**Regulação da expressão gênica por oxigênio em microrganismos
eucariotos: Análises de ESTs (*“Expressed Sequence Tags”*) e
“microarrays” de cDNA de *Trichoderma reesei*.**

ERIC D’ALESSANDRO BONACCORSI

Orientador: Prof. Dr. Hamza El-Dorri

Tese de doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica do
Instituto de Química da
Universidade de São Paulo.

SÃO PAULO

2003

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005390

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Bonaccorsi, Eric D'Alessandro

B697r Regulação da expressão gênica por oxigênio em microrganismos
eucariotos : análise de ESTs ("Expressed Sequence Tags") e
"microarrays" de cDNA de *Trichoderma reesei* / Eric D'Alessandro
Bonaccorsi. -- São Paulo, 2003.
105p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Bioquímica.

Orientador : Dorry, Hamza Fahmi Ali El

1. Expressão gênica 2. Regulação gênica 3. *Trichoderma* :
Micologia - I. T. II. Dorry, Hamza Fahmi Ali El, orientador.

574.88 CDD

“Regulação da expressão gênica por oxigênio em microrganismos eucariotos: análises de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) e “microrrays” de cDNA de Trichoderma reesei”

ERIC D’ALESSANDRO BONACCORSI

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado por:

Prof. Dr. HAMZA FAHMI ALI EL DORRY
IQ – USP
(Orientador e Presidente)

Prof. Dr. HUGO AGUIRRE ARMELIN
IQ – USP

Profa. Dra. ALICIA JULIANA KOWALTOWSKI
IQ – USP

Prof. Dr. ANTONIO ROSSI FILHO
FMRP - USP

Prof. Dr. ANDREAS KAROLY GOMBERT
EP - USP

SÃO PAULO
29 DE ABRIL 2003.

*Aos meus pais e à Luciana,
pelo amor e todo o apoio.*

AGRADECIMENTOS

Não foram poucos aqueles que, de uma forma ou de outra, colaboraram para a realização deste trabalho. Por isso é difícil citar a todos e não cometer nenhuma injustiça. Quero, então, expressar meus mais sinceros agradecimentos àqueles que sempre estiveram me apoiando, ajudando e contribuindo para que esta tese fosse concluída.

Agradeço, especialmente ao Prof. Dr. Hamza El-Dorry, não apenas por oferecer-me a infra-estrutura e orientação necessárias, mas também pela contribuição à minha formação ao longo de tantos anos.

Aos Drs. Andreas Karoly Gombert e Aldo Tonso, do Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola Politécnica-USP, agradeço pela valiosa colaboração na realização dos cultivos contínuos, análises de fluxos metabólicos, bem como pela amizade e paciência.

Ao Dr. Jens Nielsen, da Universidade Técnica da Dinamarca e todos aqueles do *Center for Process Biotechnology*, especialmente Vijayendran Raghevendran (Vijay), que me receberam em sua instituição e me ajudaram com a realização dos experimentos de marcação com ^{13}C , análises por GC-MS e estimativa de fluxos metabólicos.

Ao Dr. João Pedro Simon Farah e Cristina Sumié Matsumoto Sório pela inestimável contribuição para o tratamento matemático-estatístico da quantidade absurda de dados envolvidos nas análises de *microarrays*.

Aos colegas do laboratório, meus amigos Ari J. Scattone Ferreira, Dr. Augusto S. P. Ramos, Dr. Felipe S. Chambergó Alcalde, José Adriano Freitas, Marluce Mantovani, Wilton Rocha Lima e Zilda Mendonça. Para listar suas contribuições seriam necessárias muitas páginas.

E por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pelo financiamento deste trabalho.

