

KLÉDNA CONSTÂNCIA PORTES REIS

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *plg1* QUE CODIFICA PECTINA LIASE EM
*Penicillium griseoroseum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Doctor Scientiae"

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2006

KLÉDNA CONSTÂNCIA PORTES REIS

**REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE *plg1* QUE CODIFICA PECTINA LIASE EM
*Penicillium griseoroseum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de "Doctor Scientiae"

APROVADA: 31 de maio de 2006

Prof^a Marisa Vieira de Queiroz
(Co-Orientadora)

Prof. Maurício Dutra Costa
(Co-Orientador)

Prof^a Andréa de Oliveira Barros Ribon

Prof^a Glória Regina Franco

Prof^a Elza Fernandes de Araújo
(Orientadora)

“Somos quem acreditamos ser”

Em Especial Ao Meu Filho Ian, Que Faz Tudo Ter Mais Sentido Em Minha Vida,
Aos Meus Pais Pelo Amor Eterno,
Aos Meus Irmãos E Familiares.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa – UFV, pelos anos de acolhimento e à Fundação de Amparo a Pesquisa – FAPEMIG, pelo apoio financeiro durante este trabalho.

Ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de aprendizado.

À Professora e Orientadora Elza Fernandes de Araújo, pelo apoio, por reconhecer e ajudar a driblar minhas dificuldades e apontar novas perspectivas durante todo esse tempo.

Aos professores conselheiros, Marisa Vieira de Queiroz e Maurício Dutra Costa, pelo auxílio e esforços durante a execução deste trabalho.

Aos professores que transmitem não só dados teóricos mas que contribuem para a construção de uma visão crítica e construtiva.

Ao corpo técnico-administrativo, em especial a Nilcéia, Laura, D. Aparecida, Sr. Paulo, Danilo e Evandro.

Ao Laboratório de Citogenética Vegetal e à Prof^a Sílvia Pompolo.

Aos COMPANHEIROS e AMIGOS do Laboratório de Genética de Microrganismos por compartilhar os momentos de alegria, de tensão, de êxtase, de angústia e de transformar os esforços em certeza de aprendizado.

Aos AMIGOS inseparáveis que participaram e contribuíram de forma efetiva nas muitas conquistas pessoais, superações físicas e emocionais, no combate à tristeza e desespero, e que hoje compartilham comigo a felicidade de ultrapassar mais uma das barreiras do crescimento. Aos amigos que não se importam com o anonimato, por terem a certeza de minha reciprocidade.

Aos meus queridos FAMILIARES que estiveram sempre ao meu alcance e que se dispõem de imenso altruísmo, aos meus PAIS por terem se desdobrados em pais e em avós, que palavras faltam para agradecer, aos meus IRMÃOS e saudosamente à minha querida VOZINHA, que de tanta luz foi iluminar nossas vidas lá do alto.

Ao meu eterno SOL, minha fonte de energia, de alegria e de tudo de bom que não se define em textos, meu amado FILHO.

BIOGRAFIA

Klédna Constância Portes Reis, filha de Renan Reis e Édna Portes Reis, natural da cidade de Águas Formosas, M.G. em 25 de setembro de 1976.

Ingressou na Universidade Vale do Rio Doce – UNIVALE, Governador Valares, M.G., em fevereiro de 1995, concluindo o curso de graduação em Ciências Biológicas em dezembro de 1998.

Em fevereiro de 2000 iniciou o curso de mestrado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, M.G., concluindo em abril de 2002.

Em abril de 2002, iniciou o curso de doutorado em Microbiologia Agrícola, no Departamento de Microbiologia/BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, M.G., concluindo em maio de 2006.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 – Microrganismos e condições de cultivo.....	17
3.2 – Influência de moduladores dos níveis endógenos de cAMP na expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>plg2</i> e atividade de pectina liase da linhagem mutante M03 de <i>P. griseoroseum</i>	18
3.3 – Nível de resposta à repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de <i>P. griseoroseum</i> cultivadas em diferentes concentrações de glicose.....	18
3.4 – Estudo de repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de <i>P. griseoroseum</i>	19
3.5 - Determinação da Atividade enzimática de pectina liase (PL)	19
3.6 – Extração de RNA total das linhagens selvagem e mutante M03 de <i>P. griseoroseum</i>	20
3.7 - RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction).....	20
3.8 – Determinação da funcionalidade dos cis-elementos putativos da região reguladora do gene <i>plg1</i>	21
3.8.1 – Construção dos plasmídeos contendo o gene <i>gfp</i> que codifica para a proteína GFP sob o controle de diferentes fragmentos da região reguladora do gene <i>plg1</i>	21

3.8.2 - Obtenção de Protoplastos.....	24
3.8.3 – Co-transformação da linhagem mutante PG63 de <i>P. griseoroseum</i>	24
3.8.4 - Análise molecular dos transformantes.....	25
3.8.5 – Análise qualitativa da fluorescência do gene repórter (proteína GFP).....	25
4. RESULTADOS	26
4.1 – Estudo de repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de <i>Penicillium griseoroseum</i>	26
4.1.1 - Avaliação do nível de resposta à repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de <i>P. griseoroseum</i> quando cultivadas na presença de pectina cítrica e diferentes concentrações de glicose.....	26
4.1.2 – Correlação entre expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>plg2</i> e a atividade de pectina liase em resposta às condições de repressão catabólica.....	28
4.2 – Influência de moduladores de cAMP na expressão dos genes <i>plg1</i> e <i>plg2</i> e atividade de pectina liase da linhagem mutante M03 de <i>P. griseoroseum</i>	31
4.3 – Determinação da funcionalidade dos cis-elementos putativos da região reguladora do gene <i>plg1</i>	32
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

RESUMO

REIS, Klédna Constância Portes, D.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2006.
Regulação da expressão do gene *plg1* que codifica pectina liase em *Penicillium griseoroseum*. Orientadora: Elza Fernandes de Araújo. Co-Orientadores: Marisa Vieira de Queiroz e Maurício Costa Dutra.

Penicillium griseoroseum tem se mostrado promissor para aplicação industrial considerando a produção de pectina liase (PL) e poligalacturonase (PG). Quando *P. griseoroseum* é cultivado na presença de glicose, transcritos do gene *plg1* são detectados em baixos níveis, evidenciando o efeito da repressão catabólica. No entanto na ausência do indutor natural, a pectina, e na presença de sacarose suplementado com extrato de levedura ou metilxantinas, os transcritos do gene *plg1* são detectados. O gene *plg2* é transcrito em níveis basais mesmo na presença de pectina, não sendo detectado nenhum produto de amplificação em condições de repressão catabólica. A linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*, que apresenta desrepressão catabólica, é mais resistente às condições de repressão catabólica impostas por altas concentrações de glicose no meio de cultivo, e conseqüentemente, maior produção de PL. Substâncias que afetam a cascata de transdução de sinais via cAMP, cafeína e NaF, agem de maneira sinérgica na produção de PL. Quando a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* é cultivada em meios contendo estas substâncias, apresenta maior atividade de PL em comparação

à linhagem selvagem. Uma maior capacidade de manutenção do nível endógeno de cAMP pela linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* em relação à linhagem selvagem pode ter sido o motivo da amplificação do sinal de transdução via cAMP, resultando em uma maior produção de PL. O processo de repressão catabólica está correlacionado com uma via de transdução de sinal dependente do cAMP. A determinação da funcionalidade dos cis-elementos presentes na região reguladora do gene *plg1* foi investigada por meio de deleções, permitindo identificar um fragmento de 319 pb (Fragmento B), posicionado entre -506 e -187 em relação ao sítio +1 da tradução, como importante para a expressão do gene *plg1* em condição de indução por pectina. A indução da expressão do gene *plg1* por sacarose/extrato de levedura não depende dos mesmos cis-elementos envolvidos na indução por pectina. A funcionalidade de dois sítios de ligação consenso à proteína CreA, posicionados a -432 e -569, também foi determinada. Estudos com mutações pontuais no fragmento de 319 pb poderão evidenciar um sítio essencial para indução da expressão do gene *plg1*, que poderá ser empregado como alternativa na obtenção de uma linhagem superprodutora de PL para aplicação industrial, assim como para um possível sistema de expressão para produção de proteínas heterólogas em *P. griseoroseum*.

ABSTRACT

REIS, Klédna Constância Portes. D.S., Universidade Federal de Viçosa, May, 2006. **Regulation of the expression of the gene *plg1* that code for pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*.**
Adviser: Elza Fernandes de Araújo. Co-Advisers: Marisa Vieira de Queiroz and Maurício Dutra Costa.

Penicillium griseoroseum has been considered a promising species for industrial application because of its capacity to produce pectin lyase (PL) and polygalacturonase. When *P. griseoroeum* is grown in the presence of glucose, *plg1* gene transcripts are detected at low levels, evidencing the effects of catabolic repression. However, in the absence of the natural inducer, pectin, and in the presence of sucrose supplemented with yeast extract and methylxanthines, *plg1* transcripts are detected. The *plg2* gene transcripts are detected at low levels in presence pectin, and it not being detected no product of amplification in conditions of catabolic repression The mutant strain M03 of *P. griseoroseum* is resistant to catabolic repression by high glucose concentrations in the culture medium, showing significant PL production. Substances that affect signal transduction pathways via cAMP, caffeine and NaF, act synergistically for PL production. When the mutant strain M03 is grown in media containing these substances, higher PL activities are observed in comparison to the wild type. Our results suggest that the differences in PL activity between the strains tested can be due to a cAMP-dependent signaling cascade and that the M03 produces a higher level of cAMP than the wild type, favoring the expression of the *plg1* gene. The functional analysis of cis-elements located at the regulatory region of *plg1* gene was investigated by the analyses of transformants containing different deletions in this region. This

allowed the detection of a 319-bp fragment (b fragment), located at -506 and -187 upstream the +1 of transduction, important for the induction of *plg1* in the presence of pectin. The *plg1* induction by sucrose and yeast extract is not dependent of the same cis-elements involved in *plg1* induction by pectin. The role of two CREA-binding cis-elements, located at -432 and -569, was also determined. Studies with point mutations in the b fragment may evidence essential sites for the induction of *plg1*. Such studies would allow advances towards the production of enzyme hiper-producing strains for industrial application and the expression of heterologous proteins in *P. griseoroseum*.

1. INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia utiliza enzimas pectinolíticas nos processos de despectinização de sucos, vinhos e azeite de oliva. Na indústria têxtil, observa-se cada vez mais a substituição do tratamento químico pelo tratamento com pectinases visando a desengomagem de fibras naturais (Sevili et al., 1992; Bhat, 2000).

Baracat e colaboradores (1989) realizaram uma bioprospecção no intuito de selecionar isolados fúngicos com alta produção de pectinases, aliada à baixa produção de celulases, para aplicação tanto na indústria têxtil como na alimentícia. Dentre os isolados identificados, *Penicillium griseoroseum* destacou-se, sendo estudado atualmente com esta finalidade. A avaliação da produção de poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL) em diferentes meios de cultivo tem sido realizada, assim como a obtenção de linhagens mutantes, o isolamento e caracterização de genes, o estabelecimento de técnicas de transformação genética, o aumento do número de cópias dos genes endógenos de interesse, as análises filogenéticas e os estudos dos mecanismos regulatórios envolvidos na expressão dos genes que codificam PL e PG (Baracat et al., 1989; Brumano et al., 1993; Baracat-Pereira et al., 1994 e 1999; Minussi et al., 1998; Fernandes-Salomão et al., 1996; Varavallo et al., 2004; Ribon et al., 1999 e 2002; Bazzolli, 1999 e 2003; Cardoso, 2000 e 2004; Ribon, 2001; Ribeiro, 2001 e 2005).

Muitos genes do complexo pectinolítico foram clonados e seqüenciados (Bussink et al., 1991; Cary et al., 1995; Benen et al., 1996; Bazzolli, 1999 e 2003; Ribon et al., 1999 e 2002). De modo geral, sugere-se que no controle da expressão destes genes estejam envolvidos vários cis-

elementos, embora a funcionalidade dos mesmos não tenha sido determinada (Maldonado et al., 1989; Brakhage et al., 1999; Ribon, 2001; Hebert et al., 2002).

A elucidação da funcionalidade dos cis-elementos da região promotora, envolvidos no controle da expressão, é um ponto chave para manipulações genéticas quando se trata de expressão heteróloga de genes ou mesmo para produção da enzima em escala comercial.

Em *P. griseoroseum*, foi verificada a expressão dos genes *plg1* e *plg2* na presença de diferentes substratos. O maior acúmulo do transcrito do gene *plg1* foi detectado quando o fungo foi cultivado em meio contendo pectina cítrica. Na ausência do indutor natural, a pectina, sacarose suplementada com extrato de levedura foi capaz de induzir a expressão de *plg1*, não sendo o mesmo observado para o gene *plg2*, que sempre se manteve em níveis basais de expressão. Na presença de glicose ou outros açúcares simples, os níveis transcricionais dos genes eram bastante reduzidos, mostrando que havia o efeito de repressão catabólica (Bazzolli, 2003).

Foi sugerido que metilxantinas presentes no extrato de levedura seriam responsáveis pela indução da expressão do gene *plg1* por meio do aumento ou manutenção do nível endógeno de cAMP, composto que deve participar da cascata de transdução de sinais importante para a expressão dos genes de PL (Baracat-Pereira et al., 1999). Substâncias que agem na cascata de transdução de sinal via cAMP, como cafeína e 3-isobutil-1-metil xantina (IBMX), inibidores da fosfodiesterase cíclica, e fluoreto de sódio (NaF), que ativa a adenilato ciclase, assim como o dibutilil-cAMP, foram testadas por Bazzolli (2003). Os resultados indicam que a expressão do gene *plg1* é dependente da cascata de transdução de sinal via cAMP. Sugere-se que proteínas cinases responsáveis pela fosforilação sejam ativadas e inibam uma provável ação repressora de uma proteína análoga a CreA, ativando a expressão do gene *plg1*, que codifica pectina liase no fungo *P. griseoroseum*.

Neste trabalho, um dos nossos objetivos foi demonstrar que o cAMP está envolvido na regulação da expressão do gene *plg1* por meio de uma cascata de transdução de sinais que pode estar relacionada com o mecanismo de repressão catabólica. A linhagem mutante M03 de *P.*

griseoroseum, obtida por Lima et al. (2003) por meio da resistência ao análogo da glicose 2-desoxi-D-glicose, apresenta desrepressão catabólica para produção de pectina liase quando é cultivada em meio contendo pectina e glicose. A determinação da funcionalidade dos cis-elementos putativos do gene *plg1* também foi verificada utilizando-se deleções em sua região regulatória e o efeito dos indutores e repressores, presentes nos diferentes meios de cultivo, sobre a expressão do gene repórter *gfp*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Pectinas são compostos ricos em ácido galacturônico, sendo três os principais polissacarídeos pécticos: a homogalacturonana, um polímero linear de resíduos de ácido galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -1,4; a ramnogalacturonana I que apresenta repetições do dissacarídeo ácido galacturônico e ramnose com cadeias de diferentes compostos, ligadas ao resíduo de ramnose; a ramnogalacturonana II, composta por um esqueleto de homogalacturonana com cadeias laterais complexas ligadas aos resíduos de ácido galacturônico (Figura 1A). Estudos recentes sugerem estrutura alternativa na qual a homogalacturonana seria, de fato, uma cadeia lateral longa de ramnogalacturonana (Figura 1B) (Willats et al., 2006). O ácido galacturônico do polímero homogalacturonana pode ser metil-esterificado ou acetilado, além de apresentar íons sódio, potássio ou cálcio acoplados a sua estrutura. Como apresentado, a pectina é uma estrutura extremamente complexa com diversos grupos de polímeros, apresentando heterogeneidade entre plantas, entre tecidos ou mesmo ao longo da parede celular de uma mesma célula (de Vries et al., 2002). Tanto o grau de metilesterificação quanto o grau de acetilação influenciam na ação da molécula assim como na atuação das enzimas que a degradam.

As pectinases que degradam a pectina da parede celular das células vegetais são produzidas principalmente por fungos e bactérias (Bergamin et al., 1995). Muita atenção tem sido dada a estas enzimas devido ao envolvimento das mesmas na interação planta-patógeno, pois não só degradam a parede celular para obtenção de nutrientes, como também auxiliam no

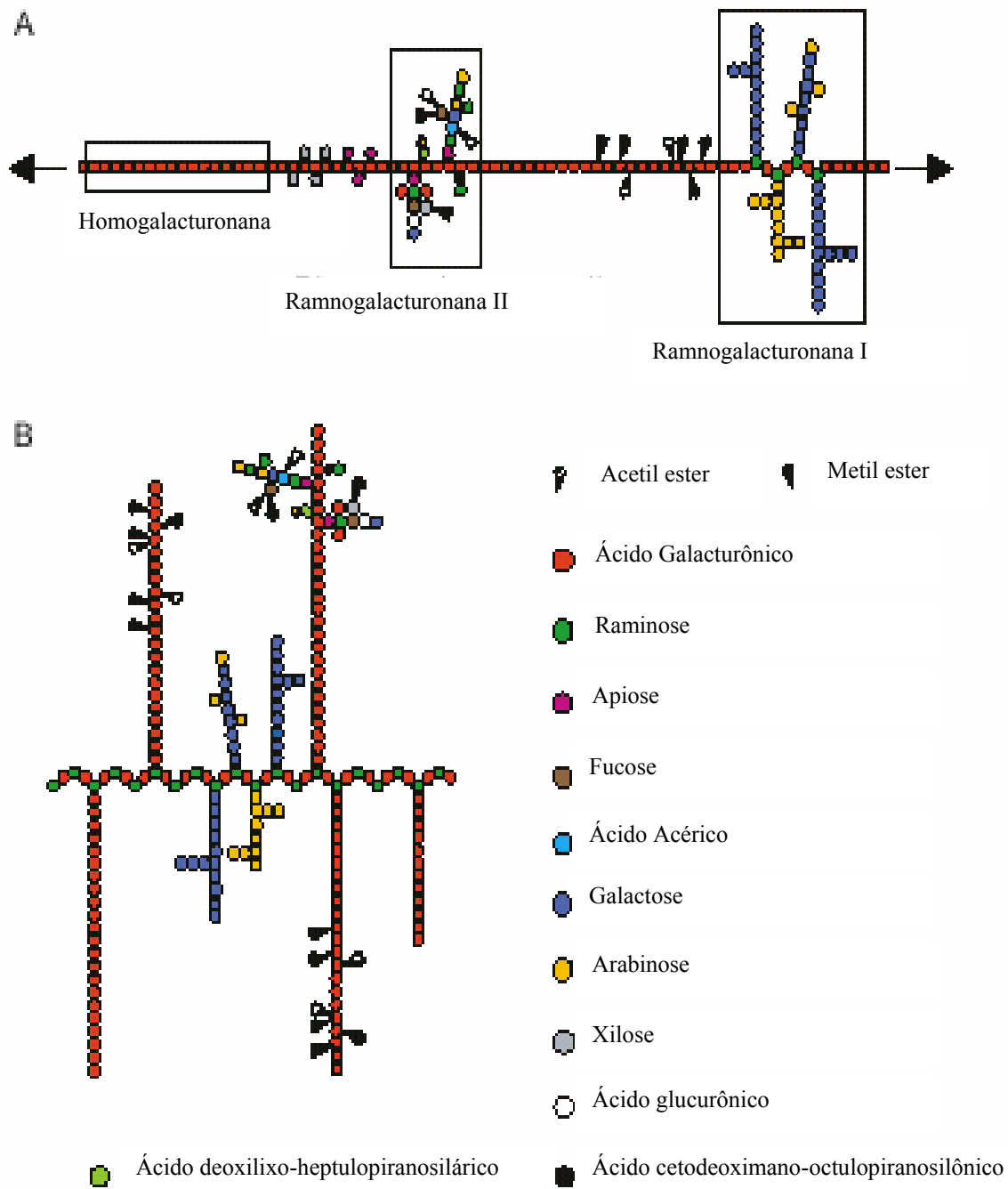


Figura 1: Representação esquemática da estrutura da molécula de pectina (A) e a estrutura alternativa proposta recentemente (B) (Willats et al., 2006).

processo de penetração do patógeno na célula e na sua distribuição através do tecido da planta (Hammerschmidt et al., 1984; Shih et al., 2000).

