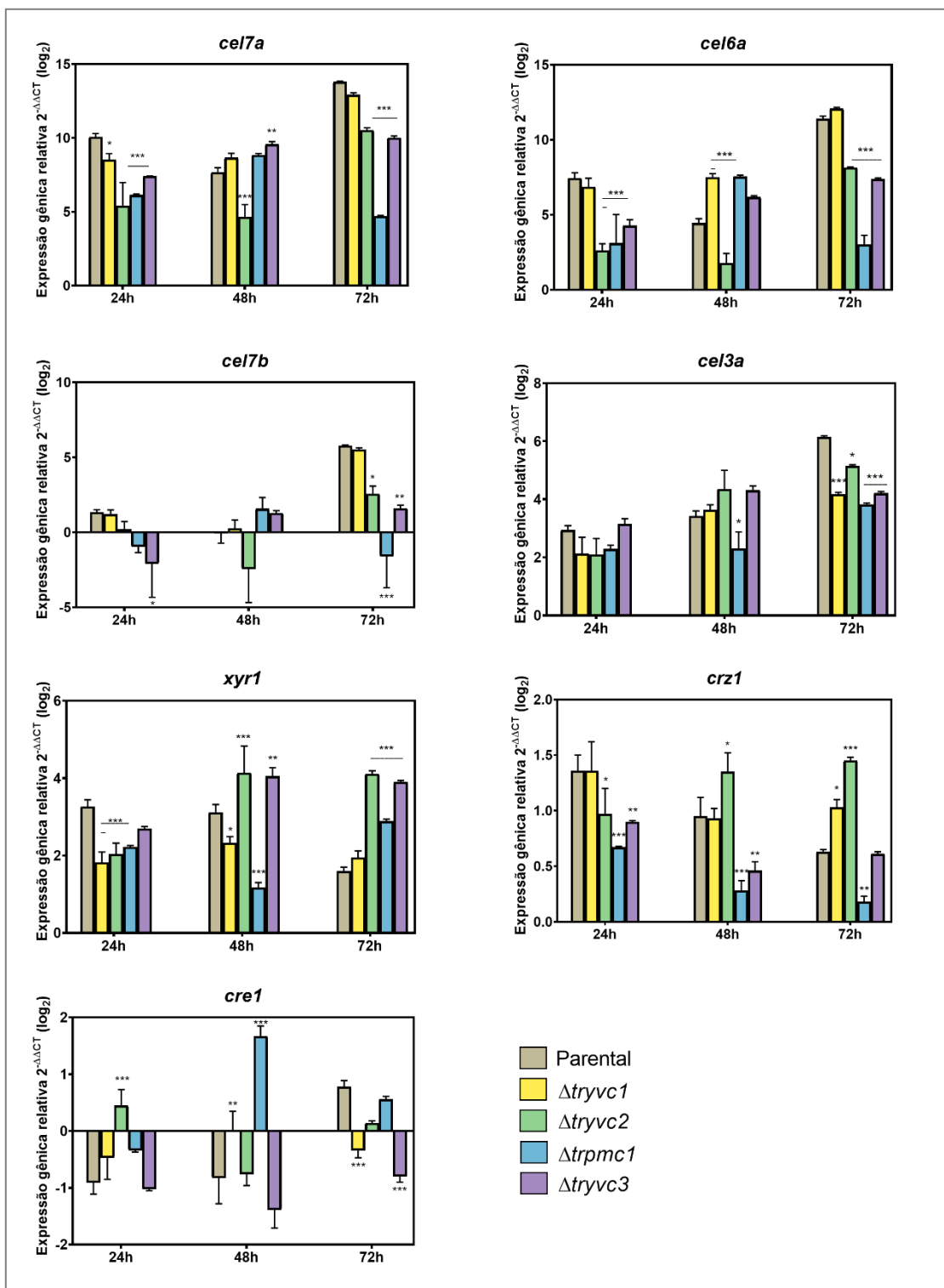
Nos cultivos em celulose (Figura 13), observamos a regulação negativa dos genes *cel7a* e *cel6a*, que codificam CBHI e CHII, respectivamente, em todas as linhagens mutantes, principalmente em  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta tryvc3$  em 24h, quando comparados com a linhagem parental. Já em 48h e 72h, estes valores se aproximam da linhagem parental em  $\Delta tryvc1$ . Esta regulação negativa também é observada para *cel7b* (EG1) em 48h para *tryvc2*,  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$  e para *cel3a* (BGL1) em 24h para  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta trpmc1$ . Estes resultados estão em concordância com a regulação negativa de *xyr1* em  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta trpmc1$  em 24h, assim como a regulação positiva de *cre1* nas mesmas linhagens mutantes em 24h, indicando uma possível função destes genes na regulação positiva de *xyr1* ou negativa de *cre1*. Sobre *crz1*, observamos que a sua indução ocorreu de forma antecipada, em 24h, em todas as linhagens mutantes em relação a linhagem parental.

Nos cultivos em bagaço de cana-de-açúcar (Figura 14) também observamos a regulação negativa das celulases em relação à linhagem parental, embora de forma mais suave. Nesta condição, apenas  $\Delta tryvc2$  apresenta regulação positiva de *cre1* em 24h, o que pode ter resultados nos baixos níveis de *cel6a* e *cel7b* em 48h. Além do efeito em *cre1*, *xyr1* foi regulado negativamente nas linhagens  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta trpmc1$  em 24h, assim como *crz1* em  $\Delta tryvc2$ ,  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$  no mesmo período.

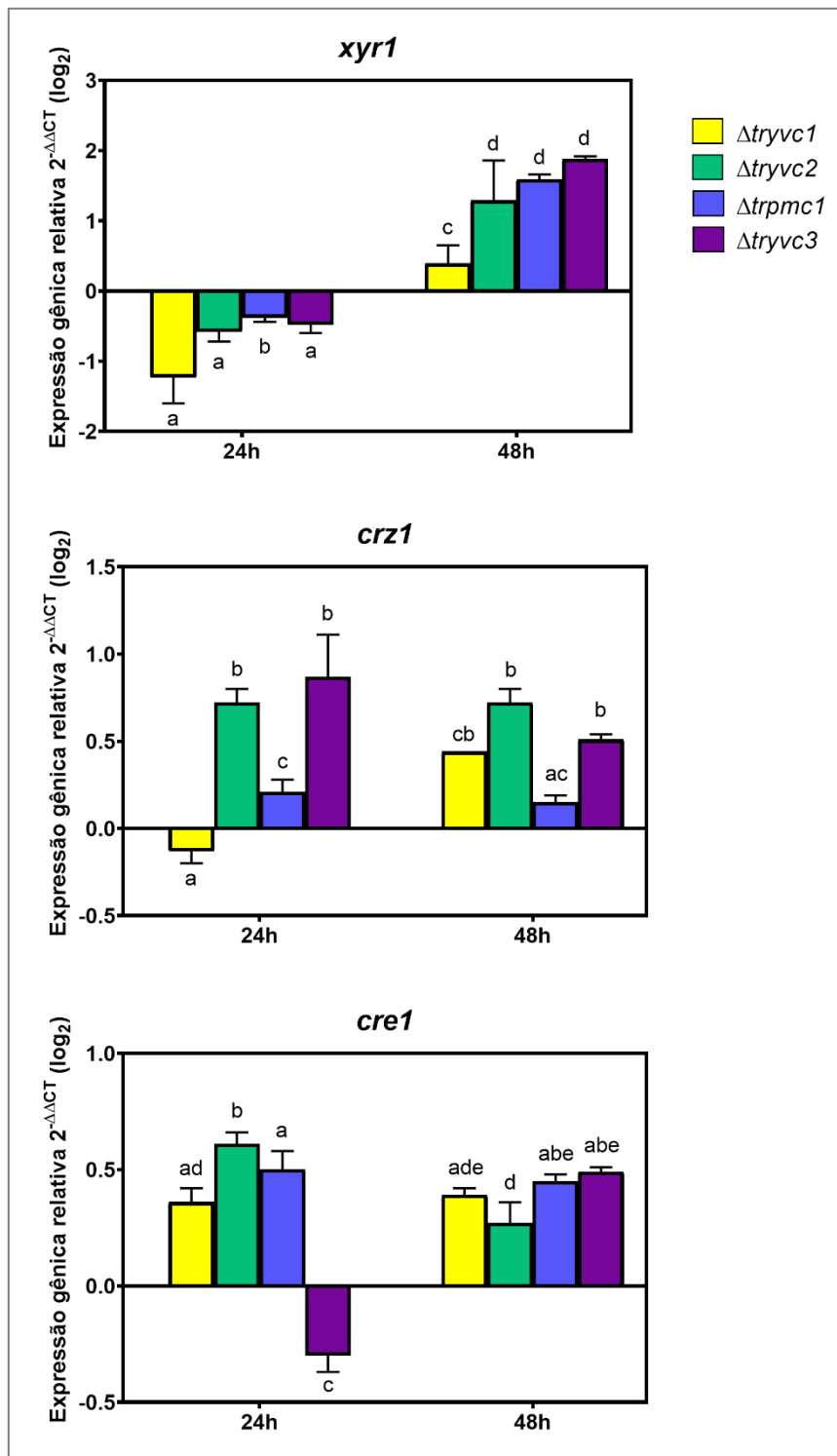
Em glicose (Figura 15), *xyr1* estava reprimido nas linhagens mutantes em 24h, mas induzido em 48h. Além disso, foi possível observar *cre1* induzido em relação à linhagem parental (exceto em  $\Delta tryvc3$  em 24h), indicando que a deleção das proteínas em estudo não altera a CCR que ocorre nesta fonte de carbono.



**Figura 13.** Expressão gênica de fatores de transcrição e celulasas durante cultivo em celulose com pré-crescimento em glicerol. Os p-valores estão representados por: \* < 0.03; \*\* < 0.002 e \*\*\* < 0,001, em relação à linhagem parental. A análise estatística realizada foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey.



**Figura 14.** Expressão gênica de fatores de transcrição e celulasas durante cultivo em bagaço de cana-de-açúcar com pré-crescimento em glicerol. Os p-valores estão representados por: \* < 0.03; \*\* < 0.002 e \*\*\* < 0,001, em relação à linhagem parental. A análise estatística realizada foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey.



**Figura 15.** Expressão gênica de fatores de transcrição durante cultivo em glicose. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p$ -valor < 0.03) em relação à linhagem parental. A análise estatística realizada foi o ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Tukey.