Este trabalho foi financiado pela

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
Através dos processos
98/12120-9 (Bolsa de Doutorado) e
97/05267-0 (Projeto Temático)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS	ii
ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iii
RESUMO.....	v
SUMMARY	vi
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 – Mitocôndrias.....	6
2.1.1 – Origem e morfologia	6
2.1.2 – Características estruturais e genéticas	7
2.1.3 – Comunicação com o núcleo.....	8
2.2 – Efeitos de glicose e oxigênio	9
2.2.1 – Velocidade x rendimento – Implicações evolutivas nas vias de produção de ATP.....	10
2.2.2 – Respostas à disponibilidade de glicose.....	11
2.2.3 – Respostas aos níveis de oxigênio.....	15
2.3 – O modelo celular – <i>Trichoderma</i>	18
2.4 – Análise de fluxos metabólicos com ¹³ C.....	21
3 – OBJETIVOS	28
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 – Microrganismos	29
4.2 – Condições de cultivo	29
4.2.1 – Cultivos descontínuos.....	29
4.2.2 – Cultivos contínuos	30
4.3 – Soluções e meios de cultura.....	32
4.4 – Técnicas gerais de Biologia Molecular	32
4.5 – Determinação de fluxos metabólicos.....	33
4.6 – Preparação de mtDNA.....	34
4.7 – Preparação de bibliotecas de mtDNA.....	36
4.8 – Extração de plasmídios para sequenciamento	37
4.9 – Sequenciamento de DNA	38
4.9.1 – Genoma mitocondrial	38
4.9.2 – ESTs de <i>T. reesei</i>	39
4.10 – Anotação do genoma mitocondrial.....	40
4.11 – Análise da expressão gênica mitocondrial (efeito de glicose).....	40
4.12 – Produção e análise dos <i>microarrays</i> (efeito de oxigênio)	41
4.12.1 – Material para impressão e hibridização das lâminas	41
4.12.2 – Análises e validação dos resultados de <i>microarrays</i>	42
5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
5.1 – Genes mitocondriais e o efeito de glicose sobre sua expressão.....	44
5.1.1 – Genoma mitocondrial de <i>T. reesei</i>	44
5.1.2 – Efeito de glicose sobre a expressão de genes mitocondriais	51
5.2 – Análise de fluxos metabólicos.....	54

5.2.1 – Parâmetros de crescimento e marcação isotópica da biomassa	55
5.2.2 – Análise dos dados de marcação	58
5.2.3 – Fluxos metabólicos em diferentes concentrações de glicose	61
5.2.4 – Avaliação crítica dos resultados da AFM em <i>T. reesei</i>	65
5.3 – Efeitos de oxigênio sobre a expressão gênica de <i>T. reesei</i>	67
5.3.1 – Limitação de O ₂ em cultivo contínuo	67
5.3.2 – Análises preliminares dos <i>microarrays</i>	70
5.3.3 – Identificação de genes diferencialmente transcritos	74
5.3.4 – Genes do metabolismo primário de produção de energia	83
5.3.5 – Genes mitocondriais	86
5.3.6 – Genes não identificados	86
5.3.7 – Fatores de regulação da transcrição	87
6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	90
7 – BIBLIOGRAFIA	92
APÊNDICE	103
INFORMAÇÕES SOBRE O AUTOR	105

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	Pág.
Figura 1 – Vias de síntese de aminoácidos a partir de intermediários do metabolismo central de carboidratos.	24
Figura 2 – Isotopômeros de massa e posição.	25
Figura 3 – Comparação entre os perfis de expressão gênica de <i>T. reesei</i> e <i>S. cerevisiae</i> .	45
Figura 4 – Isolamento e caracterização do mtDNA de <i>T. reesei</i> .	46
Figura 5 – Representação da montagem computacional da sequência consenso do mtDNA de <i>T. reesei</i> .	47
Figura 6 – Mapa do genoma mitocondrial de <i>T. reesei</i> .	49
Figura 7 – Curva de consumo de glicose por <i>Trichoderma reesei</i> .	52
Figura 8 – Perfil de transcrição de genes mitocondriais de <i>T. reesei</i> em função da concentração de glicose.	53
Figura 9 – Visão geral dos processos envolvidos na análise de fluxos metabólicos com utilização de ^{13}C .	55
Figura 10 – Características de crescimento de <i>T. reesei</i> em cultivos descontínuos.	56
Figura 11 – Verificação do equilíbrio isotópico na biomassa de <i>T. reesei</i> cultivado em presença de $[1-^{13}\text{C}]$ glicose.	57
Figura 12 – Fluxos pelo metabolismo de produção de energia a partir de glicose em <i>Trichoderma reesei</i> .	64
Figura 13 – Cultivo contínuo de <i>T. reesei</i> em condição de limitação de oxigênio.	68
Figura 14 – Perfil de expressão de genes de <i>T. reesei</i> submetido à limitação de oxigênio.	72
Figura 15 – Validação de resultados de <i>microarrays</i> .	74
Figura 16 – Genes de <i>T. reesei</i> diferencialmente expressos sob condições limitantes de oxigênio.	76
Figura 17 – Expressão de genes do metabolismo primário de <i>T. reesei</i> em condição de hipóxia.	85
Figura 18 – Expressão de genes que codificam fatores e co-fatores de transcrição.	89

LISTA DE TABELAS

TABELA	Pág.
Tabela 1 – O genoma mitocondrial de <i>T. reesei</i> em números	48
Tabela 2 – Genes mitocondriais de <i>Trichoderma reesei</i>	49
Tabela 3 – tRNAs mitocondriais de <i>Trichoderma reesei</i>	50
Tabela 4 – Marcações (SFLs) medidas por GC-MS	60
Tabela 5 – Comparação de SFLs medidas e calculadas	62
Tabela 6 – Dados do ensaio de limitação de oxigênio	69
Tabela 7 – Genes de <i>T. reesei</i> induzidos pela limitação de oxigênio	78
Tabela 8 – Genes de <i>T. reesei</i> reprimidos pela limitação de oxigênio	80