Enzimas pectinolíticas hidrolisam a pectina por diferentes mecanismos e são divididas em duas grandes classes: pectinesterases e despolimerases. As pectinesterases removem grupos metil dos ácidos galacturônicos e as despolimerases catalisam a clivagem das ligações glicosídicas via hidrólise (hidrolases) ou via β -eliminação (liases) (Kashyap et al., 2001; Hadj-Taieb et al., 2002). Elas são classificadas de acordo com o mecanismo utilizado para romper as ligações glicosídicas da pectina, especificidade pelo substrato e posição da ligação glicosídica α -1,4 rompida na cadeia pectica (endo ou exo). Além de hidrolases e traselminases, que diminuem o tamanho dos polímeros pecticos, as metilesterases também participam na degradação da fração pectica, retirando grupos metílicos para atuação de enzimas que agem na molécula de pectina com baixo grau de esterificação (Bergamin et al., 1995).

Pectina liase (PL) (EC 4.2.2.10) atua na região não-ramificada da pectina nos resíduos de ácido D-galacturônico unidos por ligações glicosídicas α -1,4. Essa enzima degrada a pectina pelo mecanismo de β -eliminação, clivando a ligação α -glicosídica entre O₁ e C₄, o que resulta na formação de uma ligação insaturada entre os carbonos 4 e 5 (Albersheim et al., 1966). Poligalacturonases (PG) são hidrolases que atuam sobre o ácido poligalacturônico e pectina de baixo grau de esterificação, podendo ser classificadas como endo-poligalacturonase (EC 3.2.1.14) ou exo-poligalacturonase (EC 3.2.1.67) de acordo com o mecanismo de ação no substrato. Pectato liase (PEL) (EC 4.2.2.2) atua sobre a mesma região da molécula de pectina, mas geralmente é ativa quando a pectina apresenta moderado grau de metilação e requer íons Ca²⁺ como cofator, ao contrário da pectina liase (Benen et al., 2000) (Figura 2).

O alto grau de esterificação da molécula de pectina é um requisito indispensável para ação de PL. O mecanismo de ação da pectina liase A (PLA) de *Aspergillus niger* foi investigado frente a oligogalacturonídeos com diferentes graus de polimerização e metil esterificação, sendo

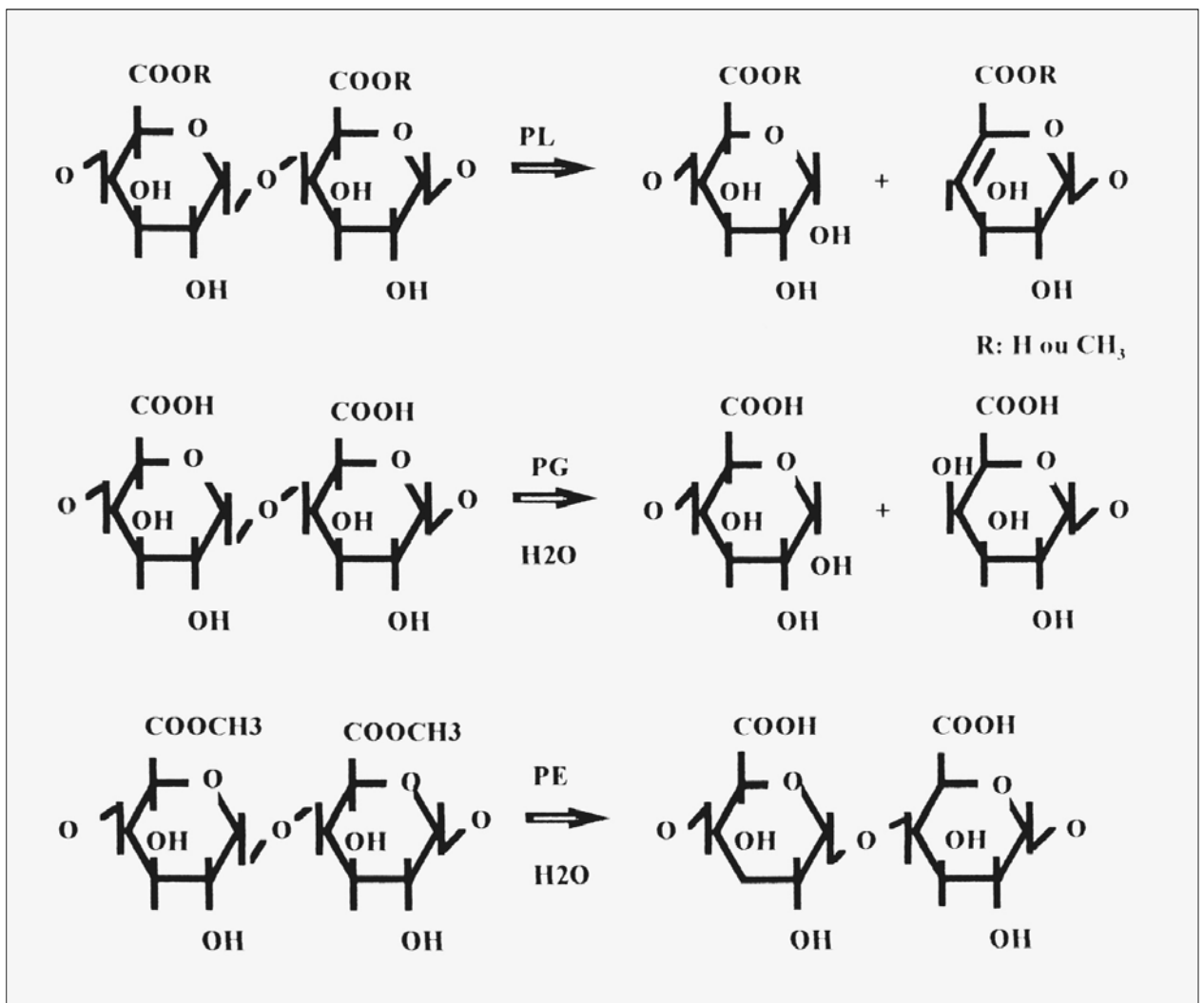


Figura 2: Mecanismo de ação das diferentes enzimas que hidrolisam a molécula de pectina e o produto final. Pectina liase (PL), Poligalacturonase (PG) e Pectato liase (PE) (Rombouts e Pilnik, 1980).

mais eficiente a ação de PLA em substrato com alto grau de esterificação. O produto liberado pela reação de β -eliminação de PLA pode variar de tamanho de acordo o grau de polimerização do oligogalacturonídeo. A maior atividade de PLA ocorreu quando todos os subsítios do oligogalacturonídeo foram ocupados com resíduos metil. Remoção de metil-ésteres do oligogalacturonídeo gera um substrato com alto grau de cargas negativas, que provavelmente é expelido pelo ambiente eletrostático negativo do sítio de interação de PLA com o substrato, justificando a total ausência de atividade enzimática para este substrato (van Alebeek et al., 2002).

A estrutura tridimensional da pectina liase B de *A. niger* (PLB), determinada por cristalografia, revelou topologia incomum em β -hélice paralela, igual à pectato liase (PEL) de bactérias. Apesar do baixo percentual de identidade entre PEL de bactérias e PLB, cerca de 14 a 20%, existem regiões na molécula que sugerem uma atuação similar destas enzimas sobre a molécula de pectina. Por meio do alinhamento múltiplo de PL e PEL, observa-se uma seqüência de dez aminoácidos conservados entre componentes da família de PEL, presente em duas regiões estruturais diferentes, o que tem levado a supor a existência de dois sítios ativos para esta classe de enzimas (Henrissat et al., 1995). Nenhum aminoácido específico na região do sítio ativo foi caracterizado até o momento como essencial para ação da enzima. Os resíduos Asp-154, Arg-236, e Pro-238 conservados no sítio ativo de PLB são análogos aos encontrados em PEL. Arginina está presente em todas as PL e PEL, sugerindo um papel catalítico importante na neutralização da carga negativa intermediária, gerada pela retirada do hidrogênio durante a β -eliminação. Dois dos três resíduos de aminoácidos ácidos presentes em PEL, Glu-166 e Asp-170, são substituídos por Arg-176 e Val-180 em PLB, coincidentemente na mesma posição relativa ao sítio do Ca^{2+} , o que poderia justificar a não exigência deste cofator para PL. A determinação da estrutura protéica de PLB de *A. niger* não ofereceu nenhuma evidência da importância do segundo sítio ativo, que envolve uma seqüência conservada WIDH (Vitali et al., 1998).

Pectina liase apresenta características intrínsecas que favorece a aplicação

biotecnológica. Primeiro, é a única enzima capaz de atuar em moléculas de pectina altamente esterificadas sem a ação prévia de outras enzimas. Segundo, não altera o grau de esterificação da pectina durante a degradação. Terceiro, não apresenta um final reductor como resultado da clivagem, evitando reações adversas com o produto e, finalmente, não promove a formação de metanol como subproduto (Alaña et al., 1991).

Na indústria alimentícia, a maior aplicação de pectinases totais é na extração dos compostos pécticos e clarificação do suco de frutas. As pectinases diminuem a viscosidade e turbidez ocasionadas pela pectina, diminuindo o tempo de filtração em aproximadamente 50 % (Blanco et al., 1999). A utilização de PL purificada poderia reduzir reações indesejáveis, como as citadas acima, principalmente o escurecimento do suco, devida à oxidação em decorrência de finais redutores produzidos pela ação das outras enzimas do complexo pectinolítico. As pectinases comerciais disponíveis, na grande maioria, consistem de uma mistura de enzimas pectinolíticas. Estas enzimas podem ser utilizadas para remoção de mucilagem dos grãos de café, acelerando o processo fermentativo do café e também do chá (Jayani et al., 2005). Como subproduto do processamento de alimentos vegetais, a água resultante das lavagens apresenta material péctico, podendo a mesma ser tratada com pectinases a fim de facilitar o tratamento da água com carvão ativado. A produção de ração animal depende das pectinases e outras enzimas que reduzem a viscosidade, facilitando assimilação dos nutrientes pelo animal e diminuindo o volume de fezes (Hoodal et al., 2000). A produção de vinho tinto, com características visuais satisfatórias, tais como cor e turbidez, é obtida pelo tratamento prévio com pectinases, antes do processo fermentativo (Revilla e Ganzales-san Jose, 2003).

Durante o processamento para a remoção da goma das fibras de rami e linho, no tratamento do algodão e no clareamento de papel, são utilizados produtos químicos poluentes e tóxicos, a exemplo dos peróxidos, que poderiam ser substituídos, pelo menos em parte, pelo tratamento enzimático, provendo não só alternativa economicamente viável, mas também, menor impacto ambiental (Hoodal et al., 2000; Reid e Richard, 2004).

Geralmente, a expressão dos genes que codificam enzimas pectinolíticas como PG e PL,

é regulada em nível de transcrição pelas condições ambientais, tais como o pH do meio e a fonte de carbono. A indução é promovida por pectina e componentes pécticos, como ácido poligalacturônico, ácido galacturônico, arabinose e ramnose, e a repressão, por glicose ou sacarose (Ribon et al., 2002; Wubben et al., 2000; Leone e van den Heuvel, 1987; Fawole e Odunfa, 2003). Em alguns fungos fitopatogênicos, como *Aspergillus parasiticus* e *Sclerotinia sclerotiorum*, genes que codificam PGs são expressos constitutivamente, independentemente da fonte de carbono (Cary et al., 1995; Fraissinet-Tachet et al., 1995). Para os genes que são controlados principalmente em nível de transcrição, o estudo dos cis-elementos presentes na região regulatória pode contribuir para o entendimento do processo de regulação.

A variação do pH ambiental é um dos fatores que promove alterações fisiológicas intracelulares, resultando em maior flexibilidade adaptativa do organismo. É fundamental que o organismo consiga perceber e transmitir para o interior celular a variação do pH do meio, desencadeando processos de resposta celular, tanto por alterações na expressão de genes e, ou na produção de metabólitos que sejam capazes de manter o pH externo favorável para atuação das enzimas pectinolíticas (Denison, 2000). Para os genes que codificam PL em *A. niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Aspergillus oryzae*, verifica-se a presença de cis-elementos para ligação do fator de transcrição PacC. (Templeton et al., 1994; Benen et al., 1996; Kitamoto et al., 2001a e 2001b). PacC é a proteína reguladora responsável pela ativação e repressão de genes que são regulados pelo pH do meio. Encontra-se na sua forma ativa apenas em ambientes alcalinos. A passagem de sua forma inativa, presente em ambientes ácidos, para a forma ativa deve-se a um grupo de proteínas responsáveis por uma via de transdução de sinal em resposta às variações do pH externo. A proteína PacC atua como ativadora da expressão de genes em condições alcalinas, além de impedir a expressão de genes induzidos em condições ácidas. A via de regulação da expressão de genes pelo pH externo possivelmente é conservada, pois similares da via de transdução de sinais foram identificados em diferentes organismos (Denison, 2000; Peñalva et al., 2002). A proteína PacC contém o domínio de ligação ao DNA Cys₂His₂, que reconhece a seqüência consenso GCCARG na região promotora do gene (Tilburn et al., 1995). O

efeito de mutações em genes que controlam a resposta celular às alterações de pH do meio tem impacto no desenvolvimento da doença na planta hospedeira pelo patógeno, tornando este tipo de controle alvo de especulações em muitos fungos fitopatogênicos (Rollins e Dickman, 2001).

Microrganismos competidores como os saprofíticos, conseguem resistir mais prontamente às adversidades do meio, impostas por seu estilo de vida, conseguindo rapidamente se adaptar às mudanças das condições nutricionais. Os processos de indução específica ou de repressão catabólica são considerados mecanismos que possibilitam esta versatilidade na utilização da fonte de carbono disponível. Genes responsáveis pelo catabolismo de uma fonte de carbono menos favorável energeticamente são reprimidos na presença de um substrato mais facilmente degradado, como D-glicose, D-frutose ou D-xilose. Do ponto de vista da fisiologia celular, isto é benéfico por duas razões: primeiro porque a fonte de carbono mais favorável energeticamente é usada e, segundo, porque nenhuma energia é desperdiçada na síntese de outros sistemas catabólicos secundários (Ruijter e Visser, 1997; Flipphi et al., 2003).

Fawole e Odunfa (2003), variando as concentrações de glicose no meio de cultivo contendo pectina, observaram a variação da atividade de PG e PL em *A. niger*. Uma diminuição da atividade de PG foi observada no sobrenadante da cultura do fungo cultivado em meio contendo pectina e glicose em concentração acima de 5 g/L. Em concentrações menores que 0,5% de glicose, ocorreu estímulo da atividade de PG. Os autores sugerem que em baixas concentrações de glicose, deve ocorrer a quebra da pectina, resultando em compostos mais facilmente assimiláveis, o que poderia explicar a alta atividade de PG detectada. Panda e colaboradores (2004) somente observaram atividade de PG e PL em *A. niger* quando a concentração de glicose era inferior a 7 g/L no meio de cultivo.

A regulação da expressão dos genes *pelA* e *pelB* ocorre em nível de transcrição, como demonstrado pela detecção do RNA por hibridização (Kusters-van Someren et al., 1991 e 1992). Verificou-se que quando glicose era adicionada ao meio de cultura, o transcrito do gene *pelA* não era detectado. No entanto, na presença de pectina, altos níveis deste transcrito estavam presentes (Kusters-van Someren et al., 1991). Na região regulatória dos genes que codificam PL,

foram identificados possíveis sítios de ligação para CreA, proteína reguladora envolvida na repressão catabólica em *Aspergillus nidulans* (Gysler et al., 1990; Kusters-van Someren et al., 1991 e 1992; Templeton et al., 1994; Scazzocchio et al., 1995). Por meio do seqüenciamento do cDNA de CreA, foi deduzido um polipeptídeo putativo de 415 aminoácidos, contendo duas regiões conservadas do tipo dedo de zinco [Cys₂-His₂] e uma região rica em alanina (Martinelli e Kinghorn, 1997).

A interação efetiva de CreA ao sítio de ligação consenso é dependente do contexto. Geralmente duas seqüências consenso espaçadas por poucos pares de bases têm sido implicadas no perfeito contexto para ligação de CreA, levando à especulação de que seriam necessárias duas moléculas repressoras durante o processo. Recentes estudos têm focado no controle da repressão catabólica via alterações pós-traducionais de CreA. Vautard-Mey e colaboradores (1999), trabalhando com CRE1 do fungo *S. sclerotiorum*, observaram que altos níveis do transcrito do gene *cre1* foram detectados quando o fungo foi cultivado na presença de glicose e que permaneciam estáveis depois que o fungo era transferido para meio contendo pectina como única fonte de carbono. Utilizando uma proteína de fusão com a *Green Fluorescent Protein* (GFP) e CRE1, foi possível detectar CRE1 na fração nuclear do micélio, quando o fungo foi cultivado em meio contendo glicose, e no citosol, quando o micélio foi transferido para meio de cultivo contendo pectina. Este mesmo fenômeno foi observado em *A. nidulans*, sugerindo que a translocação de CRE1 é regulada por glicose e conservada em muitos fungos (Vautard-Mey et al., 1999).