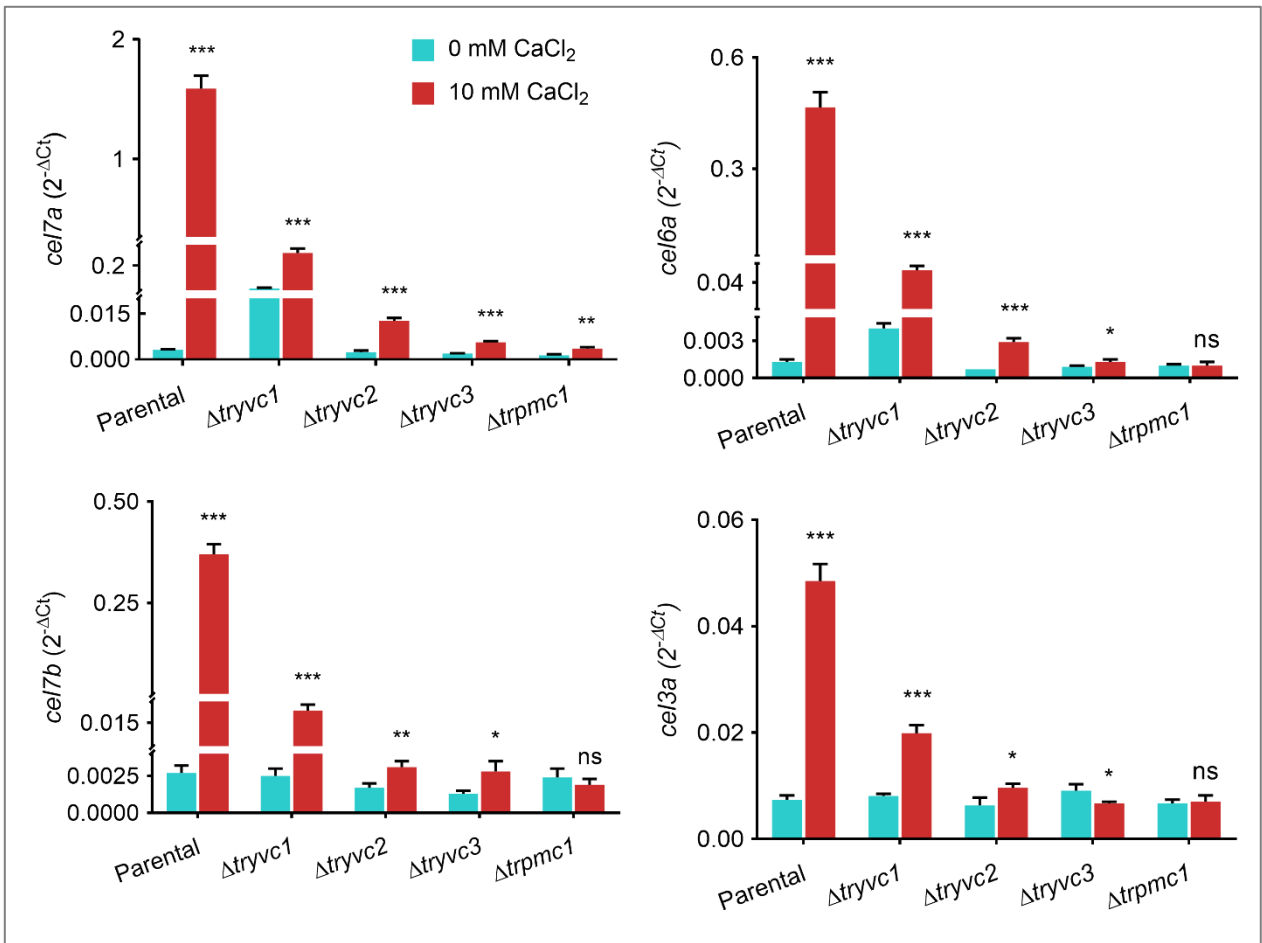


Outras análises de expressão foram realizadas, desta vez a partir de cultivos feitos diretamente em celulose, sem pré-crescimento, e também de cultivos em xilose.

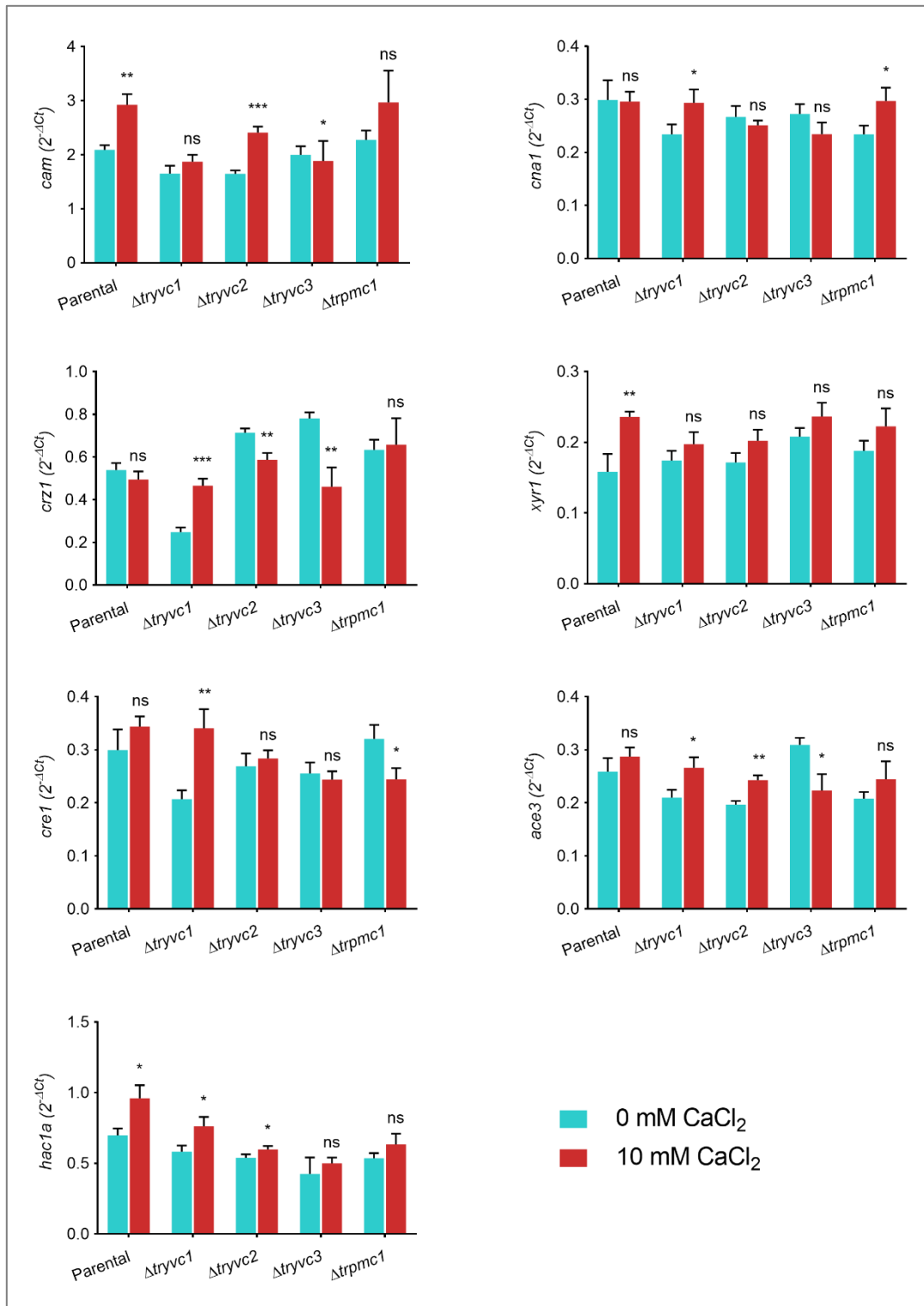
Em celulose, observamos um grande aumento na expressão de *cel7a*, *cel6a*, *cel7b* e *cel3a* quando realizada a suplementação do meio com 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. Para *cel7a*, a expressão na linhagem parental é cerca de 5, 124, 285 e 457 vezes maior do que nas linhagens  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$ ,  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$ , respectivamente, sendo que este mesmo perfil de diferença se repete para as outras celulases analisadas.

Ao verificar a expressão dos fatores de transcrição *xyr1*, *crz1*, *ace3*, *hac1a* e *cre1*, é possível observar diferenças estatisticamente significativas apenas para *xyr1* e *hac1a* na linhagem parental suplementada com CaCl<sub>2</sub>, em relação ao controle, sem suplementação, o que é condizente com o aumento de expressão detectado nas celulases. Já nas linhagens mutantes, este aumento em *xyr1* não ocorreu, e para *hac1a*, ele foi observado apenas nas linhagens  $\Delta tryvc1$  e  $\Delta tryvc2$ , mas ainda em grau menor do que na linhagem parental. Adicionalmente, foi observado um aumento na expressão de *crz1* e *cre1* em  $\Delta tryvc1$  quando realizada a suplementação com CaCl<sub>2</sub> e uma diminuição na expressão de *crz1* em  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta tryvc3$ .

Ao analisar a expressão dos componentes da via de sinalização dependente de cálcio, calmodulina (*cam*) e calcineurina (*cna1*), foi possível observar o aumento da expressão de *cam* na linhagem parental e em  $\Delta tryvc2$  e a diminuição da expressão do mesmo gene em  $\Delta tryvc3$ , ambos com a adição de cálcio, assim como a regulação positiva de *cna1* em  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta trpmc1$ .

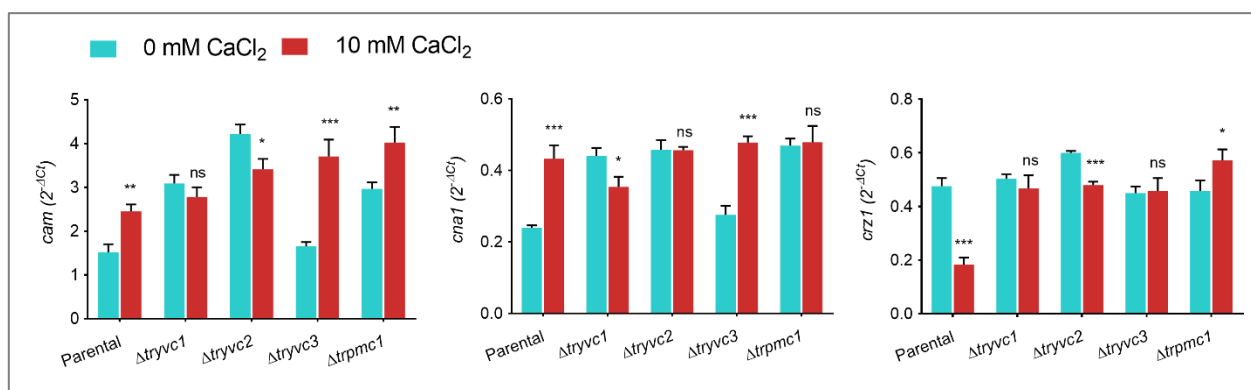


**Figura 16.** Expressão gênica de celulasas durante cultivo direto em meio MA com 1% de celulose por 24h. Os p-valores estão representados por: \* < 0.05; \*\* < 0.01 e \*\*\* < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl<sub>2</sub> (teste t de Student).