ABREVIATURAS E SIGLAS

ACO	Aconitase
ACS	Acetil-CoA sintase
ADH	Álcool desidrogenase
AFM	Análise de fluxos metabólicos
ALD	Acetaldeído desidrogenase
AMP	Adenosina monofosfato
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
ATP (seguido por nº)	Subunidade da ATP sintase
cAMP	AMP cíclico
cDNA	DNA complementar
CIT	Citrato sintase
CoA	Coenzima A
COX	Citocromo <i>c</i> oxidase
CYTB	Citocromo <i>b</i>
DMFDMA	(N,N)-dimetilformamida dimetilacetal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECF	Etil cloroformato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGAD	The Expressed Gene Anatomy Database
ENO	Enolase
EST	Expressed Sequence Tag
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídio
FBA	Futose bisfosfato aldolase
FUM	Fumarase
GC-MS	Cromatografia gasosa – Espectrometria de massa
GPD	Glicerol-fosfato desidrogenase
GPM	Fosfoglicerato mutase
GPP	Glicose-fosfato fosfatase
GUT	Glicerol quinase
HOR	Glicerol-fosfato fosfatase
HPLC	Cromatografia líquida de alta pressão
HXX	Hexoquinase
IDH	Isocitrato desidrogenase
kb ou kpb	Kilo (pares de) bases
KDH	α -cetoglutarato desidrogenase
MDH	Malato desidrogenase
MS	Espectrometria de massa
mtDNA	DNA mitocondrial
NAD ou NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio (oxidada e reduzida)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ND (seguido por nº)	Subunidade da NADH-ubiquinona oxidoreductase
pb	Par(es) de bases
PCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDA	Piruvato desidrogenase
PDC	Piruvato descarboxilase

PFK	Fosfofruto quinase
PGK	Fosfoglicerato quinase
PYK	Piruvato quinase
RMN	Resonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
SDH	Succinato desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFL	Marcações fracionárias somadas
SGD	Saccharomyces Genome Database
SOM	Mapas auto-organizáveis
TAL	Transaldolase
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
TDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
TKL	Transcetolase
TPI	Triose fosfato isomerase
tRNA	RNA transportador
X	Concentração celular
YGR	Succinil-CoA sintetase
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em biomassa
ZWF	Glicose-6-fosfato desidrogenase

RESUMO

Glicose e oxigênio são moléculas essenciais para a maioria dos organismos vivos. Além de sua importância nos processos de produção de energia – glicose como fonte de carbono e energia e oxigênio como aceptor dos elétrons doados por NADH e FADH₂ – estes dois compostos funcionam como efetadores, modulando vários processos metabólicos e fisiológicos nas células.

Visto que a mitocôndria é um dos alvos afetados pelas disponibilidades destas duas moléculas, nós isolamos e sequenciamos o genoma mitocondrial de *Trichoderma reesei*, um fungo multicelular empregado neste trabalho como sistema modelo. Foi estudado o efeito da variação de concentração de glicose e oxigênio sobre a expressão de transcritos do genoma mitocondrial, bem como sua implicação no metabolismo de glicose.

São apresentadas análises da expressão gênica de aproximadamente 2000 transcritos de *T. reesei* submetido a concentrações limitantes de oxigênio dissolvido, realizadas com o emprego da técnica de *microarrays* de cDNA. Pelo menos 330 transcritos foram diferencialmente expressos em função da disponibilidade de oxigênio. Aqueles envolvidos nos processos de síntese protéica e divisão celular foram regulados negativamente, enquanto transcritos relacionados com funções de defesa celular e síntese de RNA foram positivamente regulados. Uma fração substancial de outros genes afetados pela baixa disponibilidade de oxigênio não possui, atualmente, funções celulares conhecidas. Esta observação deve contribuir para a posterior anotação funcional do genoma de *T. reesei*. Também foram identificados reguladores transcricionais diferencialmente expressos em baixas tensões de oxigênio. O perfil de expressão destes reguladores aponta-os como potenciais candidatos ao envolvimento com a expressão de genes afetados pela disponibilidade de oxigênio.

SUMMARY

Glucose and oxygen are essential molecules in most of living organisms. In addition to their importance in production of energy – glucose as a carbon and energy source and oxygen as an acceptor of electrons donated by NADH and FADH₂ – both molecules function as effectors modulating various metabolic and physiological processes in the cell.