Estudos foram realizados com *Penicillium griseoroseum* quanto à produção das enzimas PG e PL, tem-se concentrado na obtenção de linhagens mutantes, manipulações genéticas como isolamento e caracterização de genes, estabelecimento de técnicas de transformação genética, aumento do número de cópias dos genes endógenos de interesse, análises filogenéticas e estudos dos mecanismos regulatórios envolvidos na expressão dos genes que codificam essas enzimas (Baracat et al., 1989; Brumano et al., 1993; Baracat-Pereira et al., 1994 e 1999; Minussi et al., 1998; Fernandes-Salomão et al., 1996; Ribon, 2001; Ribon et al., 1999 e 2002; Bazzolli, 1999 e

2003; Cardoso, 2000 e 2004; Ribeiro, 2001 e 2005).

Em *P. griseoroseum*, dois genes que codificam PL, *plg1* e *plg2*, foram isolados e caracterizados (Bazzolli, 1999). Verificou-se alta similaridade entre os genes *plg1* e *plg2* com os genes *pelA* e *pelD* de *A. niger*, respectivamente. As seqüências de aminoácidos deduzidas a partir do seqüenciamento dos genes *plg1* e *plg2* revelaram polipeptídeos de 374 e 383 aminoácidos e massas moleculares estimadas de 40,1 kDa para a proteína PLG1 e de 40,5 kDa para a proteína PLG2. O alinhamento múltiplo de nove seqüências de PL de fungos filamentosos disponíveis no banco de dado, demonstrou que somente PLG2 possui a região consenso denominada WIDH, presente em muitas PLs, mas com função ainda não determinada. Além disso, três resíduos de aminoácidos idênticos aos encontrados em PLB de *A. niger*, possivelmente envolvidos na reação de β -eliminação (Asp, Arg e Pro) também foram observados. Para a proteína PLG1, dois dos três aminoácidos estão presentes nesta região (Asp e Pro). Um destaque merece ser dado ao valor de pI calculado para PLG1, que foi de 9,46, o maior até o momento descrito na literatura, apresentando alta estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura (Bazzolli, 2003; Cardoso, 2004). Este dado agrega mais uma característica desejável para aplicação industrial desta enzima.

A região regulatória de ambos os genes apresenta cis-elementos putativos envolvidos na resposta a condições ambientais como pH do meio de cultivo e fontes de carbono. Na região regulatória do gene *plg1* seqüências consenso de ligação às proteínas CreA (nas posições -179, -613, e a -757) e PacC (-256 e a -288) e um TATA *box* (-91), cis-elementos que controlam expressão gênica pelo estresse (STRE) estão presentes nas posições -785, -452 e -354, sendo estes comumente encontrados nas regiões promotoras de genes de levedura (Bazzolli, 2003).

A expressão do gene *plg1* foi verificada em diferentes valores de pH do meio de cultivo. Assim como para a maioria dos genes que codificam enzimas do complexo pectinolítico, o maior acúmulo do transcrito do gene *plg1* foi observado em meio com pH próximo à neutralidade, ou seja, pectina como fonte de carbono em meio de cultivo tamponado em pH 6,8. A presença de pectina cítrica como fonte de carbono, em meio de cultivo não-tamponado, resulta em uma

diminuição do pH após o crescimento do fungo, justificado pela liberação de compostos de caráter ácido durante a degradação da pectina, como por exemplo, ácido galacturônico, não sendo possível detectar o transcrito do gene *plg1* nestas condições de cultivo (Bazzoli, 2003). Em meio de cultivo não-tamponado, contendo sacarose como fonte de carbono suplementada com extrato de levedura, o pH do meio mantém-se mais constante do que no meio com pectina como fonte de carbono, variando 0,2 na escala de pH, ao longo do crescimento do fungo. A necessidade de tamponamento fica restrita ao meio de cultivo contendo pectina como fonte de carbono. Já na presença de sacarose, utilizada como única fonte de carbono pelo fungo *P. griseoroseum*, o pH do meio mantém-se mais estável, além de ter um menor custo e poder ser encontrada em compostos mais acessíveis, a exemplo do caldo de cana-de-açúcar (Bazzoli, 2003).

Baracat-Pereira et al. (1994) verificaram maior atividade de PL em *P. griseoroseum* na presença de sacarose e de extrato de levedura. A adição de sacarose ao meio de cultivo suplementado com extratos de levedura, de chá, de café ou de cacau em substituição à pectina, aumentou a atividade de PL do sobrenadante de cultivo (Minussi et al., 1996). Metilxantinas, principalmente a cafeína, são compostos presentes em todos os extratos utilizados (Baracat-Pereira et al., 1997). Relatos anteriores demonstraram que as metilxantinas são capazes de inibir a enzima fosfodiesterase cíclica em fungos, aumentando o nível endógeno de cAMP (Wood et al., 1984). Considerando que a ação das substâncias presentes nos diferentes extratos poderia estar influenciando o nível de cAMP, devido à inibição da fosfodiesterase cíclica, e que o cAMP está envolvido na regulação de diversos processos celulares, hipotetizou-se a participação desta molécula na indução da produção de PL em *P. griseoroseum*. O cAMP foi utilizado em substituição aos diferentes extratos no meio de cultivo contendo sacarose como fonte de carbono, resultando na detecção da atividade de PL equivalente (Baracat-Pereira et al., 1997). Minussi et al. (1998) avaliaram a produção de PL em meio de cultivo contendo caldo de cana-de-açúcar, composto com baixa concentração de componentes pécticos e alta concentração de sacarose, com o objetivo de reduzir custos de produção. *P. griseoroseum* foi cultivado em sacarose

suplementado com extrato de levedura, detectando maior atividade de PL no sobrenadante de cultivo. Os autores sugeriram efeito sinérgico da adição simultânea de substâncias pécnicas, sacarose e compostos xantínicos presentes no caldo de cana-de-açúcar.

Com o isolamento e caracterização dos genes *plg1* e *plg2*, foi possível verificar a regulação da expressão destes genes nas diferentes condições de cultivo (Bazzolli, 2003). A detecção dos transcritos dos genes *plg1* e *plg2* revelou que os mesmos são diferencialmente expressos. O maior acúmulo do transcrito do gene *plg1* foi detectado, por hibridização, quando o fungo foi cultivado em meio contendo pectina cítrica por um período de 24 horas. A expressão do gene *plg2* foi verificada em meio de cultivo contendo pectina cítrica e pectina de maçã, mantendo um nível basal de expressão, sendo detectado somente pela análise de RT-PCR. Na ausência do indutor natural, a pectina, sacarose suplementada com extrato de levedura foi capaz de induzir a expressão do gene *plg1*, não sendo o mesmo observado para o gene *plg2*. Na presença de glicose ou outros açúcares, os níveis transcricionais dos genes eram bastante reduzidos, evidenciando o efeito de repressão catabólica (Bazzolli, 2003). Isolamento de mutantes de *P. griseoroseum* resistentes ao 2-desoxi-D-glicose demonstrou que a produção de PL foi aumentada em condições de cultivo com a presença de glicose e pectina (Lima et al., 2003). O composto 2-desoxi-D-glicose é fosforilado por hexoquinases do fungo e o composto resultante, 2-desoxi-D-glicose-6-fosfato acumula e inibe enzimas glicolíticas, assim como a incorporação de glicose e manose em polissacarídeos da parede celular. Conseqüentemente, ocorre uma queda de ATP e um desbalanço intracelular que pode favorecer o acúmulo de cAMP (Allen et al., 1989).

A análise fisiológica evidenciou o envolvimento da molécula de cAMP na produção de pectina liase (Baracat-Pereira, 1999). Substâncias que agem na cascata de transdução de sinal via cAMP, como cafeína e 3-isobutil-1-metil xantina (IBMX), inibidores da fosfodiesterase cíclica, e fluoreto de sódio (NaF), que ativa a adenilato ciclase, assim como o dibutilil-cAMP, foram testadas por Bazzolli (2003). A cafeína é a substância que induz resposta similar na expressão do gene *plg1* em relação ao extrato de levedura, quando presentes no meio de cultivo. Os resultados

sugerem que a expressão do gene *plg1* é dependente da cascata de transdução de sinal via cAMP.

Como descrito anteriormente, a via de transdução de sinais envolve uma série de modificações pós-traducionais, por fosforilação, metilação ou ubiquitinação. Um ou mais mecanismos estão diretamente relacionados com proteínas responsáveis pela inibição da atividade de uma provável ação repressora por uma proteína análoga a CreA em *P. griseoroseum*. O mecanismo de repressão catabólica pode estar relacionado com a via de transdução de sinais dependente de cAMP. Tem sido relatado o envolvimento da proteína G e a transdução de sinais via cAMP na repressão catabólica em fungos filamentosos (Firmino et al., 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de Genética Molecular e de Microrganismos do Departamento de Microbiologia – BIOAGRO, da Universidade Federal de Viçosa – Viçosa/MG.

3.1 - Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas para a realização deste trabalho a linhagem selvagem de *Penicillium griseoroseum*, isolada de sementes florestais na UFV e depositada na Coleção de Culturas Tropicais André Tosello, Campinas, com o código de acesso CCT 6421 e as linhagens mutantes de *P. griseoroseum* PG63, mutante espontâneo que apresenta uma deleção de 63 pares de bases na região estrutural do gene que codifica a enzima nitrato redutase (*niaD*) (Pereira et al., 2004) e a linhagem MO3, resistente ao 2-desoxy-D-glicose (Lima et al., 2003).

As culturas estoques foram armazenadas em glicerol e mantidas a 4°C. Para produção de inóculo, conídios de nove dias foram inoculados (1×10^6 esporos/mL) em frascos Erlenmeyer com 50 mL de meio mineral tamponado, pH 6,8, contendo diferentes fontes de carbono de acordo com cada experimento, e incubados sob agitação a 150 RPM e 25°C (Brumano et al., 1993). Para todos os experimentos em que se utilizou a técnica de RT-PCR, foi necessária o pré-cultivo do fungo em meio mínimo por 24 horas para obtenção de massa micelial e seguinte extração de RNA total.

3.2 – Influência de moduladores dos níveis endógenos de cAMP na expressão do genes *plg1* e na atividade de pectina liase da linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*

A linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* foi cultivada em meio mineral tamponado com pH 6,8 [g/L: 6,98 de KH_2PO_4 , 5,44 de K_2HPO_4 , 1,0 de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, suplementado com 0,05 de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$] acrescido de sacarose (0,4%), extrato de levedura (0,06%) e as substâncias moduladoras do nível endógeno de cAMP, como cafeína e fluoreto de sódio (NaF) a uma concentração final de 5 e 2 mM, respectivamente, ou as duas adicionadas simultaneamente nas mesmas concentrações. Os controles foram meio mineral tamponado suplementado com sacarose, extrato de levedura e sacarose e extrato de levedura. A linhagem selvagem de *P. griseoroseum* também foi utilizada como controle do experimento.

O sobrenadante da cultura e o micélio foram coletados para determinação da atividade de pectina liase (PL) e RT-PCR, respectivamente.

3.3 – Nível de resposta à repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum* cultivadas em diferentes concentrações de glicose

As linhagens foram cultivadas em meio mineral tamponado com pH 6,8 utilizando pectina cítrica (0,4%) como fonte de carbono com a adição de diferentes concentrações de glicose (0,4, 0,5, 1,0 e 1,5%). O fungo foi cultivado por 120 horas a 150 RPM e 25°C. Como controle foi utilizado meio mineral tamponado a pH 6,8 com pectina 0,4%, sem a adição de glicose.

Após 120 horas de cultivo, o sobrenadante da cultura foi coletado para determinação da atividade de PL e o micélio colhido em peneira de 400 malhas/polegada², armazenado em cadinhos de papel alumínio e secos a 105°C até a obtenção de massa constante (Calam, 1969).

3.4 – Estudo de repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum*

As linhagens de *P. griseoroseum* selvagem e mutante M03 foram cultivadas em meio mineral tamponado pH 6,8 utilizando pectina (0,4%) como fonte de carbono. Após 24 e 48 horas de cultivo, o micélio foi coletado, filtrado e lavado em água estéril até completa retirada do meio de cultivo. O micélio foi transferido para meio mineral tamponado com pH 6,8 contendo diferentes concentrações de glicose (0,4, 1,0 e 1,5%) e incubado sob agitação (150 RPM) a 25 °C, durante 24 e 48 horas. Em seguida, procedeu-se a coleta do sobrenadante e da massa micelial para determinação da atividade de PL e para a extração do RNA total.

3.5 - Determinação da atividade enzimática de pectina liase (PL)

A atividade enzimática de PL no sobrenadante das culturas crescidas por 48 ou 120 horas de acordo com cada experimento, foi determinada pelo aumento da absorvância a 235 nm, descrito por Albersheim e Killias (1962) com modificações. Nos tempos de cultivo realizados, a atividade de PL ainda é crescente, não apresentando atividade proteolítica. A mistura de reação, mantida a 40 °C, constituiu-se de 1 mL do substrato [pectina cítrica 2,5% (Sigma) em tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 80 mM, pH 6,8] e 1,5 mL do sobrenadante da cultura. Uma alíquota de 0,5 mL da mistura de reação foi retirada nos tempos de 0 e 30 min de incubação e adicionadas em tubo de ensaio contendo 4,5 mL de HCl 0,01 N para interromper a reação. Para determinar a atividade específica de PL, a estimativa da quantidade de proteína total no sobrenadante da cultura, foi feita pelo método descrito por Bradford (1976). Uma unidade (U) de atividade da enzima foi definida como nmoles de $\Delta^{4,5}$ galacturonídeo liberados por minuto, utilizando-se para o cálculo a absortividade molar de $5.550 \text{ L cm}^{-1}\text{mol}^{-1}$ para o produto insaturado. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores representam as médias. Análise estatística foi realizada aplicando-se o teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

3.6 – Extração de RNA total das linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum*

A extração de RNA total foi realizada a partir do micélio coletado em diferentes tempos de cultivo de acordo com cada experimento e congelado em nitrogênio líquido (Deeley et al., 1977 com adaptações). Cerca de 2 g de micélio foram triturados e homogeneizados em 10 mL da solução 1 [hidroclorato de guanidina 6 M, acetato de sódio 20 mM (pH 5,0) e ditioneitol 1 mM]. Depois de centrifugado, ao sobrenadante resultante foram adicionados de 10 mL de etanol 95%, deixados a -20 °C por 1 hora . O precipitado foi então dissolvido em 2mL da solução 2 [hidroclorato de guanidina 6 M, acetato de sódio 20 mM (pH 7,0) e ditioneitol 1 mM]. Após, foi realizada mais uma etapa de precipitação. Para ressuspender o sedimento, foram utilizados 1 mL de acetato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 2 mL de etanol 95%, deixados por 1 hora a -20 °C. O sedimento foi então lavado com etanol 70% e dissolvido em água Milli Q tratada com DEPC (Diethyl Pyrocarbonate). Cada amostra de RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% para verificar a qualidade.

3.7 - RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction)

As reações de transcrição reversa foram realizadas de acordo com o kit “Reverse Transcription System” (Promega), juntamente com oligo (dT) e 2,0 µg de RNA total, previamente tratado com DNase (livre de RNase - Promega®) e incubando-se a 42 °C, por 1 hora e 15 min. Os seguintes oligonucleotídeos foram sintetizados e utilizados na etapa de amplificação: 5'-TAGAAACTACCAACTCCCAACATG-3' (PI*plg1*) e 5'-TCCGCACGAGTAAATCACACTC-3' (PF*plg1*) para verificar a presença do transcrito do gene *plg1*. Os oligonucleotídeos PI*plg1* e PF*plg1* amplificam um fragmento com tamanho de 1341 pb a partir do gene *plg1* do DNA genômico, e um fragmento de ~1200 pb a partir do cDNA do mesmo. A reação de PCR consistiu de 5 µL da reação de RT, juntamente com 10 pmol de cada oligonucleotídeo, em um volume total de 25 µL. A amplificação

foi feita empregando quarenta ciclos, cada ciclo consistindo de um passo a 94 °C por 1 min, um passo a 55 °C, por 1 min e um passo a 72 °C, por 1 min e 30 segundos. Ao final, foi realizada uma etapa de extensão a 72 °C, por 7 min. Para cada reação, foi feita a amplificação do gene da γ -actina para testar a quantidade e integridade do cDNA produzido, utilizando oligonucleotídeos desenhados com base em uma região conservada do gene da γ -actina de fungos filamentosos. Uma preparação de DNA total de *P. griseoroseum* foi amplificada nas mesmas condições e analisada no mesmo gel para confirmação de que os fragmentos de DNA gerados não correspondem à contaminação do RNA com DNA total. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

3.8 – Determinação da funcionalidade dos cis-elementos putativos da região regulatória do gene *plg1*

3.8.1 – Construção dos plasmídeos contendo o gene *gfp* que codifica para a proteína GFP sob o controle de diferentes fragmentos da região regulatória do gene *plg1*.

As deleções na região regulatória do gene *plg1* foram realizadas com enzimas de restrição seguindo as recomendações do fabricante. Foram utilizadas três diferentes enzimas de restrição, *NcoI*, *SspI* e *SmaI*, com sítios únicos e que clivam exclusivamente na região regulatória do gene *plg1*. O plasmídeo *pplg1-gfp*, gentilmente cedido por Cardoso e colaboradores, foi utilizado para construção dos três diferentes clones. A construção foi realizada combinando duas das enzimas de restrição citadas. Após digestão do DNA plasmidial, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, recuperando o fragmento de interesse empregando o kit “GFX PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham). O fragmento foi religado com 1 U da enzima T4 ligase seguindo as instruções do fabricante (Promega). Os três plasmídeos gerados foram subclonados em *E. coli*, segundo Sambrook et al. (1989). O plasmídeo pNSp Δ 283 apresenta deleção de um fragmento correspondente ao sítio -786 e -503 da região regulatória do gene *plg1* (Fragmento A), o plasmídeo pSpS Δ 319 apresenta deleção de um fragmento

correspondente ao sítio -503 a -184 (Fragmento B) e o plasmídeo pNS Δ 602 que apresenta deleção de um fragmento correspondente ao sítio -786 e -184 (Fragmento C) (Figura 3). O *pplg1-gfp786* que contém a região regulatória do gene *p1g1* intacta também foi utilizado. Todas as diferentes construções foram utilizadas em experimentos de transformação do fungo.