**Figura 17.** Expressão gênica de componentes da via de sinalização mediada por cálcio e fatores de transcrição durante cultivo direto em meio MA com 1% de celulose por 24h. Os p-valores estão representados por: \* < 0.05; \*\* < 0.01 e \*\*\* < 0,001, em relação à condição 0 mM  $CaCl_2$  (teste t de Student).

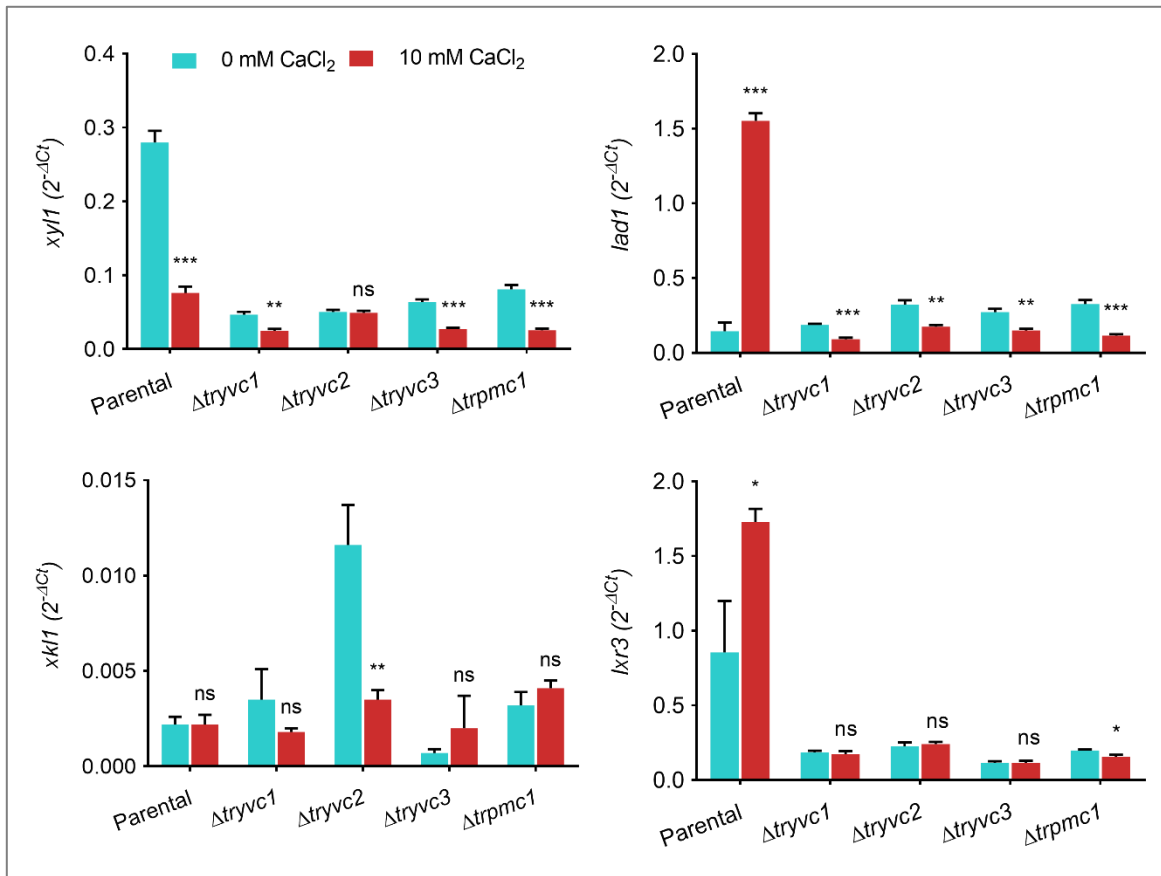
Em xilose, onde observamos que as linhagens mutantes cresceram mais que a linhagem parental (Figura 10), observamos que a expressão de *cam* e *cna1* foi menor na linhagem parental do que em  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta trpmc1$ . Já em relação ao fator de transcrição *crz1*, não houve diferença. Quando o meio foi suplementado com cálcio, a expressão de *cam* e *cna1* aumentou na linhagem parental, apesar da expressão de *crz1* apresentar uma redução (Figura 18).



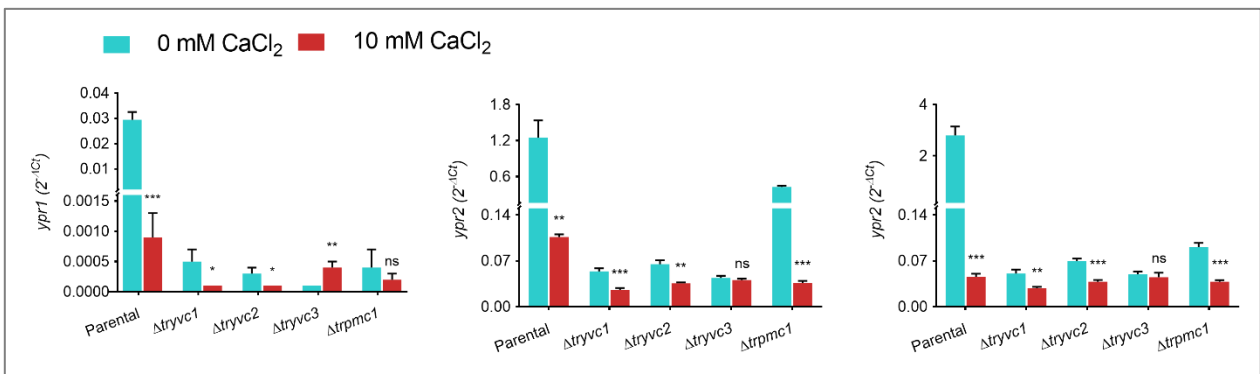
**Figura 18.** Expressão gênica de componentes da via de sinalização mediada por cálcio durante cultivo direto em meio MA com 25 mM de xilose por 48h. Os p-valores estão representados por: \* < 0.05; \*\* < 0.01 e \*\*\* < 0,001, em relação à condição 0 mM CaCl<sub>2</sub> (teste t de Student).

Ao analisar a expressão dos genes que codificam enzimas do metabolismo de xilose (Figura 19), observamos que sem a suplementação com cálcio, *xyl1* e *lxr3* são mais expressos na linhagem parental do que nas linhagens mutantes. Além disso, *xkl1* é mais expresso em  $\Delta tryvc2$  do que nas demais linhagens em estudo. Já com a adição de 10 mM de CaCl<sub>2</sub>, observamos a regulação negativa de *xyl1* e positiva de *lad1* e *lxr3* na linhagem parental, quando comparada com a mesma linhagem, sem a adição do metal. Este mesmo perfil é observado em  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$  para *xyl1*.

Por fim, foi analisada a expressão de genes relacionados à produção do pigmento amarelo, um sorbicilinoide, produzido por *T. reesei*. Tanto os fatores de transcrição *ypr1* e *ypr2*, como o gene *sor1*, envolvido em sua produção, estão reprimidos nas linhagens mutantes. Com a adição de cálcio no meio, a expressão destes genes é reduzida e o mesmo efeito é observado nas linhagens mutantes.



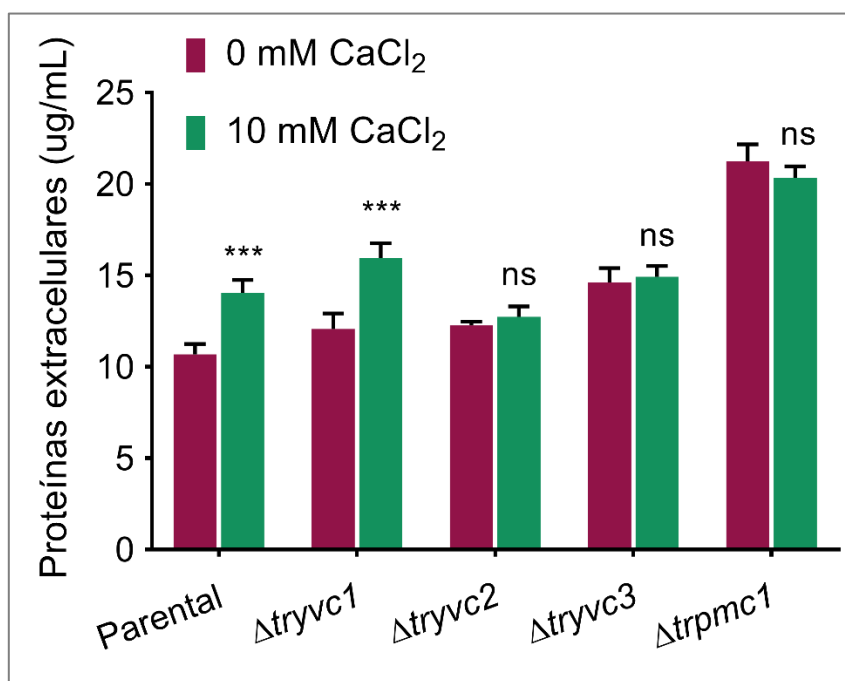
**Figura 19.** Expressão gênica de componentes do metabolismo de xilose durante cultivo direto em meio MA com 25 mM de xilose por 48h. Os p-valores estão representados por: \*  $< 0.05$ ; \*\*  $< 0.01$  e \*\*\*  $< 0,001$ , em relação à condição 0 mM  $CaCl_2$  (teste t de Student).



**Figura 20.** Expressão gênica de componentes da produção de sorbicilinoide durante cultivo direto em meio MA com 25 mM de xilose por 48h. Os p-valores estão representados por: \*  $< 0.05$ ; \*\*  $< 0.01$  e \*\*\*  $< 0,001$ , em relação à condição 0 mM  $CaCl_2$  (teste t de Student).