Because one of the targets affected by both molecules is the mitochondrion, we isolated and sequenced the mitochondrial genome of *Trichoderma reesei*, a multicellular fungus that is used in this study as a model system. The effect of varying the concentration of glucose and oxygen on the expression of the transcripts of the mitochondrial genome, and its implication on the metabolism of glucose, was studied.

Gene-wide expression analyses of nearly 2000 transcripts of *T. reesei* under limited concentration of dissolved oxygen, using cDNA microarray technique, are presented. At least 330 transcripts were differentially expressed with respect to oxygen availability. Those involved in protein synthesis and cell division processes were down-regulated, while transcripts involved in cell defense and RNA synthesis were up-regulated. A substantive fraction of other anaerobically affected genes have currently unknown cellular roles, and these results should therefore contribute to further functional annotation of the genome. In addition, we have identified transcriptional regulators that are differentially expressed at a low oxygen tensions. The expression profile of these regulators points them out as potential candidates involved in the expression of genes affected by oxygen availability.

1 – INTRODUÇÃO

O ecossistema terrestre é habitado por uma enorme variedade de organismos que ocupam diferentes degraus na escala evolutiva. Estes organismos podem diferir muito entre si com relação a aspectos morfológicos, fisiológicos e metabólicos, entre outros. Tais diferenças resultam das pressões evolutivas sofridas pelas espécies ao longo do tempo e revelam adaptações a distintas condições ambientais e nutricionais.

Mesmo com inúmeras diferenças, organismos evolutivamente distantes entre si também apresentam semelhanças. Certas características foram preservadas durante o desenvolvimento das diferentes espécies por representarem vantagens evolutivas e conferirem adequação às condições de vida das mesmas. Do ponto de vista bioquímico, um bom exemplo é o metabolismo de glicose em eucariotos. Componente básico de diversos carboidratos, a glicose representa o monossacarídeo mais abundante na natureza e fonte preferencial de carbono e energia para quase todos os organismos (Johnston, 1999; Vaulont *et al.*, 2000).

Muito conservada entre as espécies, a rede metabólica responsável pela produção de energia a partir da glicose é composta pela via glicolítica (glicólise), vias alternativas do metabolismo de piruvato, ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA ou ciclo de Krebs) e cadeia respiratória (compreendendo transporte de elétrons e fosforilação oxidativa). Ainda que esta rede tenha sido preservada ao longo da evolução, diferenças nas redes regulatórias que dirigem o fluxo de glicose por suas vias foram geradas entre as espécies por pressões seletivas (Pfeiffer *et al.*, 2001). Assim, a produção de energia na forma de ATP pode ocorrer tanto através do metabolismo aeróbico (respiração) quanto do anaeróbico (fermentação), conforme o destino das moléculas de piruvato originadas na glicólise. Estas podem seguir para o metabolismo aeróbico ou anaeróbico dependendo do organismo, tecido ou do estado metabólico da célula.

As inúmeras combinações de condições ambientais e nutricionais existentes no planeta devem ter imposto, em diferentes espécies, seleção de qual tipo de metabolismo (aeróbico ou anaeróbico) representaria maior vantagem para a sua sobrevivência e desenvolvimento. Sob este aspecto, glicose e oxigênio são importantes fatores cujas disponibilidades no habitat natural de cada organismo devem ser consideradas. Visto que ambos participam de pontos chave no metabolismo (o primeiro como substrato de preferência e o segundo comoceptor final de elétrons na cadeia respiratória), desenvolveram-se nos organismos meios para detectar sua presença e abundância, para

captá-los e para ajustar seu metabolismo em função de sua oferta (Johnston, 1999; Calhoun *et al.*, 1993; Fitton *et al.*, 1994; Poyton, 1999; Dagsgaard *et al.*, 2001). Estes mecanismos envolvem, por exemplo, sensores e transportadores de membrana, vias de sinalização intracelular, de regulação da expressão gênica e de controle hormonal.

Alguns microrganismos unicelulares, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, podem fazer uso da fermentação ou da respiração, dependendo da concentração de glicose e da oferta de oxigênio (Ferea *et al.*, 1999). Na presença de altas concentrações de glicose, tanto em tensões de O₂ normais como reduzidas, esta levedura realiza fermentação ~~alcoólica~~, descarboxilando piruvato a acetaldeído e acumulando etanol a partir da ~~redução~~ deste último. Isto ocorre pelo efeito de repressão por glicose sobre os transcritos de enzimas do TCA, e inibição da respiração (v. seção 2.2.2). Contudo, quando a concentração de glicose é baixa, desde que na presença de oxigênio, este substrato é totalmente oxidado pelo metabolismo aeróbico através das reações do TCA, que nesta condição estão funcionantes (DeRisi *et al.*, 1997; Gombert *et al.*, 2001). Ainda, em contraste com organismos multicelulares, como fungos filamentosos que dependem exclusivamente do metabolismo aeróbico, *S. cerevisiae* quando submetida à ausência total de oxigênio é capaz de suprir sua demanda energética produzindo ATP através da fermentação alcoólica.