Região regulatória do gene *plg1*

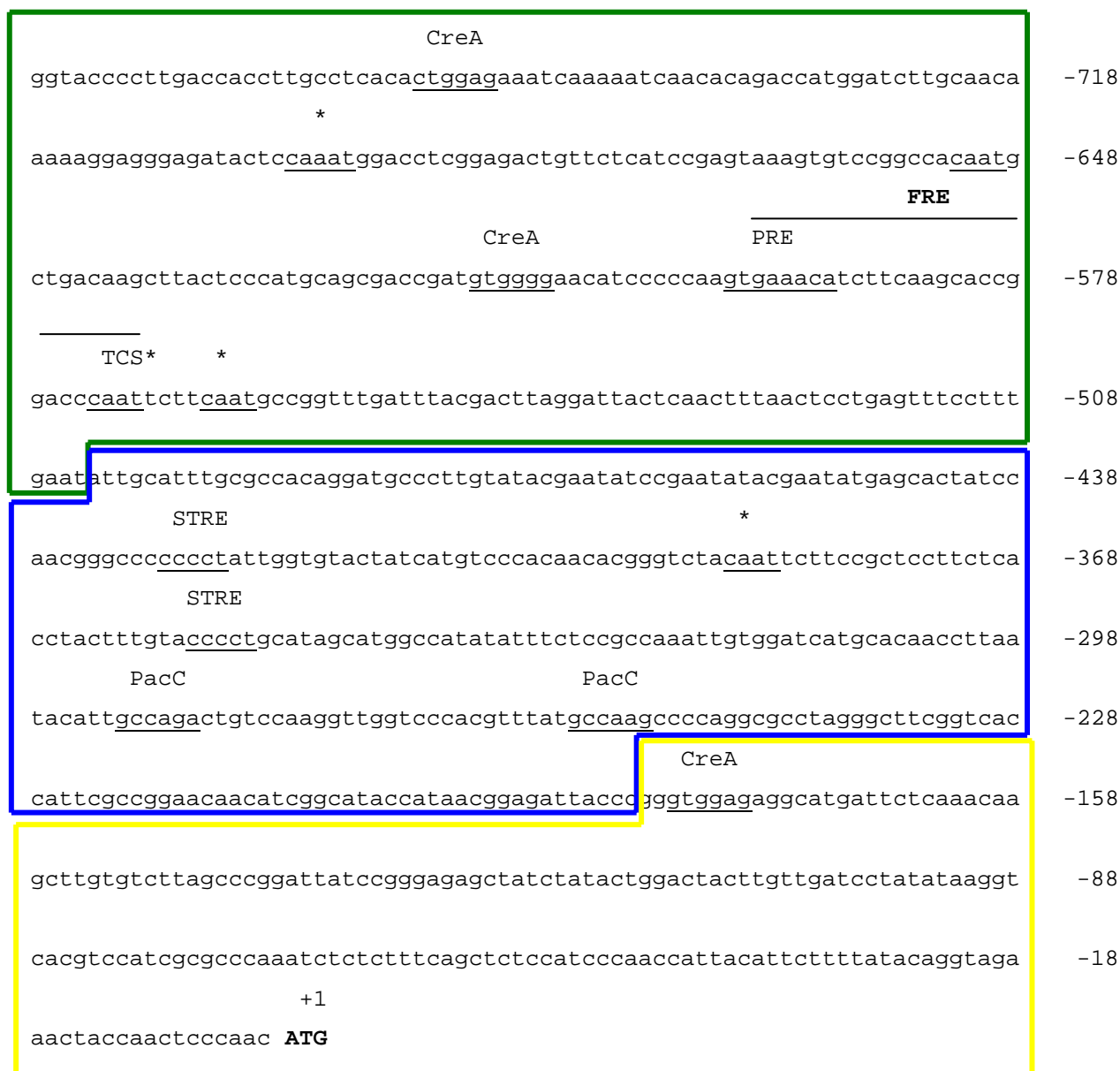


Figura 3: Sequência de nucleotídeos da região regulatória do gene que codifica *plg1* de *Penicillium griseoroseum*. O códon de início da tradução está em negrito e em letras maiúsculas. Os cis-elementos estão sublinhados e indicados, para ligação de CreA, PacC, STRE (elemento de resposta ao estresse), PRE e TCS que constituem o elemento de resposta à invasão e a filamentação (FRE). Possíveis CAAT box estão identificados por (*) (Bazzolli, 2003). A caixa em verde representa o Fragmento A, em azul o Fragmento B e em amarelo o Fragmento C.

O plasmídeo *pgpd-gfp* (6,4kb), contendo o gene que codifica a proteína verde fluorescente GFP da hidromedusa *Aequorea victoria* (SGFP-TYG), sob o controle do promotor constitutivo e forte do gene *gpdA* e da região terminadora do gene *trpC* de *A. nidulans* foi utilizado como controle da fluorescência (Punt *et al.*, 1988).

3.8.2 - Obtenção de Protoplastos

Para a obtenção dos protoplastos inicialmente uma suspensão de esporos foi plaqueada em meio completo recoberto com papel celofane e incubada por 20 horas a 25 °C. Após o crescimento, aproximadamente 800 mg de micélio foram misturados com 5 mL de tampão de digestão (KCl 0,8 M, pH 5,8; tampão fosfato 10 mM; 15 mg da enzima GLUCANEX – Novo Nordisk). Essa mistura foi mantida a 30 °C, 80 RPM por 3 horas. A suspensão foi filtrada e lavada 3 vezes em SCT (sorbitol 1 M; CaCl₂ 0,05 M e Tris-HCl 0,1 M) e centrifugada a 3000g durante 15 min. O sedimento contendo os protoplastos foi homogeneizado em SCT para se obter suspensão com concentração final de 10⁸ protoplastos/mL

3.8.3 – Co-transformação da linhagem mutante PG63 de *P. griseoroseum*

A transformação foi realizada de acordo Yelton et al (1984) e Ballance e Turner (1985), com modificações desenvolvidas para *P. griseoroseum* (Queiroz et al., 1998).

Os protoplastos foram misturados com 5 µg de DNA plasmidial das construções acima citadas, 5µg de DNA plasmidial contendo o gene *niaD* e 50 µL de polietilenoglicol 6000 a 25%. A mistura foi incubada em gelo por 20 minutos, seguindo-se a adição de 0,5 mL da mesma solução de polietilenoglicol, mantendo em temperatura ambiente por mais 20 minutos. Após este tempo, os protoplastos foram recuperados por centrifugação e plaqueados em meio de cultivo apropriado com estabilizador osmótico (sacarose 0,56 M), pelo método “pour plate”, e mantidos a 25 °C por 3 dias. A seleção dos transformantes foi baseada na reversão do fenótipo da linhagem mutante PG63 de *P. griseoroseum*, sendo cultivado em meio mínimo.

3.8.4 - Análise molecular dos transformantes

A extração de DNA total das linhagens transformantes com as diferentes construções da região regulatória do gene *plg1* foi realizada conforme Speacht et al. (1982), com modificações. O DNA total foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% para checar sua integridade. A reação de PCR utilizando 10 ng de DNA total de cada linhagem transformante foi realizada empregando os oligonucleotídeos específicos para o gene *gfp*, 5'-AGGGCGTGGAGCAGTTCACC-'3 (GFP1) e 5'-CCTCGATGTTGTGGCGGATC-'3 (GFP2). O programa utilizado para a amplificação consistiu de quarenta ciclos, cada ciclo com um passo a 94 °C por 1 min., um passo a 50 °C, por 1 min. e um passo a 72 °C, por 1 min e 30 segundos. Os produtos de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% .

3.8.5 – Análise qualitativa da fluorescência do gene repórter (proteína GFP)

Todos os transformantes foram monosporicamente purificados e foram realizados microcultivos em lâminas para captura das imagens da epifluorescência utilizando o microscópio Olympus BX-60 com filtro de excitação 460 a 480 nm, utilizando o programa Image Pro® Plus, version 4.0 para análise das imagens. O fungo foi cultivado por 48 horas em meios de cultivo utilizados para determinar a fluorescência foram meio mineral tamponado pH 6,8 com diferentes fontes de carbono, como glicose (0,4 %), pectina (0,4 %) ou sacarose (0,4 %) suplementados com extrato de levedura (0,06 %), mantendo a mesma porcentagem quando glicose e pectina foram utilizadas em conjunto. Meio de cultivo não tamponado também foi utilizado para se verificar o efeito da deleção de cis-elementos de resposta ao pH do meio na expressão do gene repórter.

4. RESULTADOS

4.1 – Estudo de repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de *Penicillium griseoroseum*

4.1.1 - Avaliação do nível de resposta à repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum* quando cultivadas na presença de pectina cítrica e diferentes concentrações de glicose

Uma linhagem mutante de *P. griseoroseum* resistente ao 2-deoxy-D-glicose (M03) foi utilizada para avaliar o nível de resposta à repressão catabólica na produção de pectina liase (PL). A atividade de PL foi verificada para as linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum* cultivadas por 120 horas em meio contendo 0,4 % de pectina cítrica e glicose nas concentrações de 0,4, 0,5, 1,0 e 1,5 % (Figura 4). Foi verificado aumento na atividade de PL para a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* quando cultivada na presença de pectina cítrica e glicose (0,4 %), enquanto que para a linhagem selvagem, nesta mesma condição de cultivo, ocorreu queda significativa da atividade enzimática de PL com o aumento na concentração de glicose. Na concentração de 0,5 % de glicose, a atividade de PL da linhagem mutante M03 equipara-se à atividade de PL da linhagem selvagem na presença de pectina cítrica sem adição de glicose. Nas maiores concentrações de glicose testadas (1,0 e 1,5 %), a atividade de PL da linhagem mutante M03 reduziu-se à metade da apresentada na condição controle (pectina cítrica sem glicose), enquanto que para a linhagem selvagem, a atividade de PL foi completamente abolida. Este resultado reflete a deficiência do processo de repressão catabólica para a atividade de PL apresentada pela linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*.

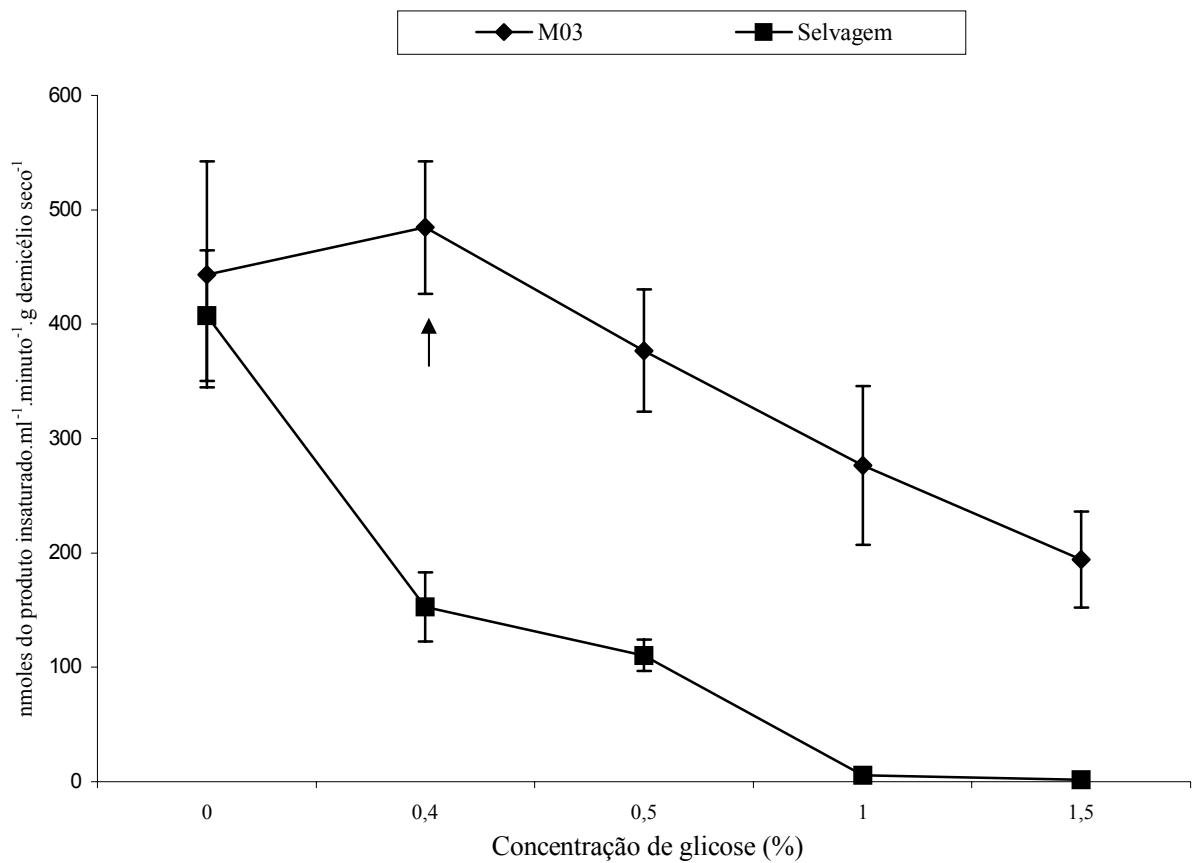


Figura 4: Nível de resposta à repressão catabólica das linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum*. Os sobrenadantes das culturas e o micélio para determinação da massa seca foram coletados após 120 horas de cultivo. O meio de cultivo contém pectina 0,4% e concentrações de glicose variando de 0 a 1,5%. A seta indica um aumento na atividade de PL para a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* em relação à linhagem selvagem. Foram realizadas três repetições independentes para cada condição e os valores representam a média de todos os experimentos.

4.1.2 – Correlação entre expressão dos genes *plg1* e *plg2* e a atividade de PL em resposta às condições de repressão catabólica

Duas etapas foram realizadas para este estudo, uma etapa de indução e outra de repressão da expressão dos genes *plg1* e *plg2*. Para a indução, as linhagens selvagem e mutante M03 foram pré-cultivadas em meio contendo pectina cítrica (0,4 %) por 24 e 48 horas. Para a etapa de repressão, o micélio coletado no tempo de cultivo de 48 horas em pectina cítrica foi transferido para meios de cultivo contendo glicose como única fonte de carbono, nas concentrações de 0,4, 1,0 e 1,5 %, e cultivados por 24 e 48 horas. A Figura 5 mostra a atividade de PL das linhagens selvagem e mutante M03 nas etapas de indução e repressão. Em todas as condições de cultivo testadas, o único tratamento em que a atividade de PL da linhagem selvagem de *P.griseoroseum* é igual à da linhagem mutante M03 é o cultivo em pectina cítrica no tempo de 48 horas, segundo o teste estatístico aplicado (Figura 5A). Nos demais tratamentos, a linhagem mutante M03 apresentou maior atividade de PL, principalmente na presença de glicose (Figura 5B e 5C). A expressão do gene *plg1* foi determinada por RT-PCR, sendo possível verificar que a indução do gene foi efetiva quando as linhagens selvagem e mutante M03 foram cultivadas em pectina cítrica por 24 e 48 horas (Figura 6A). A detecção do produto de amplificação do gene *plg1* pode ser observada quando a linhagem mutante M03 foi cultivada na presença de 0,4 e 1,0 % de glicose por 24 horas. Para a linhagem selvagem, neste mesmo tempo, o transcrito do gene *plg1* só foi verificado na presença de 0,4 % de glicose (Figura 6B). No tempo de 48 horas, não foi observado nenhum produto de amplificação do gene *plg1*, tanto para a linhagem selvagem como para a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* (Figura 6C).

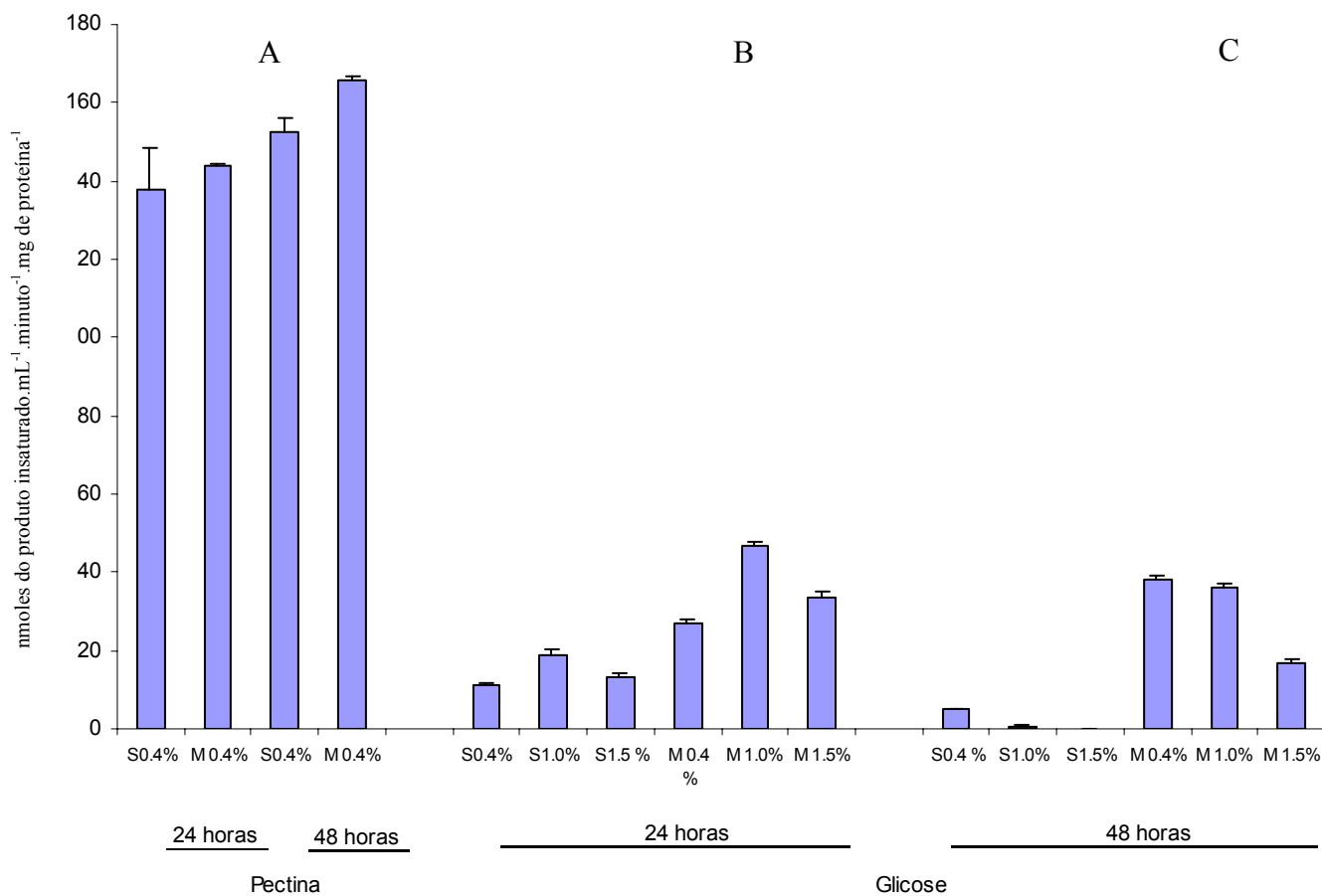


Figura 5: Atividade específica de PL das linhagens selvagem e mutante M03 de *Penicillium griseoroseum* em condições de repressão catabólica com diferentes concentrações de glicose. Os sobrenadantes das culturas foram coletados em 24 e 48 horas de cultivo do fungo em pectina 0,4% (A). O micélio proveniente do tempo de 48 horas de cultivo pectina cítrica foi transferido para meios de cultivos contendo 0,4%, 1,0% e 1,5% de glicose por 24 (B) e 48 horas (C). Foram realizadas três repetições independentes para cada condição de cultivo por experimento. Os valores representam a média de três experimentos. O teste estatístico aplicado foi Scott Knott a 5% de probabilidade.