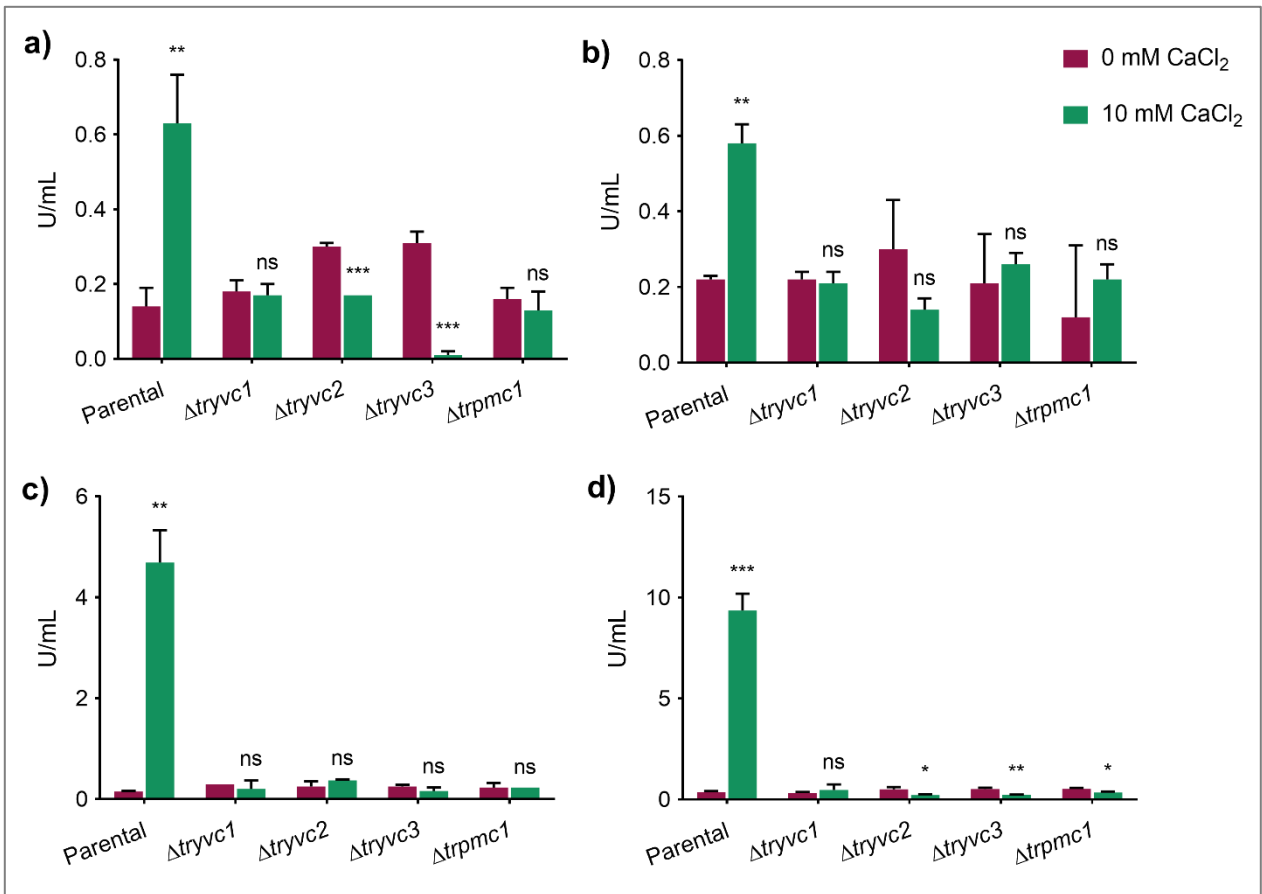
## 5.6. Atividade enzimática nas linhagens mutantes

Com o objetivo de avaliar os efeitos da deleção dos genes que codificam proteínas vacuolares transportadoras de cálcio na produção de celulases e hemicelulases, a linhagem parental e as linhagens mutantes foram cultivadas em meio MA com 1% celulose com e sem a suplementação de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$ . Como ilustrado na Figura 21, houve um aumento da produção de proteínas extracelulares na linhagem parental e em  $\Delta\text{tryvc1}$  quando o meio foi suplementado com cálcio. Já nas outras linhagens em estudo, não houveram diferenças estatisticamente significativas.



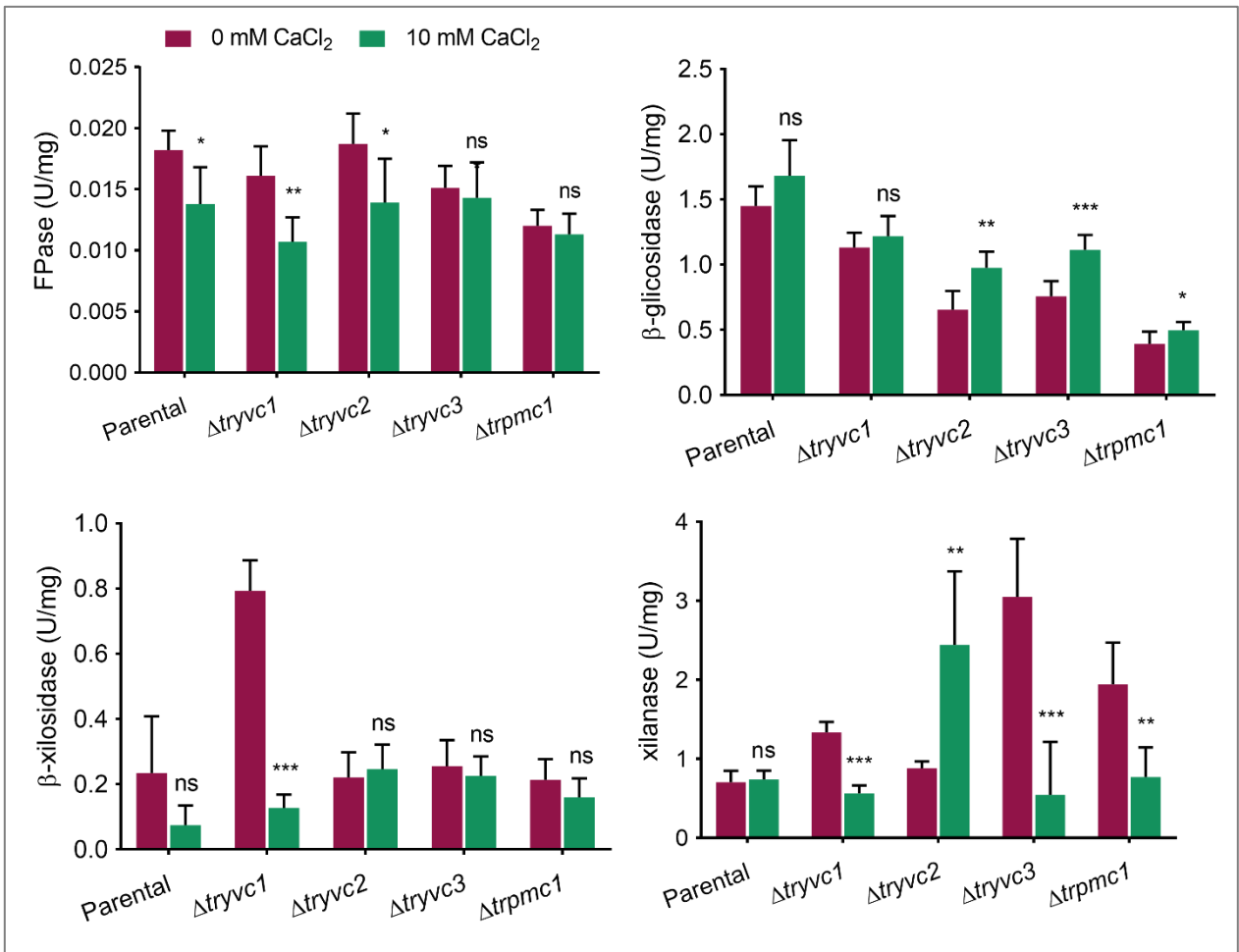
**Figura 21.** Concentração de proteínas no sobrenadante de *T. reesei* cultivado em meio MA com 1% celulose por 24h. Os p-valores estão representados por: \* < 0.05; \*\* < 0.01 e \*\*\* < 0,001, em relação à condição 0 mM  $\text{CaCl}_2$  (teste t de *Student*).

Ao avaliar a atividade de CMCase (endoglucanases) (Figura 22), observamos que houve um aumento na linhagem parental em todos os tempos analisados: 24, 48, 72 e 96h. Este aumento não foi observado nas linhagens mutantes, o que está em concordância com o observado nos dados de expressão gênica (Figura 16).



**Figura 22.** Atividade de CMCase. Linhagens de *T. reesei* foram cultivadas por a) 24, b) 48, c) 72 e d) 96h com ou sem a suplementação de CaCl<sub>2</sub> (\*p < 0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 Teste t de Student).

Também foram avaliadas as atividades de FPase (celulase total),  $\beta$ -glicosidase,  $\beta$ -xilosidase e xilanase (Figura 23). Comparando a condição com a suplementação de cálcio com a condição sem suplementação, para FPase, foi observada uma redução na linhagem parental e nos mutantes  $\Delta$ tryvc1 e  $\Delta$ tryvc2. Para  $\beta$ -glicosidase, o aumento da atividade em  $\Delta$ tryvc2,  $\Delta$ tryvc3 e  $\Delta$ trpmc1. Para  $\beta$ -xilosidase, uma redução na linhagem parental e em  $\Delta$ tryvc1 e para xilanase, o aumento em  $\Delta$ tryvc2 e a redução em  $\Delta$ tryvc1,  $\Delta$ tryvc3 e  $\Delta$ trpmc1.

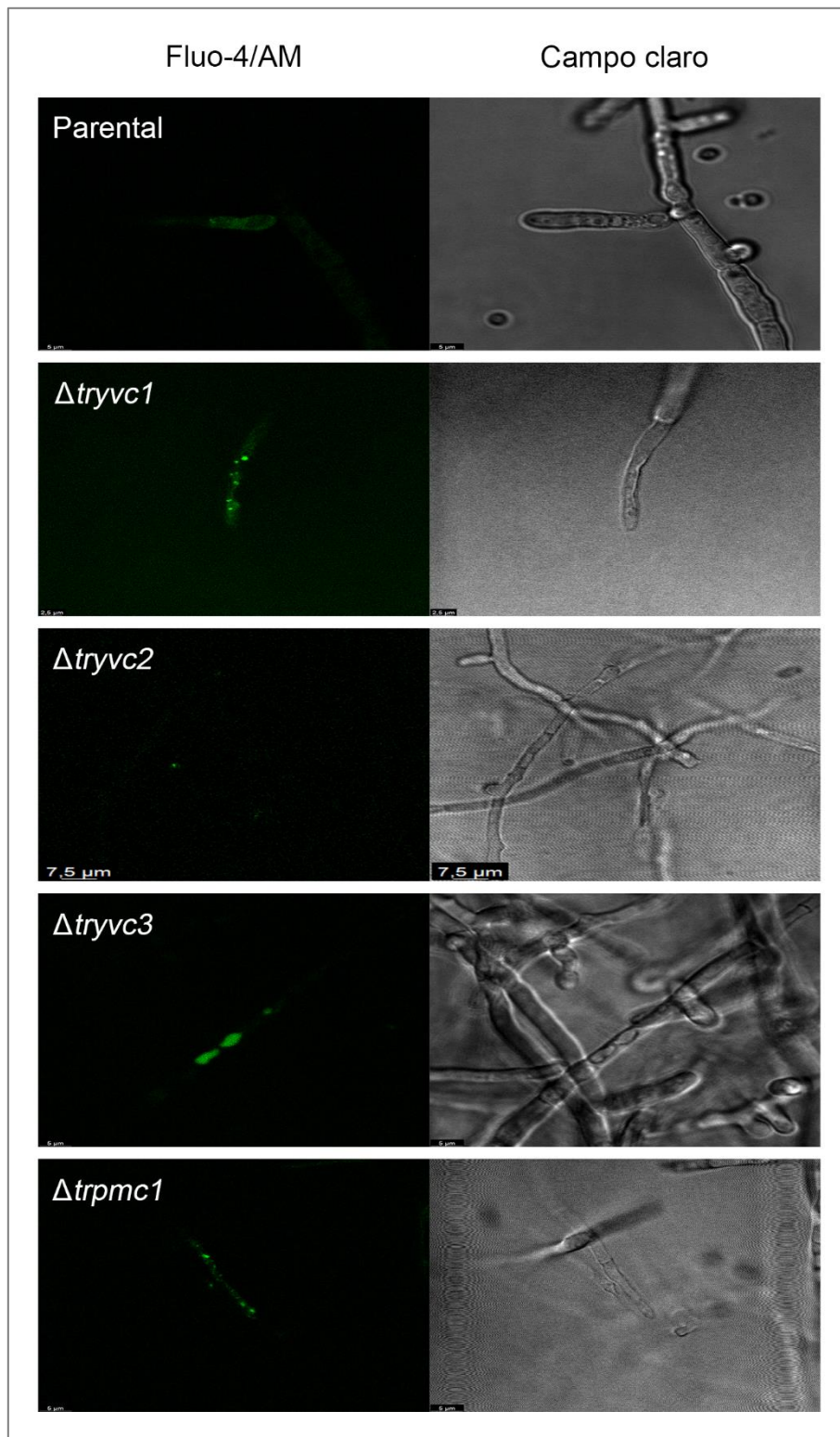


**Figura 23.** Atividade de FPase, β-glicosidase, β-xilosidase e xilanase. Linhagens de *T. reesei* foram cultivadas 24h com ou sem a suplementação de CaCl<sub>2</sub> (\*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 Teste t de Student).