Outra levedura unicelular, *Kluyveromyces lactis* CBS2359, é capaz de realizar um metabolismo respiro-fermentativo em concentrações muito baixas de oxigênio, mas não é capaz de fermentar glicose a etanol sob aeração normal (Kiers *et al.*, 1998). Também microrganismos multicelulares e células de mamíferos metabolizam glicose preferencialmente através da respiração (Kelly *et al.*, 1990; Chambergo *et al.*, 2002). Em alguns casos, entretanto, quando a oferta de oxigênio não é suficiente para suprir a demanda por ATP através da velocidade e rendimento característicos da respiração (v. seção 2.2.1), glicose pode ser utilizada por meio do metabolismo anaeróbico, resultando na redução de piruvato a lactato. Isto é o que acontece, por exemplo, com células musculares em exercício ou com células de determinados tipos de tumor (Pedersen *et al.*, 1999; Mazurek *et al.*, 1997; Dang & Semenza, 1999; Ziegler *et al.*, 2001; Cuezva *et al.*, 2002).

No que se refere à utilização de glicose e oxigênio por eucariotos, cabe ressaltar a atuação fundamental das mitocôndrias, não apenas pelo fato de que nestas organelas ocorrem as reações características do metabolismo aeróbico (TCA, transporte de elétrons e síntese de ATP), mas também por sua inter-relação com o núcleo constituir

um potencial fator de regulação deste metabolismo. A atividade mitocondrial já foi relacionada ao controle da expressão gênica de diversos transcritos nucleares (Parikh *et al.*, 1987; Shyjan & Butow, 1993; Abrahão-Neto *et al.*, 1995; Poyton & McEwen, 1996). Em mamíferos, alterações funcionais nesta organela e principalmente mutações e deleções no genoma mitocondrial estão associados à doenças como neuropatias, miopatias e cardiopatias, freqüentemente combinadas, além de problemas em outros órgãos e câncer (Scheffler, 2001; Delsite *et al.*, 2002; Singh, 1998; Máximo & Sobrinho-Simões, 2000; Cuezva *et al.*, 2002; Polyak *et al.*, 1998).

É improvável que haja outro eucarioto unicelular melhor estudado do que a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Durante décadas, o emprego deste organismo como modelo celular tem levado à descoberta e compreensão de inúmeros processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares, com destaque para os efeitos de glicose e oxigênio. Muitos daqueles processos possuem mecanismos bem conservados entre as mais diferentes espécies. Entretanto, *S. cerevisiae* é dotada de características peculiares e versáteis em seu metabolismo, não encontradas comumente em outros eucariotos – incluindo aí a maioria das leveduras. Exemplo disto é a produção de etanol através do metabolismo anaeróbico, ainda que em presença de oxigênio (Breuning *et al.*, 2000).

Foi mencionado que organismos distintos compartilham redes metabólicas semelhantes e no entanto desenvolveram mecanismos regulatórios diferentes para controlá-las. Assim, o estudo de diferentes modelos celulares serve a uma maior compreensão do funcionamento, da evolução e até de desordens dos processos fisiológicos e bioquímicos que regem a vida de todas as espécies. Face ao que já foi exposto, parece claro que glicose e oxigênio exercem na levedura *S. cerevisiae* efeitos distintos dos observados em outros microrganismos e mamíferos. Deste ponto de vista, organismos multicelulares parecem ser modelos mais apropriados a estudos comparativos que buscam semelhanças entre redes regulatórias de eucariotos superiores, afetadas por concentrações de glicose e oxigênio.

Por isso, esta tese de doutorado aborda efeitos de glicose e oxigênio no metabolismo de organismos multicelulares, empregando o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* como modelo. Os fungos do gênero *Trichoderma* apresentam metabolismo estritamente aeróbico (v. seção 2.3). São habitantes comuns do solo, considerado como um ambiente nutricionalmente pobre (o que implica em concentração usual de glicose menor que 200 μ M) (Wainwright, 1993).