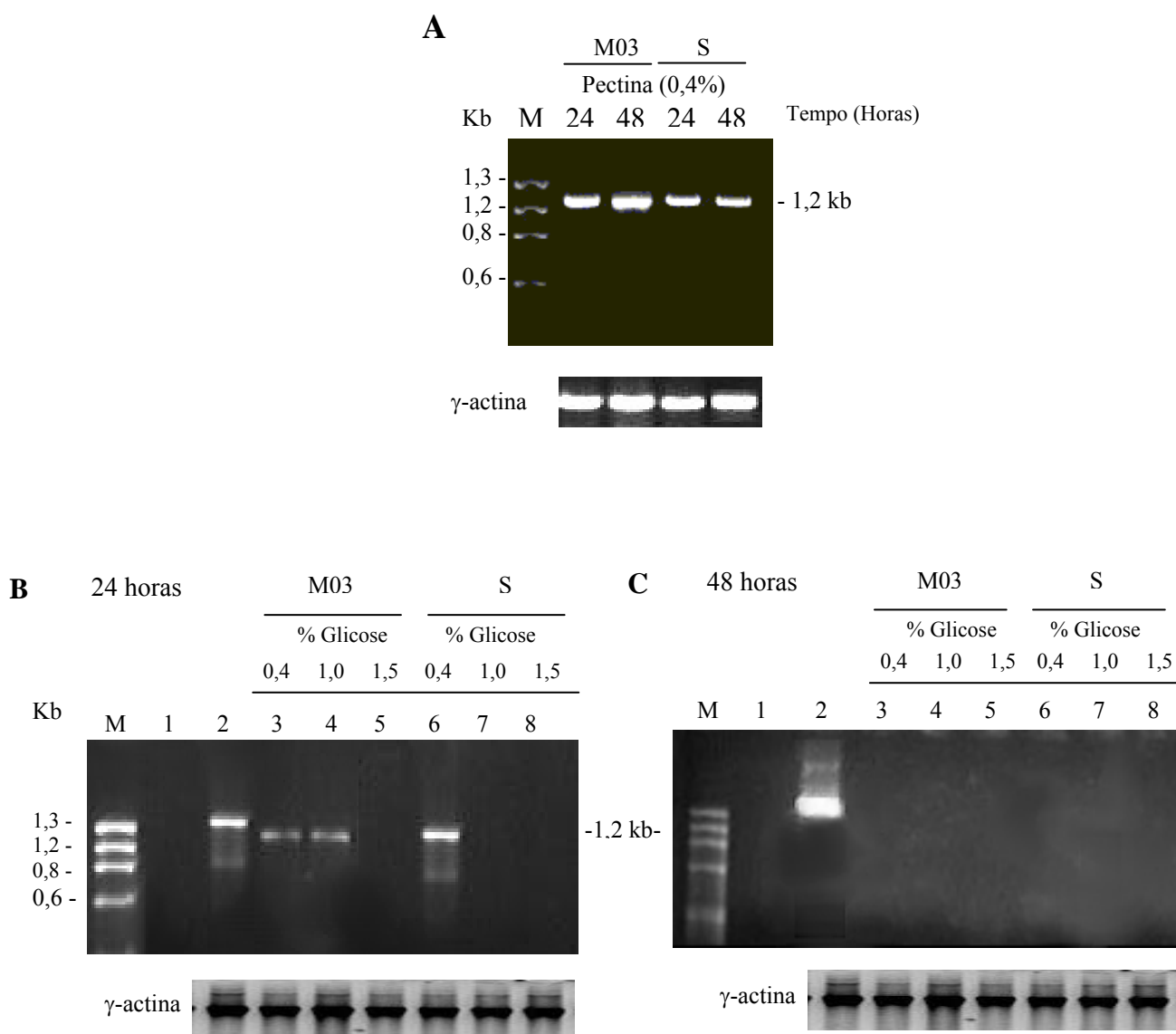


Figura 6: Avaliação por RT-PCR da expressão do gene *plg1* das linhagens selvagem e mutante M03 de *Penicillium griseoroseum* em condição de repressão catabólica com diferentes concentrações de glicose. O RNA total foi extraído em 24 e 48 horas a partir do micélio crescido em pectina (A) e transferido para meio de cultivo contendo diferentes concentrações de glicose por 24 (B) e 48 horas (C). A concentração de glicose no meio de cultivo foram de 0,4% (canaletas 3 e 6), 1,0% (canaletas 4 e 7) e 1,5% (canaletas 5 e 8) para as linhagens mutante (M03) e selvagem (S) de *P. griseoroseum*. Canaleta 1, o branco da reação. Canaleta 2, produto de amplificação a partir do DNA total. M, marcador de tamanho molecular fago ϕ X174/*Hae*III. O controle foi feito utilizando oligonucleotídeos específicos do gene que codifica γ -actina em *P. griseoroseum*.

A avaliação da expressão do gene *plg1* foi também examinada durante o cultivo em glicose por 48 horas (Figura 6C). Nesta condição, não foi possível detectar nenhum transcrito do gene *plg1* em ambas as linhagens. A expressão do gene *plg2* foi verificada em todas as condições testadas. Somente na fase de indução foi possível detectar sinal de amplificação nos dois tempos de cultivo testados (dados não mostrados).

Comparando os dados de expressão do gene *plg1* e a atividade de PL determinados nas mesmas condições e tempo de cultivo, é possível inferir que o gene *plg1* é o maior responsável pela produção de PL na linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*. Podemos considerar que a expressão do gene *plg1* no tempo de 24 horas reflete os resultados de atividade de PL em 48 horas, intervalo suficiente para o processamento e tradução do mRNA.

4.2 – Influência de moduladores de cAMP na expressão dos genes *plg1* e *plg2* e atividade de pectina liase da linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*

A atividade de PL foi determinada tanto para linhagem selvagem como para a linhagem mutante M03, na presença de substâncias que afetam a via de transdução de sinais dependente de cAMP, como cafeína e fluoreto de sódio (NaF).

As linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum* foram pré-cultivadas em meio mínimo para obtenção de massa micelial. O micélio foi coletado e transferido para meios de cultivo contendo sacarose/extrato de levedura e combinações de cafeína e NaF, nas concentrações de 5 e 2mM, respectivamente. As concentrações escolhidas não afetam o desenvolvimento do fungo, como demonstrado por Bazzolli (2003).

A Figura 7 mostra o resultado da atividade específica de PL nas condições testadas. O extrato de levedura foi substituído por cafeína e NaF, sendo possível verificar que tanto para a linhagem selvagem como para a linhagem mutante M03, a cafeína é a substância que melhor substitui o papel do extrato de levedura na produção de PL. Quando NaF foi utilizado em substituição ao extrato de levedura, a atividade foi bastante reduzida, mas é verificada uma

diferença significativa na atividade de PL para as linhagens selvagem e mutante M03 de *P. griseoroseum*. A maior atividade de PL para ambas as linhagens foi obtida na presença de cafeína e NaF, evidenciando o efeito sinérgico destas substâncias na produção de PL.

Análise da expressão do gene *plg1* foi realizado com RNA total extraído da linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* em condições de cultivo cafeína como substância moduladora de cAMP (Figura 8). Foi possível observar que na presença de extrato de levedura ou extrato de levedura acrescido de cafeína, não foi detectado o transcrito do gene *plg1*. Este resultado também foi observado por Bazzolli (2003), quando testou esta mesma substância para a linhagem selvagem de *P. griseoroseum*, indicando que o mecanismo pelo qual uma metilxantina atua não difere na linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*.

4.3 – Determinação da funcionalidade dos cis-elementos putativos da região regulatória do gene *plg1*

A região regulatória do gene *plg1* foi previamente determinada e depositada no *GenBank* sob o número de acesso AF502279 (Bazzolli, 2003). Para determinar a funcionalidade dos cis-elementos, deleções na região regulatória do gene *plg1* foram geradas com enzimas de restrição (Figura 9). Todos os clones recombinantes foram derivados do plasmídeo *pplg1-gfp786*, que contém a região regulatória do gene *plg1* completa seguida da região estrutural do gene *gfp*.

Usando co-transformações com os plasmídeos pAN-7.1 e plasmídeos contendo fragmentos da região regulatória do gene *plg1* (ver Material e Métodos), foram introduzidos no DNA cromossomal da linhagem mutante PG63 de *P. griseoroseum*. As linhagens transformantes se demonstraram estáveis, sem a presença de setores quando cultivadas. A reação de amplificação com oligonucleotídeos específicos correspondentes ao gene *gfp* foi realizada para demonstrar que uma não evidência da fluorescência da proteína GFP não tenha sido devida a ausência da mesma, e sim devido ao fato do controle da expressão submetida as deleções da região regulatória do gene *plg1* (Figura 10).

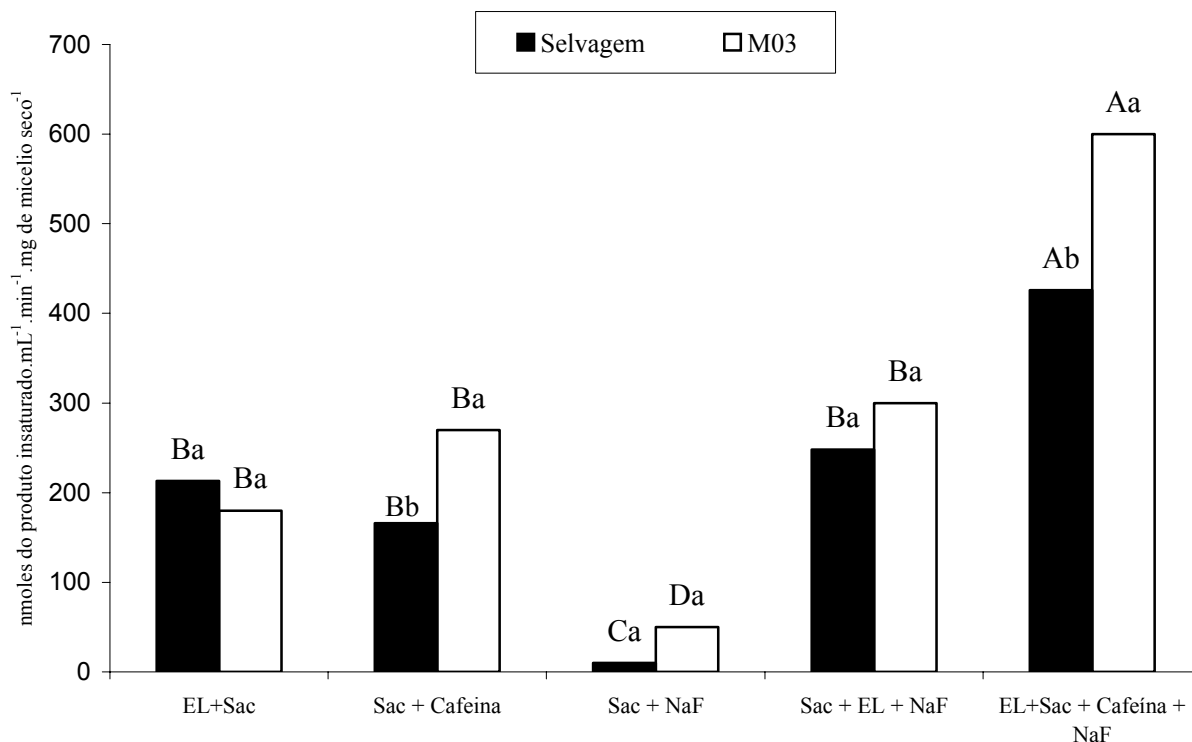


Figura 7: Influência da cafeína e fluoreto de sódio na atividade de pectina liase das linhagens selvagem e mutante M03 de *Penicillium griseoroseum*. Os sobrenadantes das culturas foram coletados após 48 horas de cultivo e o micélio coletado para obtenção de massa seca. Os meios de cultivo utilizados foram meio mineral tamponado contendo sacarose 0,4% (Sac), extrato de levedura 0,06% (EL) e as substâncias que afetam a cascata de transdução de sinais via cAMP, a cafeína e fluoreto de sódio (NaF), a uma concentração de 5 e 2 mM, respectivamente. Combinações entre estes compostos foram também realizadas, mantendo a concentração citada de cada um. Para cada meio de cultivo, barras com a mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade. Para cada linhagem, barras com a mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

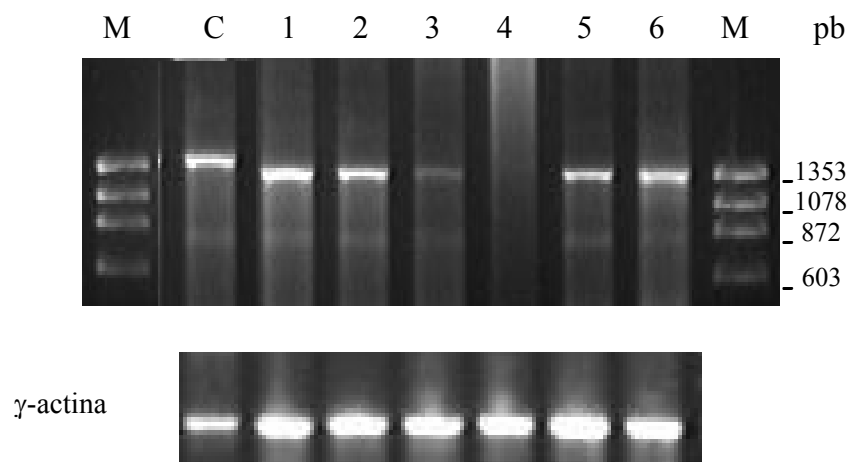


Figura 8: Avaliação do efeito da cafeína na expressão do gene *plg1* da linhagem mutante M03 de *Penicillium griseoroseum* por RT-PCR. A extração do RNA total foi realizada a partir do micélio coletado em meio mineral tamponado contendo sacarose e extrato de levedura (1), sacarose (2), extrato de levedura (3), extrato de levedura e cafeína (4), sacarose e cafeína (5) e sacarose, extrato de levedura e cafeína (6). M, marcador de tamanho fago Φ X174/*Hae*III. A letra C corresponde ao produto de amplificação a partir do DNA total. O controle foi feito utilizando oligonucleotídeos específicos do gene que codifica γ -actina em *P.griseoroseum*.

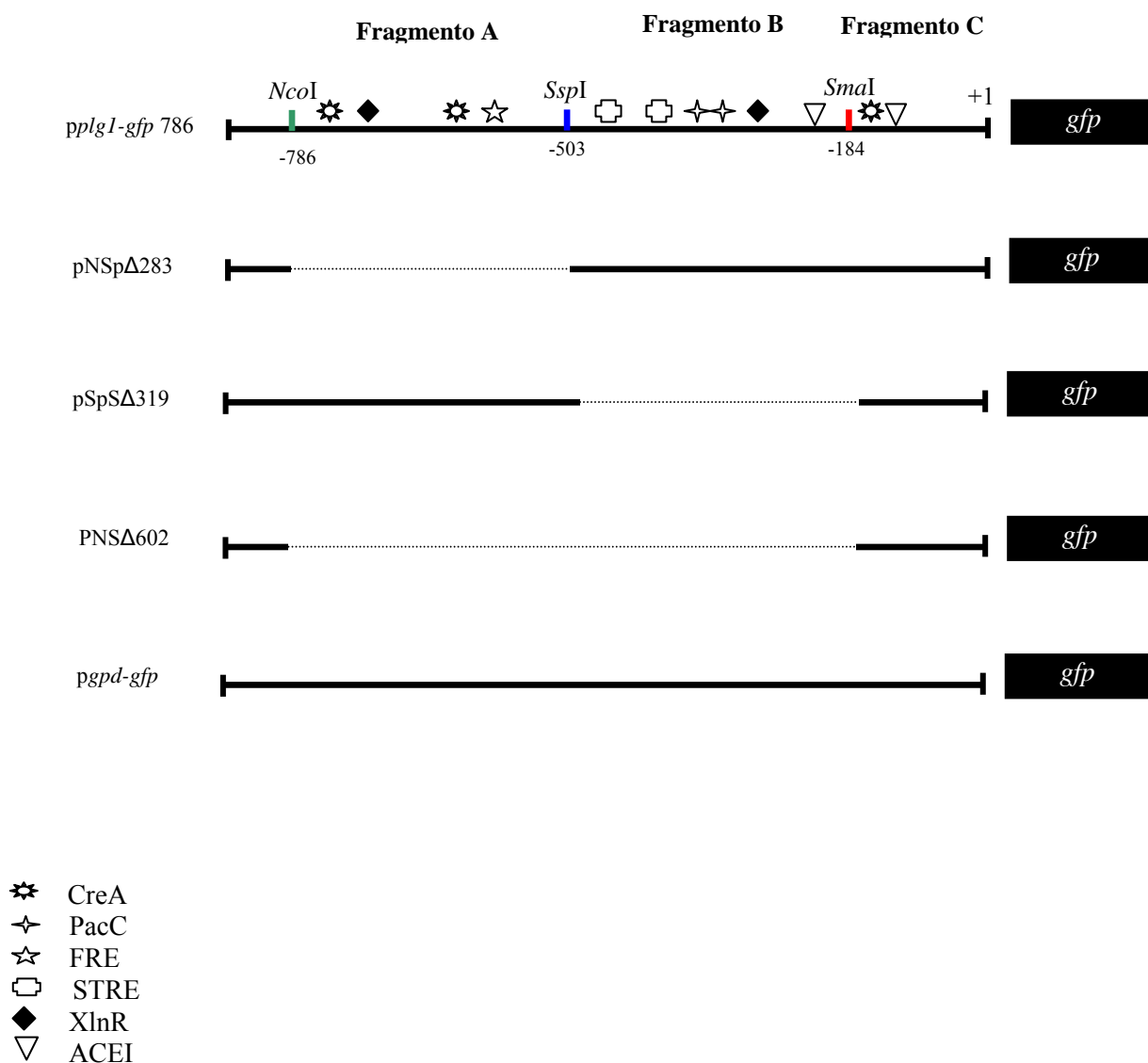


Figura 9: Análise por deleção da região regulatória do gene *ppls1* de *Penicillium griseoroseum*. Representação esquemática do plasmídeo repórter *ppls1-gfp786* (com promotor intacto) e seus derivados. O Fragmento A (correspondendo à região regulatória do gene *ppls1* entre -786 e -503), Fragmento B (região regulatória entre -503 e -184) e o Fragmento C (região regulatória entre -184 e +1). Os números precedidos pelo triângulo em cada plasmídeo indicam o tamanho em pares de bases (pb) da deleção realizada na região regulatória do gene *ppls1*. Os cis-elementos putativos estão indicados na construção *ppls1-gfp786*, os símbolos representando cada *cis*-elemento, identificados na legenda. Os números negativos indicam a posição do sítio de restrição de cada enzima referente ao sítio putativo +1 da tradução do gene *ppls1*. Um plasmídeo controle contendo um gene constitutivo controlando a expressão do gene repórter *gfp* está representado como *pgpd-gfp*.