## 5.7. Microscopia

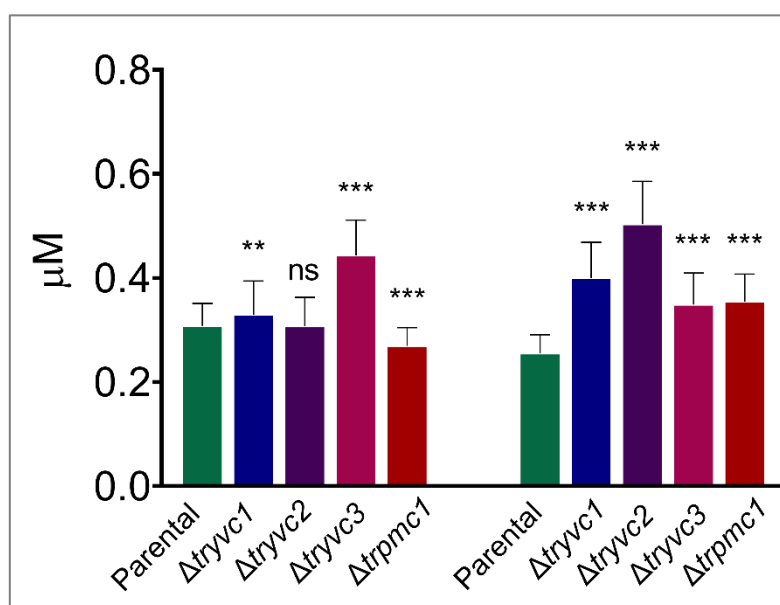
Para melhor entender os efeitos observados nas linhagens mutantes sem as proteínas vacuolares transportadoras de cálcio, o cálcio intracelular foi marcado por meio do Fluo-4/AM, em cultivos com meio MA adicionado de 25 mM de xilose e 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. Como observado na Figura 24, o cálcio aparece mais distribuído na linhagem parental, sem pontos fortes indicando maior concentração, como nas linhagens mutantes. É possível que nestas linhagens, o cálcio esteja acumulado nos vacúolos, já que proteínas que atuam no seu transporte foram deletadas.



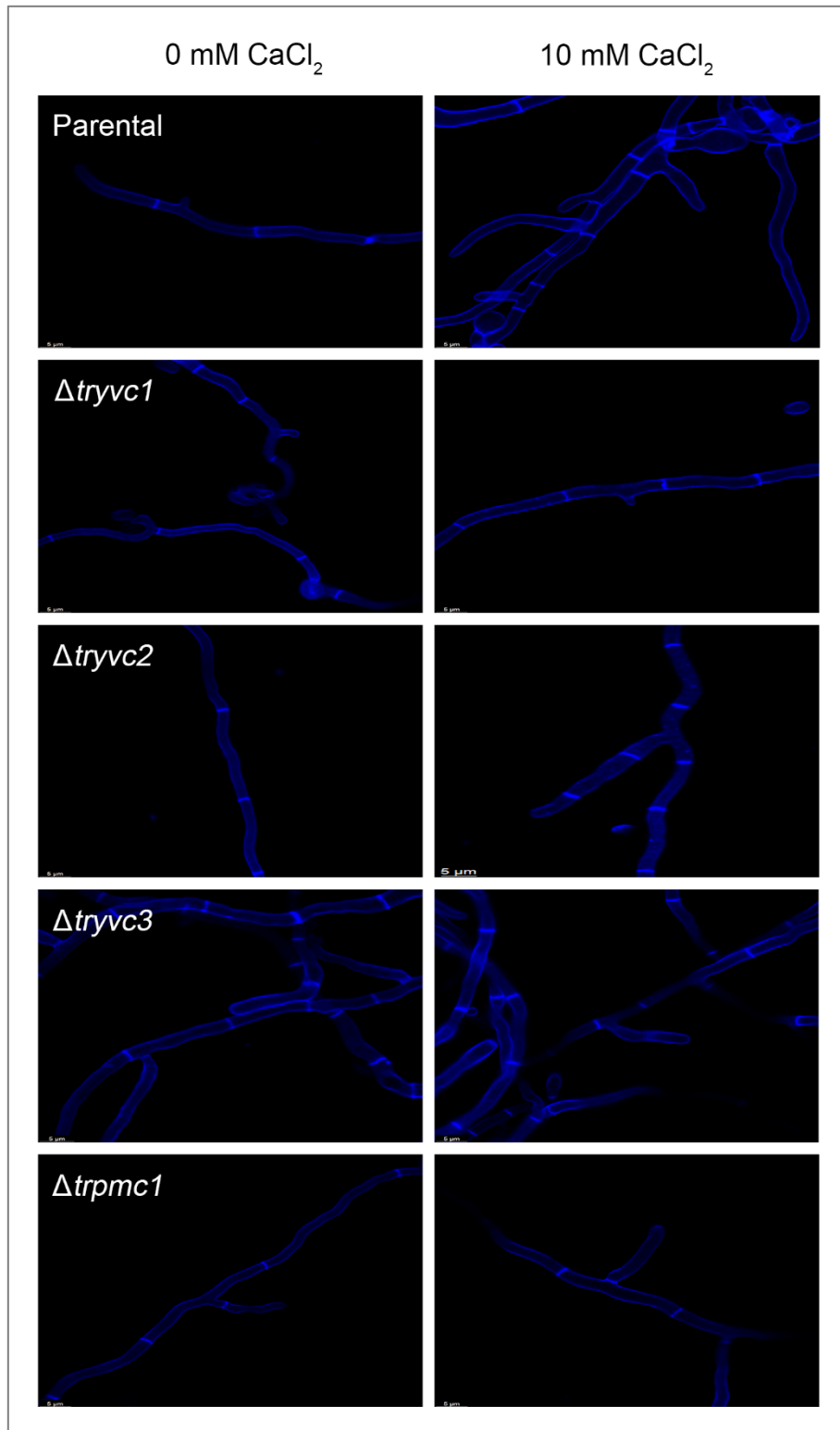


**Figura 24.** Microscopia confocal de *T. reesei* em meio MA + 25 mM xilose. O cálcio intracelular foi marcado por meio do Fluo-4/AM.

Como foi observado que as linhagens mutantes  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$  são mais resistentes ao estresse de parede provocado pelo CR do que a linhagem parental, a espessura da parede das linhagens em estudo foi obtida e calculada com o auxílio da marcação calcofluor white (CFW). Desta forma, foi possível observar que houve um espessamento da parede em todas as linhagens mutantes quando cálcio foi adicionado, entretanto, sem cálcio, apenas as linhagens  $\Delta tryvc1$  e  $\Delta tryvc3$  foram detectadas como mais espessas do que na linhagem parental (Figura 25 e Figura 26).



**Figura 25.** Espessura da parede celular de *T. reesei* em meio MA com 25 mM de xilose com e sem a adição de 10 mM de CaCl<sub>2</sub>.



**Figura 26.** Microscopia confocal de *T. reesei* em meio MEX tratado com CFW.

***Discussão***

---

## 6. DISCUSSÃO

*Trichoderma reesei* é um dos fungos filamentosos mais estudados para a produção de celulases e hemicelulases. Neste trabalho, identificamos genes que possivelmente codificam proteínas vacuolares envolvidas no transporte de cálcio, analisamos os seus perfis de expressão em diversos dados de RNA-Seq obtidos pelo grupo e então construímos linhagens mutantes com a deleção dos genes 55731, 56440, 74057 e 58952, que foram denominadas de  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$ ,  $\Delta tryvc3$  e  $\Delta trpmc1$ , respectivamente. O fenótipo destas linhagens foi analisado, assim como a atividade de suas enzimas celulolíticas, a expressão de genes relacionados à degradação da biomassa lignocelulósica. Por fim, ensaios de microscopia foram realizados para confirmar a localização do cálcio no interior das células de *T. reesei* nas linhagens parental e mutante.

Por meio de análises de bioinformática, foram identificadas 5 possíveis YVC1, 7 possíveis VCX1 e 21 possíveis PMC1, apesar de que apenas 10 foram anotadas como proteínas que transportam cálcio, sendo as outras prováveis proteínas transportadoras de fosfolípídeos ou outros metais. Além disso, foram identificadas proteínas dos tipos SERCA (*sarcoplasmic/endoplasmic reticulum* Ca<sup>2+</sup>-ATPase) e PMCA (*plasma membrane* Ca<sup>2+</sup>-ATPase), isso porque proteínas presentes em outros compartimentos celulares podem ser semelhantes às proteínas de transporte vacuolar (TISI et al., 2016) e por isso também foram detectadas durante as análises deste trabalho. Adicionalmente, estas proteínas podem estar localizadas tanto na membrana plasmática como nos vacúolos, como é o caso das Ca<sup>2+</sup>-ATPases NCA-2 e NCA-3 de *N. crassa* (BOWMAN et al., 2011b). Semelhante aos dados obtidos neste trabalho, na análise realizada por (SCHMOLL et al., 2016a), foram identificados três canais iônicos, 10 ATPases e 10 transportadores de cálcio relacionados ao transporte de cálcio em *T. reesei*. Em *Colletotrichum graminicola*, quatro proteínas homólogas a YVC1 foram identificadas (LANGE et al., 2016b), enquanto em *Aspergillus fumigatus*, três homólogos de PMC1 e quatro homólogos de VCX1 foram identificados (DINAMARCO et al., 2012b). Em *Beauveria bassiana*, três homólogos de PMC1 foram identificados (WANG et al., 2017b).