Microrganismos são utilizados há milênios com o intuito de produzir substâncias de interesse para o homem. Os melhores exemplos talvez estejam na vinicultura e panificação (Samuel, 1996). Além da relevância para a pesquisa científica, e da mesma forma que *S. cerevisiae*, *T. reesei* também agrega importância econômica e industrial, com diferentes aplicações sendo exploradas há mais de duas décadas (Samuels, 1996). O melhoramento genético, aperfeiçoado significativamente e continuamente nos últimos anos, principalmente pelo emprego das técnicas de DNA recombinante, vem ampliando o potencial de aplicação de microrganismos como “fábricas celulares”. Terminou por culminar no surgimento da chamada “Engenharia Metabólica” (Stephanopoulos *et al.*, 1998), por meio da qual, modificações bem definidas são introduzidas no metabolismo de organismos a fim de direcionar o fluxo de metabólitos para a produção de compostos antes não sintetizados ou para aumentar o rendimento de vias já funcionantes. Assim, não é difícil concluir que o profundo conhecimento do metabolismo celular e a compreensão do funcionamento de suas vias e redes regulatórias tornam-se pré-requisitos essenciais à execução da engenharia metabólica.

No que diz respeito a *T. reesei*, um importante passo já foi dado rumo à obtenção de tais pré-requisitos. Recentemente, através de análises de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) e *microarrays* de cDNA, o perfil transcricional de genes do metabolismo primário de glicose foi determinado neste fungo, em diferentes concentrações deste mesmo substrato (Chambergo *et al.*, 2002). Os resultados destas análises apontaram a regulação transcricional como fator determinante para a prevalência do metabolismo aeróbico apresentado por este organismo.

Os trabalhos apresentados nesta tese empregam metodologias recentes para investigar efeitos de diferentes condições metabólicas sobre a expressão gênica em *T. reesei*. A variação na disponibilidade de glicose e oxigênio sobre a expressão de transcritos do genoma mitocondrial foi estudada, tendo em vista que, por conterem as enzimas responsáveis pela respiração celular, as mitocôndrias ocupam um ponto-chave no metabolismo aeróbico, sendo afetadas tanto pelas concentrações de glicose como de oxigênio. Para este fim, o DNA mitocondrial (mtDNA) de *T. reesei* foi isolado e sua sequência nucleotídica determinada. Também foi empregada a técnica de *microarrays* de cDNA para analisar o perfil de expressão de quase 2000 transcritos do genoma deste fungo sob condições limitantes de disponibilidade de oxigênio.

Em adição, buscamos complementar um trabalho que também iniciamos com a análise transcricional realizada por meio de *microarrays* (Chambergo *et al.*, 2002): Por

meio de uma técnica de análise de fluxos metabólicos objetivamos uma visão mais abrangente dos efeitos da concentração de glicose sobre a expressão de genes envolvidos no metabolismo primário de produção de energia (glicólise, TCA, via das pentoses-fosfato). Este tipo de abordagem mostra o resultado final de um processo que envolve não apenas transcrição, mas também etapas subsequentes da expressão gênica como tradução, modificações pós-traducionais, estabilidade de RNAs mensageiros.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Mitocôndrias

Mitocôndrias são organelas subcelulares que desempenham um papel fundamental no metabolismo aeróbico dos eucariotos. Em seu interior é que ocorrem as reações características da respiração celular. Além disso, a relação desta organela com o núcleo tem se revelado um potencial fator de regulação deste tipo de metabolismo.

Em virtude de sua importância, cabe aqui dedicar um espaço para revisar aspectos destas pequenas “fábricas” produtoras de energia.

2.1.1 – Origem e morfologia

Características de organismos eucariotos, mitocôndrias são organelas responsáveis por uma série de funções celulares, incluindo-se a oxidação de várias fontes de energia pelo ciclo dos ácidos tricarboxílicos, transferência de elétrons pela cadeia respiratória, além de síntese de ATP, aminoácidos, lipídios e heme (Attardi & Schatz, 1988).

A teoria para o surgimento destas organelas é conhecida como “Hipótese Endossimbionte” (Margulis, 1981). Pesquisas realizadas nas últimas décadas têm contribuído de forma significativa para a consolidação desta teoria, pela qual uma relação simbiótica teria se iniciado quando uma bactéria com a habilidade singular de realizar metabolismo oxidativo foi internalizada (por endocitose) por uma célula protoeucariótica (nucleada) incapaz de realizar respiração aeróbica (Gray, 1992). No início desta relação, a bactéria simbionte teria mantido sua autonomia genética, mas com o tempo acabaria perdendo genes redundantes e transferindo a maior parte de seu material genético para o núcleo da célula hospedeira, mantendo apenas genes que codificam polipeptídeos essenciais para a produção aeróbica de ATP e com características hidrofóbicas que dificultariam o transporte pelo citoplasma e a importação para seu interior (Gray, 1993; Gray *et al.*, 1999).

Vem ganhando aceitação, a despeito desta teoria, uma nova visão segundo a qual a formação da célula eucariótica primitiva – da qual as demais teriam evoluído – envolveria a fusão de duas diferentes bactérias, uma arqueobactéria anaeróbica e outra proteobactéria respiro-competente (Gray *et al.*, 1999; Vellai & Vida, 1999).