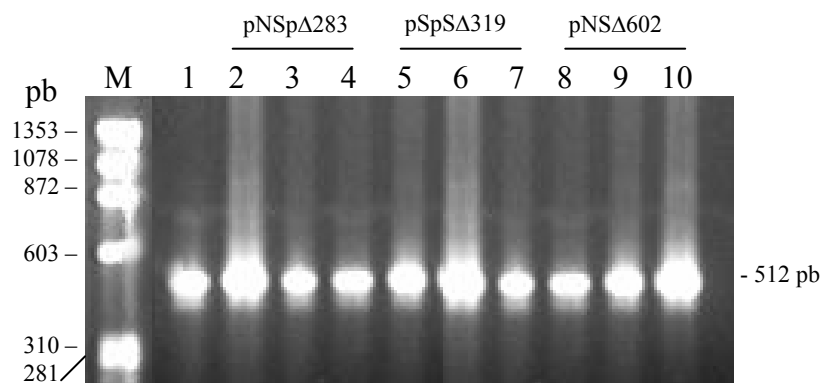


Figura 10: Detecção por PCR do gene *gfp* nas linhagens transformadas de *Penicillium griseoroseum* com as diferentes construções da região regulatória do gene *plg1*. O DNA total de diferentes linhagens transformadas com os plasmídeos pNSpΔ283 (canaletas 2, 3 e 4), pSpSA319 (canaletas 5, 6 e 7) e pNSΔ602 (8, 9 e 10) foi extraído. A reação de PCR foi realizada com 10 ng de DNA total de cada linhagem transformada. M, marcador de tamanho fago ØX174/*Hae*III. Canaleta 1 se refere ao controle positivo utilizando o DNA plasmidial contendo o gene *gfp*.

Subseqüente análise dos clones gerados foi determinada pela observação da epifluorescência da proteína GFP no micélio do fungo cultivado em diferentes fontes indutoras (pectina e sacarose/extrato de levedura) e repressoras (glicose e pectina/glicose) e sob luz branca (Figuras 11 e 12, respectivamente). A observação da fluorescência foi verificada em pelo menos dois transformantes para evitar uma interferência do efeito de posição.

Com a análise de fluorescência nos micélios dos transformantes obtidos com a construção pNSp Δ 280 (Fragmento A), pode-se observar que a ausência da região que contém os dois cis-elementos de ligação a CreA, permitiu a expressão do gene repórter na presença de pectina e glicose (Figura 11G), sendo esta uma condição de repressão catabólica verificada pelo controle contendo o promotor do gene *plg1* intacto (Figura 11C). Este dado permite inferir que estes dois sítios são funcionais e responsáveis pela repressão da expressão de *plg1* na presença de glicose.

O Fragmento B, contendo dois cis-elementos STRE (-354 e -452), dois sítios consenso para ligação da proteína PacC (-256 e -288), foi importante para a expressão do gene repórter na presença de meios indutores como pectina e sacarose/extrato de levedura (Figuras 11I e 11M). O cultivo das linhagens transformantes foi realizado tanto em meios tamponados como não-tamponados para determinar a funcionalidade dos cis-elementos para ligação da proteína PacC. Em meios não-tamponados, nenhuma diferença foi observada em relação aos meios tamponados para as diferentes construções, sugerindo que os cis-elementos de ligação à PacC presentes no Fragmento B não são funcionais ou, no contexto, não são essenciais para expressão de PL. Adicionalmente, neste fragmento, identificamos uma seqüência consenso para ligação da proteína AceI, responsável pelo efeito negativo na indução da expressão dos principais genes celulolíticos e xilanolíticos de *Trichoderma reesei* (Saloheimo et al., 2000; Aro et al., 2002). Um cis-elemento putativo de ligação ao ativador transcricional de genes celulolíticos e xilanolíticos (XlnR), foi também identificado (Gielkens et al., 1999). A retirada do Fragmento B aboliu completamente a expressão do gene *gfp* em qualquer condição de cultivo (Figuras 11N – 11Q).

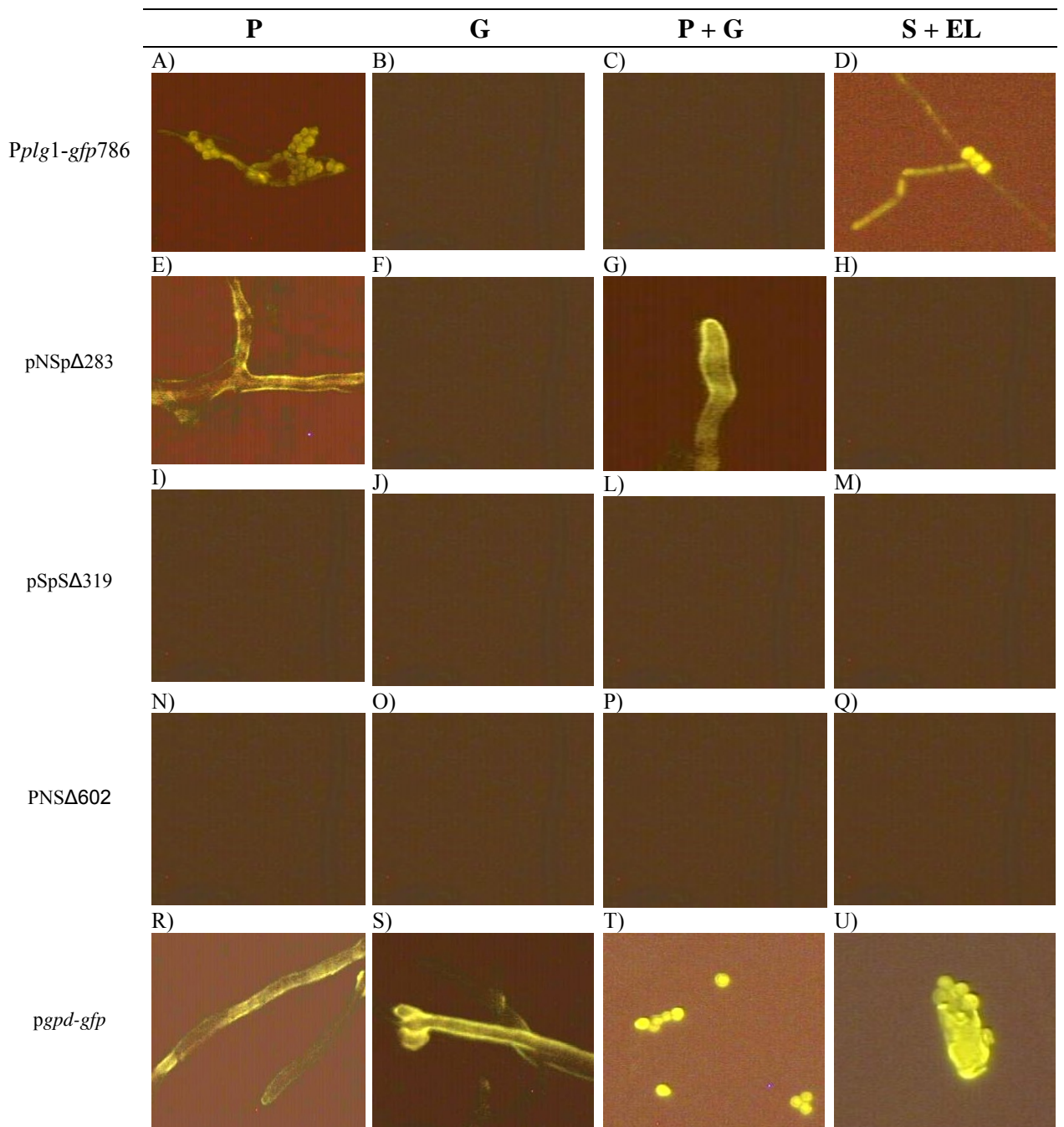


Figura 11: Análise de diferentes deleções na região regulatória do gene *plg1* de *Penicillium griseoroseum* e o efeito na expressão do gene *gfp*. Análise da expressão do gene repórter *gfp* foi verificado em micélio crescido por 48h em meio de cultivo contendo como fontes de carbono, pectina (P), glicose (G), pectina/glicose (P+G) e sacarose/extrato de levedura (S+EL). Análise por microscopia de fluorescência da proteína *Green Fluorescent Protein* (GFP) está representada pelas Figuras (A-U). Um transformante com expressão constitutiva do gene *gfp* (*pgpd-gfp*) (R-U) e outro com promotor intacto do gene *plg1* foram utilizados como controle da fluorescência.

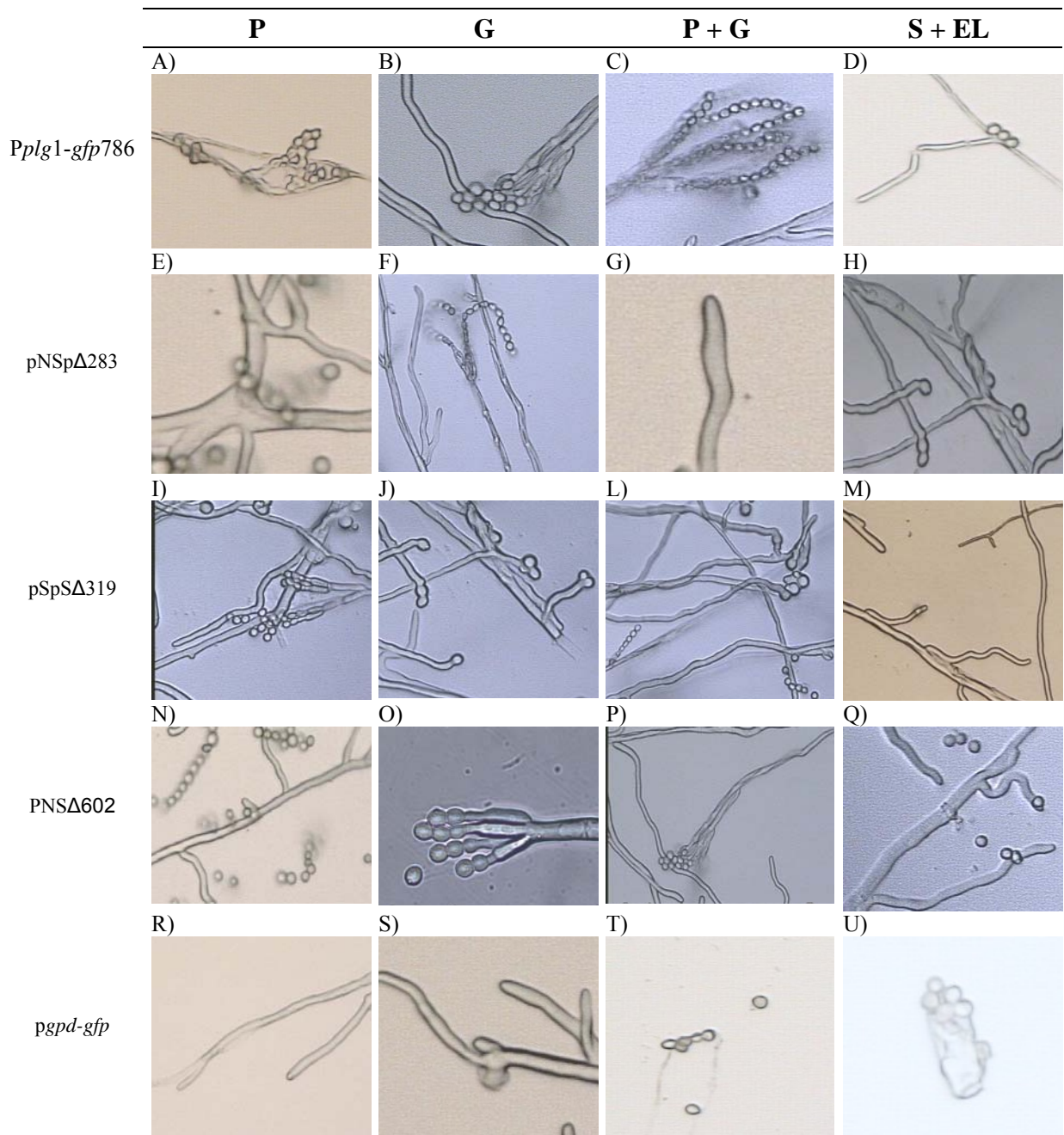


Figura 12: Visualização do micélio de linhagens transformantes de *Penicillium griseoroseum* para análise de diferentes deleções na região regulatória do gene *plg1*. Estas figuras são as mesmas utilizadas na figura 8, observadas sob luz branca. O micélio foi crescido por 48 horas em meio de cultivo contendo como fontes de carbono, pectina (P), glicose (G), pectina/glicose (P+G) e sacarose/extrato de levedura (S+EL). Um transformante com expressão constitutiva do gene *gfp* (*pgpd-gfp*) (R-U) e outro com promotor intacto do gene *plg1* foram utilizados como controle da fluorescência.

Nas outras duas construções, pSpSA319 e pNSΔ602, não se observou nenhuma fluorescência mesmo nas condições de indução (Figuras 11I, 11M, 11N e 11Q), que pode ser explicado pelo fato de não conterem a região responsável pela indução (Fragmento B) citado acima. Mesmo na construção pNSΔ602, que não contém a região dos dois cis-elementos de ligação a CreA funcionais, não se espera uma expressão do gene repórter quando as linhagens transformadas foram cultivadas em glicose (Figura 11O) ou pectina e glicose (Figura 11P), devido a ausência da região que contém os cis-elementos responsáveis pela indução. Uma das seqüências consenso para ligação de CreA (-179), mantida em todas as construções, parece não ter efeito na regulação da expressão do gene *plg1* em condições de repressão catabólica (Fragmento C).

Em todas as condições testadas foi possível verificar a fluorescência no micélio e ou conídios na linhagem transformada com a construção *pgpd-gfp* (controle), que contém o promotor com expressão constitutiva do gene da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *A. niger* controlando a expressão do gene *gfp* (Figuras 11R–U). A região regulatória de 786 pb do gene *plg1* (*pplg1-gfp786*), comandando a expressão do gene *gfp*, também foi utilizada como controle (Figuras 11A–D).

5. DISCUSSÃO

A análise de linhagens mutantes deficientes em repressão catabólica auxilia no entendimento do desencadeamento da resposta celular às alterações de concentrações de glicose no meio externo. Mutantes resistentes ao análogo da glicose, 2-deoxy-D-glicose, apresentam alterações no sistema de transporte de açúcar, na hexoquinase ou fosfatase, e geralmente são menos sensíveis à repressão catabólica (Minjares-Carranco et al., 1997). A linhagem mutante M03 de *Penicillium griseoroseum* foi testada para produção de enzimas como poligalacturonase (PG) e pectina liase (PL), apresentando maior produção destas enzimas em relação à linhagem selvagem quando o fungo foi cultivado na presença de pectina ou pectina e glicose (Lima et al., 2003).

Nossos resultados demonstraram que a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* é resistente à repressão catabólica, quanto à produção de PL, em altas concentrações de glicose. A síntese de PL foi aumentada quando pectina cítrica e glicose (0,4 % de ambas) foram utilizadas em conjunto no meio de cultivo (Figura 4). É possível que a glicose possa ter sido utilizada para o crescimento celular por ser facilmente metabolizada, enquanto a pectina cítrica pode ter agido como indutor da síntese de PL quando ambas as fontes estavam presentes no meio de cultivo. A deficiência na assimilação de glicose pode também ter interferido na ativação efetiva da via de transdução de sinal que desencadeia o processo de repressão catabólica na linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*. Para a linhagem selvagem de *P. griseoroseum*, os dois genes que codificam para PL, *plg1* e *plg2*, são reprimidos em nível transcricional quando o fungo é

cultivado na presença de glicose (0,4 %) ou outras combinações de açúcares simples, mesmo na presença de pectina, demonstrando que o processo de repressão catabólica é eficiente (Bazzolli, 2003).

A regulação da síntese de enzimas pectinolíticas em *Aspergillus niger* foi estudada avaliando o efeito da adição de glicose durante o processo de fermentação em meio contendo milho como indutor da expressão (Panda et al., 2004). Para as enzimas polimetilgalacturonase (PMG) e PG, a redução da síntese foi evidente quando o nível de glicose estava acima de 5 g/L. Efeito de repressão catabólica não foi demonstrado para síntese de PL nas mesmas condições, ressaltando que esta enzima foi pobremente produzida em relação à PMG e PG no meio de cultivo utilizado como indutor (Panda et al., 2004). Resultado similar foi observado para síntese de invertase em *A. niger*, na qual 10 g/L de glicose não foram suficientes para reprimir a síntese de invertase. Mecanismo de repressão catabólica para a síntese de invertase foi observado em concentrações de glicose acima de 20 g/L, porém, quando o fungo foi cultivado nesta concentração de glicose por um longo período de tempo, após 60 horas de cultivo, ocorreu um efeito de desrepressão da síntese desta enzima, e neste tempo, a concentração de glicose era de 5 g/L (Rubio e Navarro, 2005). Contraditoriamente, a síntese de invertase em *Aspergillus nidulans* permanece reprimida mesmo em concentrações residuais de glicose (0,5 g/L) (Vainstein e Peberdy, 1991).