Ao analisarmos os perfis de expressão das proteínas identificadas nos dados de RNA-Seq obtidos pelo grupo (ANTONIETO et al., 2019; CASTRO et al., 2014; DE PAULA et al., 2018a; DOS SANTOS CASTRO et al., 2014; SILVA et al., 2023), observamos que os níveis de expressão são diferentes inclusive entre as linhagens geralmente utilizadas como parentais em estudos funcionais (Figura 3, Figura 4 e Figura 5): QM6a, QM9414 e TU6 (PETERSON; NEVALAINEN, 2012), indicando que as mutações presentes nestas linhagens, que resultam em uma maior produção de celulases, podem estar envolvidas na via de sinalização mediada por cálcio. Ainda, foi possível observar que a expressão dos genes em estudo pode ser regulada pelos fatores de transcrição XYR1, CRE1 e AZF1, assim como pode estar envolvida com a via de sinalização MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), já que estas proteínas também foram diferencialmente expressas nestas análises. Em concordância com estes dados, foi demonstrado que a calmodulina, um importante componente da via de sinalização mediada por cálcio, se liga a uma proteína integral de membrana ativando a via de sinalização MAPK em *Candida albicans* (DAVIS; ZUCCHI; KUMAMOTO, 2013). Além disso, em *B. bassiana*, foi demonstrado que a inativação de Slt2/Mpk1 reprimiu a atividade fosfatase da calcineurina (HUANG et al., 2015).

A fonte de carbono também pode influenciar na expressão das proteínas em estudo, por exemplo, em *S. cerevisiae* (GROPPI et al., 2011) foi demonstrado que a adição de glicose provoca a entrada de cálcio para o interior da célula e que este processo pode estar relacionado ao canal vacuolar YVC1, já que sua deleção resultou em uma linhagem em que esta resposta foi atenuada.

A partir destes dados, as proteínas de JGI ID 55731, 56440, 74057 e 58952 foram selecionadas para obtenção de linhagens mutantes com a deleção de seus respectivos genes, para que fosse possível compreender melhor a via de sinalização dependente de cálcio. Estas proteínas foram nomeadas TrYVC1, TrYVC2, TrYVC3 e TrPMC1, respectivamente. As análises de crescimento destas linhagens demonstraram que elas apresentam crescimento reduzido em CMC, mas crescimento aumentado em xilose, CR e galactose (Figura 9, Figura 10, Figura 11), quando comparadas com a linhagem parental. Além disso, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos

crescimentos em diferentes concentrações de cálcio e outras fontes de carbono (Figura 12).

Proteínas vacuolares transportadoras de cálcio homólogas às investigadas neste estudo já foram funcionalmente caracterizadas em outros fungos. YVC1 é um canal de cálcio que pode ser ativado por este metal ou também outros metais como o manganês, magnésio e zinco (TISI et al., 2016), promovendo então a saída de cálcio dos vacúolos. Em *C. albicans*, YVC1 está localizado nos vacúolos e a deleção de *yvc1* afetou a resposta ao estresse, a patogênese e a morfogênese. Além disso, a estrutura Spitzenkörper, localizada nas extremidades das hifas e essencial para o crescimento destas, não foi encontrado nesta linhagem mutante, indicando a importância de YVC1 para o crescimento polarizado (YU et al., 2014b). Em *S. cerevisiae*, não foram encontradas diferenças fenotípicas na linhagem com a ausência de YVC1, exceto o aumento da resistência ao estresse oxidativo (POPA et al., 2010). Em *A. fumigatus*, YVC1 foi localizado nos vacúolos e foi demonstrado que a deleção do gene correspondente está envolvida na diminuição da formação de biofilme e na virulência do fungo (DE CASTRO et al., 2014b).

Sobre PMC1, os genes correspondentes às suas três proteínas homólogas (PmcA, PmcB e PmcC) em *A. fumigatus* foram alvo de deleção, entretanto, foi demonstrado que a ausência de PmcC é letal. Nas linhagens sem *pmcA* e *pmcB*, o crescimento foi reduzido quando o meio foi suplementado com cálcio, mas aumentado com a adição de manganês. Adicionalmente, foi demonstrado que PmcA é essencial para a virulência do fungo. Em *B. bassiana*, três homólogos também foram estudados,  $\Delta pmcA$ ,  $\Delta pmcB$  e  $\Delta pmcC$ , sendo os fenótipos destas linhagens bem distintos, já que *pmcC* essencial para a sobrevivência do fungo, *pmcA* cresce normalmente e *pmcB* tem o crescimento reduzido em condições normais (WANG et al., 2017b). Em *S. cerevisiae*, a deleção de PMC1 impossibilita a levedura de crescer em ambientes ricos em cálcio (CUNNINGHAM; FINK, 1994b).

Estes dados mostram que o fenótipo das linhagens com a ausência de YVC1 são diversos. Enquanto algumas características são semelhantes entre *T. reesei* e outros fungos, como a ausência de alteração no crescimento com diferentes concentrações de cálcio; até o momento, não foram encontrados estudos relacionando as proteínas YVC1

e PMC1 ao crescimento em xilose, galactose e CMC, como os encontrados em *T. reesei* neste trabalho.

Foi observado que a expressão de celulases, assim como a atividade de CMCase é altamente induzida quando realizada a suplementação do meio de cultivo com cálcio. Este efeito já foi demonstrado em *T. reesei* (CHEN et al., 2016b), mas na linhagem parental RUT-C30. Neste trabalho a linhagem parental utilizada foi a QM6a $\Delta$ tmus53 $\Delta$ pyr4. Esta linhagem possui a expressão e produção de celulases menor, quando comparada à RUT-C30, o que ocorre devido à diferenças genéticas (PETERSON; NEVALAINEN, 2012). Entretanto, apesar destas diferenças, o mesmo padrão de aumento foi observado. Adicionalmente, neste trabalho, foi demonstrado que este aumento provocado pela adição de cálcio não ocorre nas linhagens mutantes com a ausência de YVC1 ou PMC1, o que indica que a entrada e saída de cálcio dos vacúolos é essencial para a indução da expressão de celulases em *T. reesei*.

O aumento da produção de celulases também está relacionado com os metais manganês (CHEN et al., 2018a), estrôncio (LI et al., 2022) e zinco (LI et al., 2023), sendo este efeito relacionado à via de sinalização dependente de cálcio. Estes estudos demonstraram que este processo está relacionado à ATPase do tipo P, ao transportador TPMR1, à PLC-E, ao cAMP e ao fator de transcrição CRZ1. No presente estudo, foi demonstrado que as proteínas YVC1 e PMC1 também atuam na produção de celulases por meio da via de sinalização dependente de cálcio.

Por meio da detecção dos transcritos de *ypr1*, *ypr2* e *sor1*, envolvidos na produção do pigmento amarelo de *T. reesei*, um sorbicilinoide, foi observado que nas linhagens mutantes seus níveis se encontraram menores, indicando que as proteínas vacuolares transportadoras de cálcio são importantes para a produção deste metabólito secundário. Estes dados estão de acordo com as encontradas em um estudo realizado em *Penicillium oxalicum*, onde demonstraram que PoCrz1 regula o metabolismo secundário, já que cinco *clusters* foram regulados negativamente na linhagem mutante, com a ausência deste fator de transcrição (YANG et al., 2022).

Por meio de microscopia confocal, foi demonstrado que a parede de *T. reesei* se encontra mais espessa nas linhagens mutantes, isto pode explicar o aumento da resistência destas linhagens ao estresse de parede provocado pelo CR. Em *Aspergillus*



*nidulans*, foi demonstrado que a deleção de CchA e MidA tornou as linhagens mutantes mais resistentes ao estresse causado por CR e CFW, o que este efeito ocorre devido à mudança na composição da parede celular do fungo (WANG et al., 2012).

Por fim, é possível que os efeitos observados ocorram devido à retenção do cálcio no interior dos vacúolos, como demonstrado por meio de microscopia confocal (Figura 24). Apesar do cálcio não ter sido detectado em meio contendo celulose, é possível que esta retenção prejudique a sinalização dependente de cálcio, que já foi demonstrada ser importante para a indução de celulasas (CHEN et al., 2018a). Curiosamente, as linhagens mutantes apresentaram um crescimento aumentado em xilose, quando comparadas com a linhagem parental. Entretanto, ao analisar a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de xilose, não observamos aumento nas linhagens mutantes, exceto em *Δtryvc2*, sem a suplementação de cálcio, o que abre a possibilidade de novos estudos, pois é possível que outros fatores estejam envolvidos neste processo.

## ***7. Conclusão***

---

## 7. CONCLUSÃO

- O genoma de *T. reesei* possui 33 genes que possivelmente codificam proteínas vacuolares envolvidas no transporte de cálcio. Estas 33 proteínas possuem perfis de expressão diferentes entre as linhagens parentais QM9414, QM6a e TU6, indicando que as diferenças genéticas entre estas linhagens, como o aumento da produção de celulases, podem estar relacionado com a via de sinalização dependente de cálcio.
- O gene *tryvc3* é o mais expresso dentre os genes estudados homólogos a *yvc1* de *S. cerevisiae*. Já o gene *trpmc1* é regulado negativamente em celulose e xilose quando é realizada a suplementação com  $\text{CaCl}_2$ , o que sugere maior importância de *tryvc3* nestas condições e a existência de um gene homólogo a *trpmc1* que atua em *T. reesei* quando o meio é suplementado com cálcio.
- As linhagens mutantes com a deleção de *tryvc1*, *tryvc2*, *tryvc3* e *trpmc1* apresentam o crescimento reduzido em CMC, quando comparadas com a linhagem parental. Já as linhagens mutantes com a deleção de *tryvc1*, *tryvc3* e *trpmc1* são mais resistentes ao Congo Red, quando comparadas com a linhagem parental. Todas as linhagens mutantes deste trabalho cresceram mais do que a linhagem parental em galactose e principalmente xilose, indicando o papel destes genes na produção de celulases, resistência ao estresse de parede e metabolismo de xilose.
- Em celulose, com pré-crescimento em glicerol, *xyr1* está regulado negativamente e *cre1* está regulado positivamente em  $\Delta\text{tryvc1}$ ,  $\Delta\text{tryvc2}$  e  $\Delta\text{trpmc1}$ . Adicionalmente, *cel7a* e *cel3a* estão regulados negativamente nestas linhagens, indicando um possível papel destes genes na regulação de celulases.

- Sem o pré-crescimento, há uma diferença que varia entre 5 e mais 400 vezes na expressão de celulases entre a linhagem parental e as linhagens mutantes, quando o cálcio é suplementado no meio de cultivo. Este aumento é acompanhando do aumento na expressão de *xyr1* e *hac1a*.
- Em xilose, a expressão de *cam* e *cna1* é menor na linhagem parental do que nas linhagens mutantes  $\Delta tryvc1$ ,  $\Delta tryvc2$  e  $\Delta trpmc1$ , o que pode estar relacionado com o maior crescimento das linhagens mutantes.
- A produção do pigmento amarelo é prejudica nas linhagens com a ausência das proteínas vacuolares transportadoras de cálcio. Esta diminuição pode estar associada à repressão de *ypr1*, *ypr2* e *sor1*.
- É possível que nas linhagens mutantes, o cálcio esteja acumulado no interior dos vacúolos, o que resulta nos efeitos observados.
- A parede celular de *T. reesei* é mais espessa nas linhagens mutantes quando o cálcio é suplementado ao meio, o que explica a maior resistência ao estresse de parede.