A origem da palavra mitocôndria vem do grego *mito* (filamento) e *chondrion* (grânulo). Estas organelas variam muito quanto à forma, tamanho e número, que pode chegar a centenas de mitocôndrias dependendo do tipo de célula (i.e., da função celular) e das condições fisiológicas (Lehninger, 2000; Darnel et al., 1990). Observadas através de microscopia eletrônica, em geral são cilíndricas, com cerca de 0,5-1,0 μm de diâmetro e comprimento variável (1-10 μm). Em células vivas, por meio de diferentes técnicas de microscopia e fluorescência, mostram-se dinâmicas, passando por profundas mudanças em tamanho, forma e localização celular, além de apresentarem a capacidade de se dividir e se fundir umas às outras (Johnson *et al.*, 1980; Bereiter-Hahn & Voth, 1994). Com o crescimento celular as mitocôndrias aumentam em tamanho e número de maneira semelhante ao crescimento e à divisão bacteriana. Contudo, divisão e crescimento mitocondrial não estão acoplados à divisão nuclear (Lehninger, 2000; Darnel et al., 1990).

2.1.2 – Características estruturais e genéticas

Quatro componentes principais formam a estrutura de uma mitocôndria: membrana externa, membrana interna, espaço intermembranar e matriz (Tzagoloff, 1982).

De aparência lisa, a membrana externa envolve completamente a organela. Produz fosfolípedes através da ação de glicerol fosfato acil transferases, sintetiza ácidos graxos e possui vários sistemas de transporte de membrana.

A membrana interna apresenta uma série de dobramentos voltados para o interior da organela, denominados cristas. Ali se encontram enzimas da cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, enzimas envolvidas na oxidação de ácidos graxos além de proteínas transportadoras e da succinato desidrogenase (do TCA), entre outras. Em comparação à membrana externa, possui uma superfície muito maior, cuja área varia conforme o tipo celular ou tecido. Já que comporta as enzimas responsáveis pelo metabolismo respiratório, superfície e número de cristas geralmente estão relacionados ao nível de atividade metabólica celular (Tzagoloff, 1982). O arranjo espacial das membranas externa e interna delimita dois compartimentos: espaço intermembranar e matriz.

A matriz é um gel envolto pela membrana interna onde se encontra uma grande variedade de enzimas como as do complexo piruvato desidrogenase, do TCA, do ciclo

da uréia, da gliconeogênese e β -oxidação de ácidos graxos. Há também polimerases de DNA e de RNA, envolvidas na duplicação das organelas e na síntese de proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial (mtDNA), que também está contido na matriz e é encontrado em várias cópias (da ordem de até 10^3 - 10^4). Ribossomos, RNAs mensageiros e transportadores também estão presentes.

Dada à existência do grande número de cópias do genoma mitocondrial em cada organela e à grande incidência de mutações a que este genoma está sujeito, subpopulações de mtDNA (selvagem e mutantes) podem co-existir. A este fenômeno dá-se o nome de heteroplasmia (Tzagoloff, 1982).

Genes nucleares codificam a maioria das proteínas localizadas nas mitocôndrias. Estas são sintetizadas em ribossomos citoplasmáticos e devem ser importadas para dentro das organelas (Schatz, 1996). O endereçamento de proteínas mitocondriais é um assunto que desperta muito interesse nos pesquisadores (Hendrick *et al.*, 1989; Schatz, 1996 e 1998; Koehler *et al.*, 1999; Bauer *et al.*, 2000). Em geral, os polipeptídios sintetizados pelas mitocôndrias não são enzimas completas mas sim subunidades de complexos multiméricos envolvidos no transporte de elétrons ou síntese de ATP.

Certamente a descoberta de que mitocôndrias contêm seu próprio DNA foi um marco nas pesquisas sobre a organela (Nass & Nass, 1963). MtDNA de vários organismos já foi seqüenciado e todos mostraram codificar um conjunto similar de proteínas, rRNAs e tRNAs. O tamanho dos DNAs mitocondriais (em pares de bases) difere muito entre organismos, mas freqüentemente genomas mitocondriais constituem-se por um único cromossomo circular de DNA dupla fita. O genoma mitocondrial humano, com 16,5 kb, é um dos menores conhecidos e codifica 13 polipeptídios, 2 rRNAs e 22 tRNAs (Anderson *et al.*, 1981). Já o mtDNA de *S. cerevisiae* é cerca de cinco vezes maior que o humano e codifica muitos dos mesmos genes (de Zamaroczy & Bernardi, 1986).