Em *Trichoderma reesei*, efeito de desrepressão foi observado para expressão de genes celulolíticos, como celobiohidrolase I (*cbh1*), após longo tempo de cultivo com consumo total de glicose e sem a adição de um indutor, o que poderia prover ao fungo um mecanismo de sobrevivência sob condições de escassez nutricional. Entretanto, quando o micélio foi pré-cultivado na ausência de uma fonte indutora e depois transferido e cultivado, por longos períodos, sem uma fonte de carbono, não foi detectada expressão do gene *cbh1*. Este dado sugere que a carência de carbono, por si só, não é suficiente para induzir a expressão deste gene, e que algum tipo de indução é requerida nos estágios iniciais do crescimento do fungo. Esta indução pode ocorrer pela liberação de oligossacarídeos da parede celular do próprio fungo ou pela

formação de soforose e outros açúcares indutores formados a partir da atividade de transglicosilação de uma β -glicosidase constitutiva sob a glicose do meio de cultivo (Ilmén et al, 1997).

Nossos dados demonstram claramente que a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* apresenta uma expressão de PL diferenciada da linhagem selvagem em condições de repressão catabólica. Devido ao fato de uma não ter sido detectado o transcrito do gene *plg2* em nenhum dos tempos testados e aos dados de atividade de PL, infere-se que realmente o gene *plg1* seja o principal gene que codifica para PL neste fungo.

O estímulo para o desencadeamento de uma resposta celular pode ser proveniente de um contato físico entre substratos insolúveis e receptores presentes na superfície celular, ativando vias de transdução de sinal transmembrana, como no caso de enzimas para degradação de quitina (Mach et al., 1996). Um outro tipo de mecanismo de resposta é fundamentado na existência de níveis baixos de expressão constitutiva de genes responsáveis pela formação de um indutor da expressão gênica, como no sistema de expressão dos genes celulolíticos em fungos filamentosos (Aro et al., 2005).

No estudo de vias de transdução de sinais que participam da regulação da expressão gênica, diversas substâncias que bloqueiam ou ativam alvos específicos têm sido cada vez mais utilizadas. Os bloqueadores de proteínas G e principalmente as substâncias moduladoras de cAMP têm auxiliado na identificação de vias de transdução de sinais envolvidas na expressão de genes de patogenicidade e de interesse industrial (Hakil et al., 1998; Firmino et al, 2002; Han et al., 2004). A cascata de transdução de sinais é complexa e ramificada, mas que parece ser conservada em diversos fungos (D'Souza e Heitman, 2001).

Curiosamente, o gene *plg1* de *P. griseoroseum* é expresso tanto na presença de sacarose/extrato de levedura, na ausência do indutor natural pectina, como também na presença de substâncias que interferem na cascata de transdução de sinais via cAMP, sugerindo o envolvimento positivo desta molécula na expressão deste gene (Bazzolli, 2003).

Considerando a resposta mais efetiva para a síntese de PL na linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*, moduladores de cAMP foram utilizados, testando a ação conjunta de cafeína e fluoreto de sódio (NaF) na presença de sacarose/extrato de levedura. O efeito sinérgico das substâncias moduladoras de cAMP e maior atividade de PL é evidente para linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* (Figura 7). Uma maior capacidade de manutenção do nível endógeno de cAMP pela linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* em relação à linhagem selvagem pode ter sido o motivo da amplificação do sinal de transdução via cAMP, culminando em uma produção mais efetiva de PL. Este dado corrobora com os que correlacionam o nível endógeno de cAMP com a assimilação de glicose pela célula. A disponibilidade de glicose leva à indução de enzimas glicolíticas e a conseqüente baixa do nível de cAMP (D'Souza e Heitman, 2001; Fliphi et al., 2003). Para a linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum*, este efeito seria inverso, pois ocorre deficiência assimilação de glicose e possível aumento do nível endógeno de cAMP.

Em *T. reesei*, a produção da enzima quitinolítica *N*-acetil-glicosaminidase foi avaliada quanto ao efeito de cAMP e moduladores de proteínas G. Todas as substâncias utilizadas tiveram efeito negativo na produção da enzima, provocando decréscimo na atividade extracelular em até 95%, sugerindo uma via de sinalização composta por proteínas G, adenilato ciclase e cAMP (Firmino et al., 2002).

O papel sugerido para sacarose na indução da expressão do gene *plg1* de *P. griseoroseum* é de co-fator. Rubio e Navarro (2005) estudando o mecanismo de indução da síntese de invertase em *A. niger* pela sacarose, demonstraram que ocorre interação da sacarose com a membrana celular do fungo. Ensaio enzimático utilizando protoplastos expostos à sacarose por diferentes tempos, possibilitou aumentos na produção de invertase, levando os autores a proporem um mecanismo de indução, onde a molécula de sacarose interage com receptores na membrana celular e que este contato geraria sinal químico dentro da célula que pode ser traduzido e amplificado pelo cAMP, iniciando a indução da síntese da enzima em nível de DNA. Dados obtidos com a análise da indução da síntese de invertase por moléculas modificadas ou similares a estrutura da sacarose, como sacarose-octa-acetato, sacarose 6-fosfato, turanose e lactose,

demonstraram que carbonos na posição 3 e 4 do anel furanosídico podem estar envolvidos na interação da sacarose com a membrana celular (Rubio e Navarro, 2005).

Sistemas de transporte de hexoses, em sua grande maioria, apresentam transportadores com alta afinidade para glicose em relação a outros açúcares, o que não é surpreendente, visto que a glicose é a fonte nutricional mais eficiente. No fungo *Botrytis cinerea*, foi clonado e caracterizado um novo tipo de transportador específico para frutose, FRT1, que parece estar envolvido somente no processo de germinação de esporos deste fungo. Poucos relatos sobre transporte específico para frutose são encontrados na literatura, sendo descrito para algumas leveduras e *Neurospora crassa* (Doehlemann et al., 2005).

O mecanismo pelo qual a sacarose induz a expressão do gene *plg1* em *P. griseoroseum*, na presença de extrato de levedura, ainda é especulativo. Os dados relatados acima podem inferir papel potencial na ativação de cascatas de transdução de sinais acoplados a receptores de sacarose ou frutose.

A análise funcional da região regulatória do gene *plg1* permitiu identificar uma região interna de 319 pb contendo cis-elementos que podem exercer importante papel na indução da expressão deste gene. A deleção do Fragmento B (Figura 9) aboliu a expressão do gene repórter em todas as condições testadas, sendo possível observar a existência de seqüências consenso para ligação da proteína regulatória XlnR, elementos de resposta ao estresse (STRE) e alterações do pH do meio (PacC), elemento CAAT e um cis-elemento de ligação ao fator protéico AceI, que devem ser importantes para a expressão do gene *plg1* na presença de pectina.

A indução da expressão do gene *plg1*, na presença de sacarose e extrato de levedura, parece não depender dos mesmos cis-elementos ou região regulatória do que a indução por pectina (Figura 11H). As alterações na região regulatória do gene *plg1* não permitiram a expressão do gene *plg1* na presença de sacarose e extrato de levedura.

A proteína XlnR foi isolada de *A. niger* e controla a transcrição de genes que participam da degradação de xilana, genes que codificam para endoglucanases e celobiohidrolases, e adicionalmente, genes envolvidos no catabolismo de D-xilose (van Peij et al., 1998; Gielkens et

al., 1999; de Vries et al., 1999). Um homólogo do gene *xlnR* foi isolado e caracterizado em *Aspergillus oryzae* (Marui et al., 2002). Uma ou mais cópias da seqüência consenso 5'-GGCTAA-3' de ligação à XlnR são encontradas em muitas seqüências promotoras de genes que codificam enzimas que degradam polissacarídeos de diferentes fungos filamentosos. Cada gene contém de um a quatro sítios de ligação com orientação variável da seqüência e que funcionam independentemente. Entretanto, análise por mobilidade em gel sugere que XlnR se liga como monômero nos sítios de ligação (van Peij et al., 1998). Em *Penicillium purpurogenum*, análise da região promotora e regulação da expressão de genes que codificam endoxilanases (*xynA* e *xynB*) corroboram com a hipótese de que o controle da expressão destes genes ocorre por um mecanismo similar ao de *A. niger* (Chávez et al., 2002). Apesar de não ter sido identificado até o momento nenhum mecanismo específico para o controle da expressão de genes que codificam enzimas com atividade pectinolítica, a presença de duas seqüências consenso de ligação à XlnR na região regulatória do gene *plg1* de *P. griseoroseum*, sugere a participação de proteínas com papel regulatório similar ao existente para genes xilanolíticos na expressão deste gene.

O elemento de resposta ao estresse, STRE, presente duas vezes no fragmento B da região regulatória do gene *plg1*, pode ter influenciado a expressão do gene repórter, principalmente quando o fungo foi cultivado em meio contendo sacarose suplementada com extrato de levedura. O extrato de levedura possui metilxantinas que podem ocasionar situação de estresse ao fungo, alterando sua morfologia e crescimento (Hakil et al., 1998). Dados da literatura não têm relatado este cis-elemento como efector na ativação de genes, mas possivelmente, ele deve contribuir para a regulação da expressão de genes que respondem a condições de estresse.

AceI tem sido relatado como fator de transcrição com efeito negativo na expressão dos principais genes que codificam celulasas e xilanases em *T. reesei* (Aro et al., 2002). A seqüência N-terminal é conservada entre proteínas putativas AceI de *A. nidulans*, *Talaromyces emersonii* e *N. crassa*. Contraditoriamente à função repressora, é possível que AceI seja capaz de agir como ativador da expressão dependendo do contexto da seqüência consenso na região promotora do gene ou da fonte de carbono disponível (Aro et al., 2005). O gene de *A. nidulans* denominado

stzA, demonstra alta similaridade com o gene *aceI* de *T. reesei*. O gene *stzA* codifica uma proteína envolvida no aumento da resistência ao sal e a agentes danificadores de DNA, sugerindo que AceI pode ter um papel regulatório mais geral, do que somente como repressor para expressão de genes que codificam celulases e xilanases (O'Neil et al., 2002).

A presença de um cis-elemento AceI no Fragmento B da região regulatória do gene *plg1* nos leva a inferir um efeito positivo ou nulo deste fator transcricional na expressão do gene *plg1* de *P. griseoroseum*. Para verificar se AceI atua como repressor do gene *plg1*, assim como para os genes que codificam celulases em *T. reesei*, seria necessária a deleção pontual dos sítios de ligação a AceI na região regulatória do gene *plg1*.

Um estudo dos cis-elementos presentes no Fragmento B da região regulatória do gene *plg1* poderá revelar regiões mais específicas relacionadas com a expressão efetiva deste gene. Técnicas como gel de retardamento e mutações pontuais poderão ser aplicadas para atender este objetivo.

A remoção de dois sítios de ligação a CreA (-613 e -757) da região regulatória do gene *plg1*, Fragmento A, permitiu a visualização da expressão do gene repórter em condição de repressão catabólica, indicando a funcionalidade desses sítios de ligação a CreA no processo de repressão catabólica para o gene *plg1* (Figura 9G). Todos os sítios funcionais de ligação a CreA caracterizados até o momento, apresentam como duas seqüências consenso espaçadas, precedidos por uma região rica em AT, sugerindo que a repressão mediada por CreA ocorre somente por meio da ligação em duplos sítios consensos (Felenbok et al, 2001, Takashima et al., 1996). A distância entre os dois sítios funcionais de ligação a CreA, identificados na região regulatória do gene *plg1*, é similar a distância relatada para dois sítios consenso de ligação a CreA funcionais na região promotora do gene de celobiohidrolase 1 (*cbh1*) de *T. reesei* (Takashima et al., 1996). Cubero e Scazzochio (1994), demonstraram que a ligação de CreA para efeito de repressão catabólica é contexto dependente e depende de dois sítios de ligação. Entretanto, alguns relatos mostram que a ligação de CreA em sítios consenso únicos pode ocorrer. Em *T. reesei*, um único sítio de ligação a CreA/CRE1 na região promotora do gene

celobiohidrolase 2 (*cbh2*) parece ser essencial para posicionamento do nucleossomo em condições de repressão e indução (Zeilinger et al., 2003).

A presença de um único cis-elemento de ligação a CreA (-179) não teve efeito na expressão do gene *plg1* em condições de repressão catabólica (Figura 9P). Alguns sítios de ligação a CreA presentes na região promotora de diferentes genes não são reconhecidos pela proteína CreA, sendo estudadas para determinar os requerimentos mínimos necessários para ligação efetiva da proteína repressora (Cubero e Scazzochio, 1994).

A região regulatória do gene *plg1* poderá ser utilizada para otimização da produção de pectina liase visando à aplicação em escala industrial, assim como para um possível sistema de expressão para produção de proteínas heterólogas em *P. griseoroseum*.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A linhagem mutante M03 de *Penicillium griseoroseum* é mais resistente às condições de repressão catabólica impostas por altas concentrações de glicose do que a linhagem selvagem, evidenciando a deficiência do processo de repressão catabólica nesta linhagem e consequentemente maior produção de pectina liase (PL).

Substâncias que afetam a cascata de transdução de sinais via cAMP, cafeína e NaF, agiram de maneira sinérgica na produção de PL. Em todas as condições de cultivo testadas, a linhagem mutante M03 apresenta maior atividade de PL. Uma maior capacidade de manutenção do nível endógeno de cAMP pela linhagem mutante M03 de *P. griseoroseum* em relação à linhagem selvagem pode ter sido o motivo da amplificação do sinal de transdução via cAMP, culminando em uma produção mais efetiva de PL. O processo de repressão catabólica é dependente de uma via de transdução de sinal dependente do cAMP.

Deleções na região regulatória do gene *plg1* permitiram identificar um fragmento de 319 pb (Fragmento B), posicionado entre -503 e -184 em relação ao sítio +1 da tradução, como importante para a expressão do gene *plg1* em condição de indução por pectina. A indução da expressão do gene *plg1* por sacarose/extrato de levedura não depende dos mesmos cis-elementos envolvidos na indução por pectina. A funcionalidade de dois sítios de ligação consenso a proteína CreA, posicionados a -613 e -757, também foi determinada.

Estudos com mutações pontuais no fragmento de 319 pb poderão evidenciar um sítio essencial para indução da expressão do gene *plg1*, que poderá ser empregado como alternativa na

obtenção de uma linhagem superprodutora de PL para aplicação industrial, assim como para um possível sistema de expressão para produção de proteínas heterólogas em *P. griseoroseum*.

A inativação gênica dos dois genes que codificam PL em *P. griseoroseum* deve ser investigada para se determinar a contribuição função de cada um destes genes para a produção de PL e a correlação entre eles.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alaña, A.; Llama, M.J.; Serra, J.L. Purification and some properties of the pectin lyase from *Penicillium italicum*. **FEBS**, 280: 335-340, 1991.
- Albersheim, P. Pectin lyase from fungi. **Methods Enz.**, 8: 628-635, 1966.
- Albersheim, P.; Killias, U.B. Studies relating to the purification and properties of pectin transeliminase. **Arch. Biochem. Bioph.**, 97(1): 107-115, 1962.
- Allen, K.E.; McNally, M.T.; Lowendorf, H.S.; Slayman, C.W.; Free, S.J. Deoxyglucose-resistant mutants of *Neurospora crassa*: Isolation, mapping, and biochemical characterization. **J. Bacteriol.**, 171(1): 53-58, 1989.
- Aro, N.; Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Penttilä, M. ACEI is a repressor of cellulase and xylanase genes in *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 69: 56-65, 2002.
- Aro, N.; Pakula, T.; Penttilä, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol.**, 2005.
- Ballance, D.J.; Turner, G. Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. **Gene**, 36: 321-331, 1985.
- Baracat, M.C.; Valentim, C.; Muchovej, J.J.; Silva, D.O. Selection of pectinolytic fungi for degumming of natural fibers. **Biotechnol. Lett.**, 11(2): 899-902, 1989.
- Baracat-Pereira, M.C.; Coelho, J.L.C.; Minussi, R.C.; Chaves-Alves, V.M.; Brandão, R.L.; Silva, D.O. Cyclic AMP and low molecular weight effector(s) present in yeast extract are involved

- in pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 76: 129-141, 1999.
- Baracat-Pereira, M.C.; Coelho, J.L.C; Silva, D.O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose and yeast extract for degumming of natural fibers. **Lett. Appl. Microbiol.**, 18: 127-129, 1994.
- Baracat-Pereira, M.C.; Minussi, R.C.; Coelho, J.L.; Silva, D.O. Tea extract as an inexpensive induce of pectin lyase in *Penicillium griseoroseum* cultured on sucrose. **J. Ind. Microbiol.**, 18: 308-311, 1997.
- Bazzolli, D.M.D. Isolamento e caracterização parcial do gene que codifica pectina liase em *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, UFV. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 1999.
- Bazzolli, D.M.D. Organização e regulação de genes que codificam pectina liase em *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, UFV. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2003.
- Benen, J.; Parenicová, L.; Kusters-van, S.M.; Kester, H.; Visser, J. Molecular genetic and biochemical aspects of pectin degradation in *Aspergillus*. In: Visser, J., Voragen, A.G.J. (Ed). **Pectins and Pectinases**, 331-348, 1996.
- Benen, J.A.E.; Kester, H.C.M.; Parenicova, L.; Visser, J. Characterization of *Aspergillus niger* pectate lyase A. **Biochem.**, 39: 15563–15569, 2000.
- Bergamin, A.F.; Kimati, H.; Amorim, L. **Man. Fitopatol.** 3 ed., Agronômica Ceres, São Paulo, 919 p., 1995.
- Bhat, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, 18: 355-383, 2000.
- Blanco, P.; Sieria, C.; Villa, T.G. Production of pectic enzyme in yeasts. **FEMS Microbiol. Lett.**, 175: 1-9, 1999.