## ***8. Referências bibliográficas***

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTONIÊTO, A. C. C. et al. Defining the genome-wide role of CRE1 during carbon catabolite repression in *Trichoderma reesei* using RNA-Seq analysis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, p. 93–103, 2014.

ANTONIETO, A. C. C. et al. A Novel Cys2His2 Zinc Finger Homolog of AZF1 Modulates Holocellulase Expression in *Trichoderma reesei*. **mSystems**, 2019.

BAJAJ, P.; MAHAJAN, R. **Cellulase and xylanase synergism in industrial biotechnology**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019.

BARCELOS, C. A. et al. Enzymes and Accessory Proteins Involved in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass for Bioethanol Production. Em: **Mycology: Current and Future Developments**. [s.l: s.n.].

BIMBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, 1979.

BISCHOF, R. H.; RAMONI, J.; SEIBOTH, B. Cellulases and beyond: the first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. **Microbial cell factories**, v. 15, n. 1, p. 106, 10 jun. 2016.

BLUM, M. et al. The InterPro protein families and domains database: 20 years on. **Nucleic Acids Research**, 2021.

BONILLA, M.; CUNNINGHAM, K. W. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. **Molecular biology of the cell**, v. 14, n. 10, p. 4296–305, out. 2003.

BOWMAN, B. J. et al. Role of four calcium transport proteins, encoded by *nca-1*, *nca-2*, *nca-3*, and *cax*, in maintaining intracellular calcium levels in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 5, 2011a.

BOWMAN, B. J. et al. Role of four calcium transport proteins, encoded by *nca-1*, *nca-2*, *nca-3*, and *cax*, in maintaining intracellular calcium levels in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 5, 2011b.

CAMPOS ANTONIÊTO, A. C. et al. *Trichoderma reesei* CRE1-mediated Carbon Catabolite Repression in Response to Sophorose Through RNA Sequencing Analysis. **Current Genomics**, 2015.

CAO, Y. et al. Rce1, a novel transcriptional repressor, regulates cellulase gene expression by antagonizing the transactivator Xyr1 in *Trichoderma reesei*. **Molecular Microbiology**, v. 105, n. 1, p. 65–83, 1 jul. 2017.

CAO, Y. et al. *Trichoderma reesei* XYR1 recruits SWI/SNF to facilitate cellulase gene expression. **Molecular Microbiology**, p. mmi.14352, 25 jul. 2019.

CASTRO, L. D. S. et al. Expression pattern of cellulolytic and xylanolytic genes regulated by transcriptional factors XYR1 and CRE1 are affected by carbon source in *Trichoderma reesei*. **Gene Expression Patterns**, v. 14, n. 2, 2014.

CHEN, J. et al. Calcium Signaling during Reproduction and Biotrophic Fungal Interactions in Plants. **Molecular Plant**, v. 8, n. 4, p. 595–611, 6 abr. 2015.

CHEN, L. et al. Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 560–575, mar. 2016a.

CHEN, L. et al. Characterization of the Ca<sup>2+</sup>-responsive signaling pathway in regulating the expression and secretion of cellulases in *T. reesei* Rut-C30. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 560–575, maio 2016b.

CHEN, L. et al. The transcription factor FgCrz1A is essential for fungal development, virulence, deoxynivalenol biosynthesis and stress responses in *Fusarium graminearum*. **Current Genetics**, v. 65, n. 1, p. 153–166, 8 fev. 2019a.

CHEN, Y. et al. Mn<sup>2+</sup> modulates the expression of cellulase genes in *Trichoderma reesei* Rut-C30 via calcium signaling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, mar. 2018a.

CHEN, Y. et al. Mn<sup>2+</sup> modulates the expression of cellulase genes in *Trichoderma reesei* Rut-C30 via calcium signaling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 54, 1 dez. 2018b.

CHEN, Y. et al. Mn<sup>2+</sup> modulates the expression of cellulase genes in *Trichoderma reesei* Rut-C30 via calcium signaling. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 54, 1 dez. 2018c.

CHEN, Y. et al. N,N-dimethylformamide induces cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 12, n. 1, fev. 2019b.

CHEN, Y. et al. cAMP activates calcium signalling via phospholipase C to regulate cellulase production in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 14, n. 1, mar. 2021.

CORTÉS, J. C. G. et al. *Schizosaccharomyces pombe* Pmr1p is essential for cell wall integrity and is required for polarized cell growth and cytokinesis. **Eukaryotic Cell**, v. 3, n. 5, 2004.

CRABTREE, G. R. Calcium, calcineurin, and the control of transcription. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2313–6, 26 jan. 2001.

CUNNINGHAM, K. W.; FINK, G. R. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPases. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 3, 1994a.

CUNNINGHAM, K. W.; FINK, G. R. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca<sup>2+</sup> ATPases. **Journal of Cell Biology**, v. 124, n. 3, 1994b.

CYERT, M. S. Genetic Analysis of Calmodulin and Its Targets in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annual Review of Genetics**, v. 35, n. 1, p. 647–672, dez. 2001.

CYERT, M. S.; PHILPOTT, C. C. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 677–713, mar. 2013.

DATTA, S.; SAPRA, R. Cellulases and hemicellulases for biomass degradation: An introduction. **RSC Energy and Environment Series**, v. 2011, n. 1, 2011.

DAVIS, T. R.; ZUCCHI, P. C.; KUMAMOTO, C. A. Calmodulin Binding to Dfi1p Promotes Invasiveness of *Candida albicans*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, 2013.

DE CASTRO, P. A. et al. The involvement of the Mid1/Cch1/Yvc1 calcium channels in *Aspergillus fumigatus* virulence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 2014a.

DE CASTRO, P. A. et al. The Involvement of the Mid1/Cch1/Yvc1 Calcium Channels in *Aspergillus fumigatus* Virulence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103957, ago. 2014b.

DE PAULA, R. G. et al. The Duality of the MAPK Signaling Pathway in the Control of Metabolic Processes and Cellulase Production in *Trichoderma reesei*. **Scientific Reports**, 2018a.



DE PAULA, R. G. et al. New Genomic Approaches to Enhance Biomass Degradation by the Industrial Fungus *Trichoderma reesei*. **International Journal of Genomics**, v. 2018, p. 1–17, 24 set. 2018b.

DE PAULA, R. G. et al. The Duality of the MAPK Signaling Pathway in the Control of Metabolic Processes and Cellulase Production in *Trichoderma reesei*. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14931, 8 dez. 2018c.

DE SOUZA, T. S. P.; KAWAGUTI, H. Y. **Cellulases, Hemicellulases, and Pectinases: Applications in the Food and Beverage Industry. Food and Bioprocess Technology**, 2021.

DERNTL, C. et al. Novel Strategies for Genomic Manipulation of *Trichoderma reesei* with the Purpose of Strain Engineering. **Applied and Environmental Microbiology**, 2015.

DINAMARCO, T. M. et al. Functional Characterization of an *Aspergillus fumigatus* Calcium Transporter (PmcA) that Is Essential for Fungal Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37591, 23 maio 2012a.

DINAMARCO, T. M. et al. Functional Characterization of an *Aspergillus fumigatus* Calcium Transporter (PmcA) that Is Essential for Fungal Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e37591, 23 maio 2012b.

DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Comparative metabolism of cellulose, sophorose and glucose in *Trichoderma reesei* using high-throughput genomic and proteomic analyses. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 41, 21 mar. 2014.

DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Understanding the Role of the Master Regulator XYR1 in *Trichoderma reesei* by Global Transcriptional Analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 175, 2016a.

DOS SANTOS CASTRO, L. et al. Understanding the Role of the Master Regulator XYR1 in *Trichoderma reesei* by Global Transcriptional Analysis. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 175, 2016b.

DRUZHININA, I. S.; KUBICEK, C. P. Genetic engineering of *Trichoderma reesei* cellulases and their production. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 6, p. 1485–1499, 1 nov. 2017.

FOKINA, A. V. et al. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca<sup>2+</sup> ATPase causes G2 cell cycle delay in *Hansenula polymorpha*. **Cell Cycle**, v. 11, n. 4, 2012.

GHANEGOLMOHAMMADI, F. et al. Systematic analysis of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae* based on chemical-genetic interaction profiles. **Molecular biology of the cell**, v. 28, n. 23, p. 3415–3427, 7 nov. 2017.

GROPPI, S. et al. Glucose-induced calcium influx in budding yeast involves a novel calcium transport system and can activate calcineurin. **Cell Calcium**, v. 49, n. 6, 2011.

GRUBER, F. et al. The development of a heterologous transformation system for the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* based on a pyrG-negative mutant strain. **Current Genetics**, v. 18, n. 1, p. 71–76, 1990.

HÄKKINEN, M. et al. Re-annotation of the CAZy genes of *Trichoderma reesei* and transcription in the presence of lignocellulosic substrates. **Microbial Cell Factories**, v. 11, p. 1–26, 2012.

HU, Y. et al. Five vacuolar Ca<sup>2+</sup> exchangers play different roles in calcineurin-dependent Ca<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> tolerance, multistress responses and virulence of a filamentous entomopathogen. **Fungal Genetics and Biology**, v. 73, 2014.

HUANG, S. et al. Interplay between calcineurin and the Sit2 MAP-kinase in mediating cell wall integrity, conidiation and virulence in the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 83, 2015.

JANSEN, M. L. A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains for second-generation ethanol production: from academic exploration to industrial implementation. **FEMS Yeast Research**, v. 17, n. 5, 1 ago. 2017.

JIA, C. et al. Effects of Disruption of PMC1 in the *tfp1Δ/Δ* Mutant on Calcium Homeostasis, Oxidative and Osmotic Stress Resistance in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 183, n. 2, 2018.

JIANG, H. et al. Putative PmrA and PmcA are important for normal growth, Morphogenesis and cell wall integrity, But not for viability in *Aspergillus nidulans*. **Microbiology (United Kingdom)**, v. 160, 2014.

KATOH, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**, v. 20, n. 4, p. 1160–1166, 2018.

KIM, H. S. et al. Roles of three *Fusarium oxysporum* calcium ion (Ca<sup>2+</sup>) channels in generating Ca<sup>2+</sup> signatures and controlling growth. **Fungal Genetics and Biology**, v. 82, 2015.

KMETZSCH, L. et al. The vacuolar Ca<sup>2+</sup> exchanger *vcx1* is involved in calcineurin-dependent Ca<sup>2+</sup> tolerance and virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 11, 2010.