- Bradford, M.M. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72: 248-254, 1976.
- Brakhage, A.A.; Adrianopolous, A.; Kato, M.; Steidl, S.; Davis, M.A.; Tsukagoshi, N.; Hynes, M.J. HAP-like CCAAT-binding complexes in filamentous fungi: implications for biotechnology. **Fungal Genet. Biol.**, 27: 243-252, 1999.
- Brumano, M.H.N.; Coelho, J.L.C.; Araujo, E.F.; Silva, D.O. Production of pectin lyase by *Penicillium griseoroseum* as a function of the inoculum and culture conditions. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, 9: 225-228, 1993.
- Bussink, H.J.D.; Brower, K.B.; De Graaff, L.H.; Kester, H.C.M.; Visser, J. Identification and characterization of a second polygalacturonase gene of *Aspergillus niger*. **Curr. Genet.**, 20: 301-307, 1991.
- Calam, C.T. The evaluation of micelial growth. In: Norris, J.R.; Ribbons, D.W. (Ed.). **Methods Microbiol.** London; Academic Press, 1: 567-591, 1969.
- Cardoso, P.G. Isolamento e caracterização parcial de gene que codifica pectina liase em *Penicillium expansum*. Viçosa, UFV. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- Cardoso, P.G. Organização do gene de pectina liase em *Penicillium expansum* e obtenção de linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum* com alta produção de pectina liase. Viçosa, UFV. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- Cary, J.W.; Brown, R.; Cleveland, T.E.; Whitehead, M.; Dean, R.A. Cloning and characterization of a novel polygalacturonase-encoding gene from *Aspergillus parasiticus*. **Gene**, 153: 129-133, 1995.
- Chavez, R.; Schachter, K.; Navarro, C.; Peirano, A.; Aguirre, C.; Bull, P.; Eyzaguirre, J. Differences in expression of two endoxylanase genes (xynA and xynB) from *Penicillium purpurogenum*. **Gene**, 293: 161-168, 2002.

- Cubero, B.; Scazzocchio, C. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **EMBO J.**, 13: 407-415, 1994.
- D' Souza, C.A., Heitman, J. Conserved cAMP signaling cascades regulate fungal development and virulence. **FEMS Microbiol. Rev.**, 25: 349-364, 2001.
- De Vries, R.P.; Jansen, J.; Aguilar, G.; Parenicová, L.; Joosten, V.; Wülfert, F.; Benen, J.A.E.; Visser, J. Expression profiling of pectinolytic genes from *Aspergillus niger*. **FEBS**, 530: 41-47, 2002.
- De Vries, R.P.; Visser, J.; Graaff, L.H. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. **Res. Microbiol.**, 150: 281-285, 1999.
- Deeley, R.G.; Gordon, J.I.; Burns, A.T.H.; Binastein, M.; Golberg, R. F. Primary activation of the vitellogenin gene in the rooster. **J. Biol. Chem.**, 252: 8310-8319, 1977.
- Denison, S.H. pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Genet. Biol.**, 29: 61 -71, 2000.
- Doehlemann, G.; Molitor, F.; Hahn, M. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. **Fungal Genet. Biol.**, 2005.
- Fawole, O.B.; Odunfa, S.A. Some factors affecting production of pectic enzymes by *Aspergillus niger*. **Int. Biod. Biodeg.**, 52: 223 – 227, 2003.
- Felenbok, B.; Flipphi, M.; Nikolaev, I. Ethanol catabolism in *Aspergillus nidulans*: a model system for studying gene regulation. **Prog. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.**, 69: 149-204, 2001.
- Fernandes-Salomão, T.M., Amorim, A.C.R., Alves, V.M.C. Isolation of pectinase hyperproducing mutants of *Penicillium expansum*. **Rev. Microbiol.**, 27: 15-18, 1996.

- Firmino, A.A.P.; Ulhoa, C.J.; Sousa, M.V.; Ferreira Filho, E.X.; Ricart, C.A.O. Involvement of G proteins and cAMP in the production of chitinolytic enzyme by *Trichoderma harzianum*. **Braz. J. Biol.**, 33: 169-173, 2002.
- Flipphi, M.; Vondervoort, P.J.I.; Ruijter, G.J.G.; Visser, J.; Arst, H.N., Jr.; Felenbok, B. Onset of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. Parallel involvement of hexokinase and glucokinase in sugar signaling. **J. Biol. Chem.**, 278: 11849 - 11857, 2003.
- Fraissinet-Tachet, L.; Reymond-Cotton, P.; Fèvre, M. Characterization of a multigene family encoding an endopolygalacturonase in *Sclerotinia sclerotiorum*. **Curr. Genet.**, 29: 96-99, 1995.
- Gielkens, M.M.; Dekkers, E.; Visser, J.; de Graaff, L.H. Two cellobiohydrolase-encoding genes from *Aspergillus niger* require D D-xylose and the xylanolytic transcriptional activator XlnR for their expression. **Appl. Environ. Microbiol.**, 65: 4340-4345, 1999.
- Gysler, C.; Harmsen, J.A.M.; Kester, H.C.M.; Visser, J.; Heim, J. Isolation and structure of the pectin lyase D-encoding gene from *Aspergillus niger*. **Gene**, 89: 101-108, 1990.
- Hadj-Taieb, N.; Ayadi, M.; Trigui, S.; Bouabdallah, F.; Gargouri, A. Hyper production of pectinase activities by a fully constitutive mutant (CT1) of *Penicillium occitanis*. **Enz. Microbiol. Technol.**, 30: 662-666, 2002.
- Hakil, M.; Denis, S.; Viniegra-Gonzalez, G.; Augur, C. Degradation and product analysis of caffeine and related dimethylxanthines by filamentous fungi. **Enz. Microbiol. Technol.**, 22: 355–359, 1998.
- Hammerschmidt, R.; Lamport, D.T.A.; Muldon, E.R. Cell wall hydroxyproline enhancement and lignin deposition as an early event in the resistance of cucumber to *Cladosporium cucumerinum*. **Physiol. Plant. Pathol.**, 24: 43-47, 1984.
- Han, K.H.; Seo, J.A.; Yu, J.H. A putative G protein-coupled receptor negatively controls sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, 51: 1333–1345, 2004.

- Henrissat, B.; Heffron, S.E.; Yoder, M.D.; Lietzke, S.E.; Journak, F. Functional applications of structure – based sequence alignment of proteins in the extracellular pectate lyase superfamily. **Plant. Physiol.**, 107: 963-976, 1995.
- Herbert, C.; Jacquet, C.; Borel, C.; Esquerré-Tugayé, M.T.; Dumas, B. A *cis*-acting sequence homologous to the yeast filamentation and invasion response element (FRE) regulates expression of a pectinase gene from the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **JBC**, 237: 29125-29131, 2002.
- Hoondal, G.S.; Tiwari, R.P.; Tiwari, R.; Dahiya, N.; Beg, Q.K. Microbial alkaline pectinases and their applications: a review. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 59: 409–18, 2000.
- Ilmén, M.; Saloheimo, A.; Onnela, M.L.; Penttilä, M.E. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 63: 1298-1306, 1997.
- Jayani, R.S.; Saxena, S.; Gupta, R. Microbial pectinolytic enzymes: A review. **Proc. Biochem.**, 2005.
- Kashyap, D.R.; Vohra, P.K.; Chopra, S.; Tewari, R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. **Biores. Technol.**, 77: 215-277, 2001.
- Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Ohmiya, K., Tsukagoshi, N. A second pectin lyase gene (*pel2*) from *Aspergillus oryzae* KBN616: its sequence analysis and overexpression, and characterization of the gene products. **J. Biosc. Bioeng.**, 91: 378-381, 2001b.
- Kitamoto, N., Yoshino-Yasuda, S., Ohmiya, K., Tsukagoshi, N. Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (*pel1*) from *Aspergillus oryzae* KBN616. **Biosc. Biotechnol. Biochem.**, 65: 209-212, 2001a.
- Kusters-van Someren, M.; Flipphi, M.; De Graaf, L.H.; Van Den Broeck, H.C.; Kester, H.C.M.; Hinnen, A.; Visser, J. Characterization of the *Aspergillus niger pelB* gene: structure and regulation of expression. **Mol. Gen. Genet.**, 234: 113-120, 1992.

- Kusters-van Someren, M.; Harmsen, J.A.M.; Kester, H.C.M.; Visser, J. Structure of the *Aspergillus niger pelA* gene and its expression in *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans*. **Curr. Genet.**, 20: 293-299, 1991.
- Leone, G.; van den Heuvel; J. Regulation by carbohydrates of the sequential in vitro production of pectic enzymes by *Botrytis cinerea*. **Can. J. Bot.**, 65: 2133-2141, 1987.
- Lima, J.O.; Pereira, J.F.; Araújo, E.F.; Queiroz, M.V. Pectin lyase hyperproduction by deregulated mutants of *Penicillium griseoroseum*. XXXII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular I, Caxambu-MG, 2003.
- Lockington, R.A.; Kelly, J.M. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* involves deubiquitination. **Mol. Microbiol.**, 40: 1311 – 1321, 2001
- Lockington, R.A.; Kelly, J.M. The WD40-repeat protein CreC interacts with and stabilizes the deubiquitinating enzyme CreB in vivo in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, 43 (5): 1173 – 1182, 2002.
- Mach, R.L.; Strauss, J.; Zeilinger, S.; Schindler, M.; Kubicek, C.P. Carbon catabolite repression of xylanase I (*xyn1*) gene expression in *Trichoderma reesei*. **Mol. Microbiol.**, 21: 1273–1281, 1996.
- Maldonado, M.C.; Saad, A.M.S.; Callieri, D. Catabolic repression of synthesis of inducible polygalacturonases and pectinesterase by *Aspergillus niger* species. **Curr. Microbiol.**, 18: 303-306, 1989.
- Martinelli, S.D.; Kinghorn, J. R. ***Aspergillus: 50 years on***. ELSEVIER. 2 ed., Amsterdam, Netherlands; 29, 1997.
- Marui, J.; Tanaka, A.; Mimura, S.; Graaff, L.H.; Visser, J.; Kitamoto, N.; Kato, M.; Kobayashi, T.; Tsukagoshi, N. A transcriptional activator, AoXlnR, controls the expression of genes encoding xylanolytic enzymes in *Aspergillus oryzae*. **Fungal Genet. Biol.**, 35: 157-169, 2002.

- Minjares-Carranco, A.; Trejo-Aguilar, B.A.; Aguilar, G.; Viniegra-González, G. Physiological comparison between pectinase-producing mutants of *Aspergillus niger* adapted either to solid-state fermentation or submerged fermentation. **Enz. Microbiol. Technol.**, 21: 25-31. 1997.
- Minussi, R.C.; Coelho, J.L.C.; Baracat-Pereira, M.C.; Silva, D.O. Pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*: effect of tea extract, caffeine, yeast extract, and pectin. **Biotechnol. Lett.**, 18: 1283-1286, 1996.
- Minussi, R.C.; Soares-Ramos, J.R.L.; Coelho, J.L.C.; Silva, D.O. Sugar-cane juice induces pectin lyase and polygalacturonase in *Penicillium griseoroseum*. **Rev. Microbiol.**, 29: 246-250, 1998.
- O'Neil, J.D.; Bugno, M.; Stanley, M.S.; Barham-Morris, J.B.; Woodcock, N.A.; Clement, D.J.; Clipson, N.J.W.; Whitehead, M.P.; Fincham, D.A.; Hooley, P. Cloning of a novel gene encoding a C₂H₂ zinc finger protein that alleviates sensitivity to abiotic stresses in *Aspergillus nidulans*. **J. Mycol. Res.**, 106 (4): 491- 498, 2002.
- Panda, T.; Nair, S. R.; Kumar, P. Regulation of synthesis of the pectolytic of *Aspergillus niger*. **Enz. Microbiol. Technol.**, 2004.
- Peñalva, M.A.; Arst, H.N. Jr. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiol. Mol. Biol.**, 66 (3): 426-446, 2002.
- Pereira, J.F.; Queiroz, M.V.; Lopes, F.J.F.; Rocha, R.B.; Daboussi, M.J.; Araújo, E.F. Characterization, regulation, and phylogenetic analyses of the *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase gene and its use as selection marker for homologous transformation. **Can. J. Microbiol./Rev.**, 50(11): 891-900, 2004.
- Punt, P.J.; Dingemans, M.A.; Jacobs-Meijsing, R.I.M.; Pouwels, P.H.; Van Den Hond, L.C.A. M.J.I. Isolation and characterization of the glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. **Gene**, 69:49-57, 1988.

- Queiroz, M.V.; Barros, A.O.; Barros, E.G.; Guimarães, W.V.; Araújo, E.F. Transformation of *Penicillium griseoroseum* nitrate reductase mutant with the *nia* gene from *Fusarium oxysporum*. **Can. J. Microbiol.**, 44: 1-3, 1998.
- Reid, I.; Richard, M. Purified pectinase lowers cationic demand in peroxide-bleached mechanical pulp. **Enz. Microbiol. Technol.**, 34: 499–504, 2004.
- Revilla, I.; Ganzalez-san Jose, M.L. Addition of pectolytic enzymes: an enological practice which improves the chromaticity and stability of red wines. **Int. J. Food. Sci. Technol.**, 38: 29–36, 2003.
- Ribeiro, J.B. Isolamento e caracterização de genes que codificam poligalacturonase e transformação de *Penicillium expansum*. Viçosa, UFV. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribeiro, J.B. Produção de poligalacturonase por linhagens recombinantes de *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, UFV. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2005.
- Ribon, A.O.B. Organização e regulação de genes que codificam poligalacturonase em *Penicillium griseoroseum*. Viçosa, UFV. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- Ribon, A.O.B., Coelho, J. L. C., Barros, E. G., Araújo, E. F. Cloning and characterization of a gene encoding the endopolygalacturonase of *Penicillium griseoroseum*. **Biotechnol. Lett.**, 21: 395-399, 1999.
- Ribon, A.O.B., Queiroz, M.V., Araújo, E.F. Structural organization of polygalacturonase-encoding genes from *Penicillium griseoroseum*. **Genet. Mol. Biol.**, 25: 489-493, 2002.
- Rollins, J.A.; Dickman, M.B. pH signaling in *Sclerotinia sclerotiorum*: identification of a *pacC/RIM1* homolog. **Appl. Environ. Microbiol.**, 67(1): 75-81, 2001.

- Rombouts, F.M.; Pilnik, W. Pectic enzymes. In: **Econ. Microbiol.** Rose, A.H. (Ed.) London: Academic., 5: 227–282, 1980.
- Rubio, M.C.; Navarro, A.R. Regulation of invertase synthesis in *Aspergillus niger*. **Enz. Microbiol. Technol.**, 2005.
- Ruijter, G.J.G.; Visser, J. Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiol.**, 151: 103-114, 1997.
- Saloheimo, A.; Aro, N.; Ilmén, M.; Penttilä, M. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys₂His₂ transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. **J. Biol. Chem.**, 275: 5817-5825, 2000.
- Scazzocchio, C.; Gavrias, V.; Cubero, B.; Panozzo, C.; Mathieu, M.; Felenbok, B. Carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*: a review. **Can. J. Bot.**, 73: 5160-5166, 1995.
- Sevili, M.; Begliomini, A. L.; Montedoro, G.; Petruccioli, M.; Federici, F. Utilisation of a yeast pectinase in olive oil extraction and red wine making processes. **J. Sci. Food Agric.**, 58: 253-260, 1992.
- Shih, J.; Wei, Y.; Goodwin, P.H. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. **Gene**, 243: 139–150, 2000.
- Speacht, C.A.; Dirusso, C.C.; Novotny, C.P.; Ullrich, R.C. A method for extracting high molecular weight deoxyribonucleic acid from fungi. **Anal. Biochem.**, 119: 158-163, 1982.
- Takashima, S.; Iikura, H.; Nakamura, A.; Masaki, H.; Uozumi, T. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei* *cbh1* upstream region. **FEMS Microbiol.**, 145: 361-366, 1996.
- Templeton, M.D.; Sharrock, K.R.; Bowen, J.K.; Crowhurst, R.N.; Rikkerink, E.H. The pectin lyase – encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: Characterization of *pnlA* and its expression in yeast. **Gene**, 142: 141-146, 1994.

- Tilburn, J.; Sarkar, S.; Widdick, D.A.; Espeso, E.A.; Orejas, M.; Mungroo, J.; Peñalva, M.A.; Arst, H.N.Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO J.**, 14: 779-790, 1995.
- Todd, R.B.; Lockington, R.A.; Kelly, J.M. The *Aspergillus nidulans* creC gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein. **Mol. Gen. Genet.**, 263: 561 – 570, 2000.
- Vainstein, M.H.; Peberdy, J.F. Solubilisation of a cell wall bound invertase in *Aspergillus nidulans*. **FEMS Microbiol. Lett.**, 71 (3): 265-269, 1991.
- Van Alebeek, W.M.G-J.; Christensen, M. I. E. T.; Schols, A.H.; Mikkelsen, D. J.; Voragen, G. J. A. Mode of action of pectin lyase A of *Aspergillus niger* on differently C6-substituted oligogalacturonides. **J. Biol. Chem.**, 277 (29): 25929-25936, 2002.
- Van Peij, N.N.M.E.; Gielkens, M.M.C.; de Vries, R.P.; Visser, J.; Graaff, L.H. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol.**, 64: 3615 – 3619, 1998.
- Varavallo, M.A. ; Queiroz, M.V. ; Pereira, J. F. ; Araújo, E.F. Isolation and regeneration of *Penicillium brevicompactum* protoplasts. **Acta Scient.**, 26(4): 475-479, 2004.
- Vautard-Mey, G.; Cotton, P.; Fèvre, M. Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Eur. J. Biochem.**, 266: 252-259, 1999.
- Vitali, J.; Schick, B.; Kester, C.M.; Visser, J.; Jurnak, F. The three-dimensional structure of *Aspergillus niger* pectin lyase B at 1.7-Å⁰ resolution. **Plant. Physiol.**, 116: 69-80, 1998.
- Willats, W.G.T; Knox, J.P.; Mikkelsen, J.D. Pectin: new insights into an old polymer are starting to gel. **Trends Food Sci. Technol.**, 17 (3): 97-104, 2006.

- Wood, W.W.; Neubauer, D.G.; Stutzenberger, F.J. Cyclic AMP levels during induction and repression of cellulase biosynthesis in *Theromomonospora curvata*. **J. Bacteriol.**, 160: 1047-1054, 1984.
- Wubben, J.P.; Ten Have, A.; Van Kan, J.A.L.; Visser, J. Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH e carbon catabolite repression. **Curr. Genet.**, 37: 152-157, 2000.
- Yelton, M. M.; Hamer, J.E.; Timberlake, W.E. Transformation of *Aspergillus niger* by using a trpC plasmid. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, 81: 1470-1474, 1984.
- Zeilinger, S.; Schmoll, M.; Pail, M.; Mach, R.L.; Kubicek, C.P. Nucleosome transactions on the *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) cellulase promoter cbh2 associated with cellulase induction. **Mol. Genet. Genom.**, 270: 46-55, 2003.