KMETZSCH, L. et al. The calcium transporter *Pmc1* provides Ca<sup>2+</sup> tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS Journal**, v. 280, n. 19, 2013a.

KMETZSCH, L. et al. The calcium transporter *Pmc1* provides Ca<sup>2+</sup> tolerance and influences the progression of murine cryptococcal infection. **FEBS Journal**, v. 280, n. 19, p. 4853–4864, out. 2013b.

KOIKE, H. et al. Comparative genomics analysis of *trichoderma reesei* strains. **Industrial Biotechnology**, v. 9, n. 6, 2013.

KUMAR, R.; TAMULI, R. Calcium/calmodulin-dependent kinases are involved in growth, thermotolerance, oxidative stress survival, and fertility in *Neurospora crassa*. **Archives of Microbiology**, v. 196, n. 4, p. 295–305, 26 abr. 2014.

LANGE, M. et al. The transient receptor potential (TRP) channel family in *colletotrichum graminicola*: A molecular and physiological analysis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, 2016a.

LANGE, M. et al. The Transient Receptor Potential (TRP) Channel Family in *Colletotrichum graminicola*: A Molecular and Physiological Analysis. **PLOS ONE**, v. 11, n. 6, p. e0158561, jun. 2016b.

LANGE, M.; PEITER, E. Calcium Transport Proteins in Fungi: The Phylogenetic Diversity of Their Relevance for Growth, Virulence, and Stress Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. January, 2020.

LI, N. et al. Induction of cellulase production by Sr<sup>2+</sup> in *Trichoderma reesei* via calcium signaling transduction. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, 2022.

LI, N. et al. Mechanism of Zn<sup>2+</sup> regulation of cellulase production in *Trichoderma reesei* Rut-C30. **Biotechnology for Biofuels and Bioproducts**, v. 16, n. 1, abr. 2023.

LI, W.-C. et al. *Trichoderma reesei* complete genome sequence, repeat-induced point mutation, and partitioning of CAZyme gene clusters. **Biotechnology for Biofuels**, v. 10, n. 1, p. 170, 3 dez. 2017.

LIU, G.; ZHANG, J.; BAO, J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 1, 2016.

LIU, S. et al. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 4, p. 324–34, 1 abr. 2015a.

LIU, S. et al. Components of the calcium-calcineurin signaling pathway in fungal cells and their potential as antifungal targets. **Eukaryotic cell**, v. 14, n. 4, p. 324–34, 1 abr. 2015b.

LOCKE, E. G. et al. A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 18, p. 6686–94, set. 2000.

LV, X. et al. Characterization of a copper responsive promoter and its mediated overexpression of the xylanase regulator 1 results in an induction-independent production of cellulases in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 8, n. 1, p. 67, 14 dez. 2015.

MACH-AIGNER, A. R. et al. Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 21, p. 6554–62, 1 nov. 2008.

MANDAL, D.; WOOLF, T. B.; RAO, R. Manganese selectivity of *pmr1*, the yeast secretory pathway ion pump, is defined by residue *gln783* in transmembrane segment 6. Residue *Asp778* is essential for cation transport. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 31, p. 23933–8, 4 ago. 2000.

MARTIN, D. C. et al. New regulators of a high affinity Ca<sup>2+</sup> influx system revealed through a genome-wide screen in yeast. **The Journal of biological chemistry**, v. 286, n. 12, p. 10744–54, 25 mar. 2011.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 4 maio 2008a.

MARTINEZ, D. et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). **Nature Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 553–560, 4 maio 2008b.

MARTINS-SANTANA, L. et al. CRZ1 regulator and calcium cooperatively modulate holocellulases gene expression in *Trichoderma reesei* QM6a. **bioRxiv**, p. 622647, 29 abr. 2019a.

MARTINS-SANTANA, L. et al. CRZ1 regulator and calcium cooperatively modulate holocellulases gene expression in *Trichoderma reesei* QM6a. **bioRxiv**, p. 622647, 29 abr. 2019b.

MATSUMOTO, T. K. et al. An Osmotically Induced Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Transient Activates Calcineurin Signaling to Mediate Ion Homeostasis and Salt Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 36, p. 33075–33080, 6 set. 2002.

MEENA, M. et al. **Chapter 9 - Penicillium Enzymes for the Food Industries**. [s.l: s.n.].

NANDA, S. et al. A broad introduction to first-, second-, and third-generation biofuels. Em: **Recent Advancements in Biofuels and Bioenergy Utilization**. [s.l: s.n.].

NGUYEN, Q. B. et al. Systematic functional analysis of calcium-signalling proteins in the genome of the rice-blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, using a high-throughput RNA-silencing system. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 6, 2008.

NOGUEIRA, K. M. V. et al. Characterization of a novel sugar transporter involved in sugarcane bagasse degradation in *Trichoderma reesei*. **Biotechnology for Biofuels**, v. 11, n. 1, p. 84, 2 dez. 2018.

OBENG, E. M. et al. **Lignocellulases: a review of emerging and developing enzymes, systems, and practices**. **Bioresources and Bioprocessing**, 2017.

PAIDHUNGAT, M.; GARRETT, S. A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca<sup>2+</sup> uptake and exacerbates

the *cdc1(Ts)* growth defect. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 11, p. 6339–47, 1 nov. 1997.

PALMER, C. P. et al. A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca<sup>2+</sup>-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 14, 2001.

PETERSON, R.; NEVALAINEN, H. **Trichoderma reesei RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. Microbiology**, 2012.

PITTMAN, J. K. Vacuolar Ca<sup>2+</sup> uptake. **Cell Calcium**, v. 50, n. 2, p. 139–146, ago. 2011.

POPA, C. V. et al. Exogenous oxidative stress induces Ca<sup>2+</sup> release in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Journal**, v. 277, n. 19, 2010.

POTTER, S. C. et al. HMMER web server: 2018 update. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, 2018.

POZOS, T. C.; SEKLER, I.; CYERT, M. S. The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and is related to mammalian Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchangers. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 7, 1996.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing**, 2021.

RANI SINGHANIA, R. et al. **Role and significance of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction. Bioresource Technology**, 2021.

RESTREPO-VALENCIA, S.; WALTER, A. BECCS opportunities in Brazil: Comparison of pre and post-combustion capture in a typical sugarcane mill. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 124, 2023.

RUSNAK, F.; MERTZ, P. Calcineurin: Form and Function. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 4, p. 1483–1521, 10 jan. 2000.

RUTA, L. L. et al. Calcium signaling mediates the response to cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae* cells. **FEBS Letters**, v. 588, n. 17, p. 3202–3212, 25 ago. 2014.

SAINI, J. K.; SAINI, R.; TEWARI, L. Lignocellulosic agriculture wastes as biomass feedstocks for second-generation bioethanol production: concepts and recent developments. **3 Biotech**, v. 5, n. 4, p. 337–353, 2015.

SALOHEIMO, A. et al. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 8, p. 5817–25, 25 fev. 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Preparation and Transformation of Competent *E. coli* Using Calcium Chloride . **Cold Spring Harbor Protocols**, 2006.

SANDERSON, K. Lignocellulose: A chewy problem. **Nature**, v. 474, n. 7352, p. S12–S14, 22 jun. 2011.

SCHMOLL, M. et al. The G-alpha protein GNA3 of *Hypocrea jecorina* (anamorph *Trichoderma reesei*) regulates cellulase gene expression in the presence of light. **Eukaryotic Cell**, v. 8, n. 3, p. 410–420, mar. 2009.

SCHMOLL, M. et al. The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 80, n. 1, p. 205–327, mar. 2016a.

SCHMOLL, M. et al. The Genomes of Three Uneven Siblings: Footprints of the Lifestyles of Three *Trichoderma* Species. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 80, n. 1, p. 205–327, mar. 2016b.

SCHMOLL, M.; KUBICEK, C. P. Regulation of *Trichoderma* cellulase formation: lessons in molecular biology from an industrial fungus. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 50, n. 2–3, p. 125–145, jun. 2003.

SILVA, A. C. et al. The Cerato-Platanin EPL2 from *Trichoderma reesei* Is Not Directly Involved in Cellulase Formation but in Cell Wall Remodeling. **Microorganisms**, v. 11, n. 8, 2023.

SILVA-ROCHA, R. et al. Deciphering the Cis-Regulatory Elements for XYR1 and CRE1 Regulators in *Trichoderma reesei*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99366, 18 jun. 2014.

SINGH, H. et al. Exploring different avenues of *Trichoderma* as a potent bio-fungicidal and plant growth promoting candidate - an overview. **Indian Society of Mycology and Plant Pathology**, p. 315–426, 2012.

TAKITA, Y. et al. Inhibition of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase Pmc1p by the v-SNARE Protein Nyv1p. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 9, p. 6200–6206, 2 mar. 2001.

TISI, R. et al. Calcium homeostasis and signaling in fungi and their relevance for pathogenicity of yeasts and filamentous fungi. **AIMS Molecular Science**, v. 3, n. 4, p. 505–549, 2016.

VITIKAINEN, M. et al. Array comparative genomic hybridization analysis of *Trichoderma reesei* strains with enhanced cellulase production properties. **BMC Genomics**, 2010.

WANG, J. et al. Differential Roles for Six P-Type Calcium ATPases in Sustaining Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis, Asexual Cycle and Environmental Fitness of *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017a.

WANG, J. et al. Differential Roles for Six P-Type Calcium ATPases in Sustaining Intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis, Asexual Cycle and Environmental Fitness of *Beauveria bassiana*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017b.

WANG, L. et al. A novel transcriptional regulator RXE1 modulates the essential transactivator XYR1 and cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 11, p. 4511–4523, 13 jun. 2019.

WANG, S. et al. Putative Calcium Channels CchA and MidA Play the Important Roles in Conidiation, Hyphal Polarity and Cell Wall Components in *Aspergillus nidulans*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

WANG, S. et al. Calcineurin and Calcium Channel CchA Coordinate the Salt Stress Response by Regulating Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in *Aspergillus nidulans*. **Applied and environmental microbiology**, v. 82, n. 11, p. 3420–3430, 2016.

XIAO, Z. et al. [Cloning and expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase III (EG III) gene in *Saccharomyces cerevisiae*]. **Wei sheng wu xue bao = Acta microbiologica Sinica**, v. 41, n. 4, p. 391–6, ago. 2001.

YANG, Y. et al. **Updating Insights into the Regulatory Mechanisms of Calcineurin-Activated Transcription Factor Crz1 in Pathogenic Fungi**. **Journal of Fungi**, 2022.



YU, Q. et al. A novel role of the vacuolar calcium channel Yvc1 in stress response, morphogenesis and pathogenicity of *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, 2014a.

YU, Q. et al. A novel role of the vacuolar calcium channel Yvc1 in stress response, morphogenesis and pathogenicity of *Candida albicans*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 3–4, p. 339–350, maio 2014b.

ZHANG, Z. et al. Biofuels from food processing wastes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 38, p. 97–105, 1 abr. 2016.