2.1.3 – Comunicação com o núcleo

É fato bem estabelecido que o núcleo desempenha importante papel na biogênese e manutenção das mitocôndrias e na regulação da expressão do genoma mitocondrial (Attardi & Schatz, 1988; Tzagoloff & Myers, 1986; Grivell, 1989; Ulery *et al.*, 1994). Entretanto, a função das mitocôndrias na regulação da expressão gênica nuclear ainda não está totalmente definida. Há um bom tempo vários trabalhos têm demonstrado a capacidade destas organelas em se comunicar com o núcleo,

influenciando a expressão de genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais e não mitocondriais (Siemens *et al.*, 1980; Parikh *et al.*, 1987; Liao *et al.*, 1991; Liao & Butow, 1993; Abrahão-Neto *et al.*, 1995; Poyton & McEwen, 1996; Dagsgaard *et al.*, 2001; Delsite *et al.*, 2002; McCammon *et al.*, 2003). Estes trabalhos apontam para a importância do estado funcional da mitocôndria e da integridade do mtDNA na regulação desta via de comunicação entre organela e núcleo (Shyjan & Butow, 1993; Dagsgaard *et al.*, 2001).

Em *S. cerevisiae*, a repressão da respiração mitocondrial, induzida por drogas ou por limitação de oxigênio ou heme mostrou afetar a expressão nuclear de citocromo *c* (Siemens *et al.*, 1980; Forsburg & Guarente, 1989). Verificou-se também a elevação no nível de transcritos da isoforma peroxissomal da citrato sintase (sintetizada também na mitocôndria) por ação de drogas inibitórias e em mutantes respiratório-deficientes (Liao *et al.*, 1991). O emprego deste tipo de mutantes, apresentando desde deleções até completa ausência de mtDNA serviu para mostrar como o genoma mitocondrial pode influenciar a expressão gênica nuclear (Parikh *et al.*, 1987; Dagsgaard *et al.*, 2001).

O controle mitocondrial da expressão gênica nuclear também foi descrito em *T. reesei*, no qual a transcrição de genes de celulases se mostrou sensível ao estado funcional das mitocôndrias. Os transcritos daqueles genes são negativamente regulados por inibidores químicos da atividade mitocondrial, bem como pela limitação de oxigênio dissolvido no meio de cultura (Abrahão-Neto *et al.*, 1995).

Tanto em levedura como em células de mamíferos, evidências apontam o envolvimento de mitocôndrias no mecanismo sensor de oxigênio e na indução de alguns genes responsivos à hipóxia (Semenza, 1999).

2.2 – Efeitos de glicose e oxigênio

Já foi mencionada a importância de glicose e oxigênio no metabolismo no que se refere à localização destes compostos em pontos-chave da rede metabólica e como isto se reflete na necessidade que os organismos têm de possuir mecanismos eficientes para sentir a sua disponibilidade no meio extracelular e, em função disto, modular seu metabolismo. Estes mecanismos sensores e os efeitos regulatórios que eles desencadeiam são motivo de intensa pesquisa há décadas e muito do que já se sabe é devido aos estudos realizados com *S. cerevisiae*, principalmente no que diz respeito aos efeitos de glicose. Com relação aos mecanismos sensores de oxigênio e as regulações a

eles associadas sabe-se relativamente menos e sobre este assunto a maior parte dos estudos é realizada em células de mamíferos. Ainda assim alguns modelos já foram propostos para levedura e eucariotos superiores.

Via de regra, o que é descoberto em *S. cerevisiae* acaba contribuindo de forma significativa para a compreensão geral dos efeitos de glicose e oxigênio, visto que os mecanismos característicos desta levedura frequentemente encontram paralelos nas mais diferentes espécies, desde outros fungos e plantas até mamíferos. Contudo, é importante salientar que este é um microrganismo anaeróbico facultativo, e isto deve ser considerado quando se apontam diferenças dos efeitos de oxigênio existentes entre este e outros modelos celulares.

A seguir, serão abordados efeitos da disponibilidade de glicose e oxigênio sobre o metabolismo de organismos eucariotos, com ênfase nos mecanismos conhecidos de regulação da expressão gênica. Antes, porém, cabe ressaltar alguns aspectos do metabolismo de produção de energia, com relação à eficiência na produção de ATP.

2.2.1 – Velocidade x rendimento – Implicações evolutivas nas vias de produção de ATP

Através das vias aeróbica e anaeróbica as células podem produzir ATP com velocidades e rendimentos distintos. No catabolismo de qualquer substrato, parte da sua energia livre é conservada nas moléculas de ATP, enquanto outra parte é necessariamente consumida para “impulsionar” as reações envolvidas no processo. A maior utilização desta energia para realizar um processo resulta em maior velocidade de produção, porém, em menor rendimento de ATP. Reações que consomem menos da energia contida no substrato ocorrem com menor velocidade, mas o rendimento na produção de ATP é maior.

O metabolismo aeróbico gera cerca de 38 mols de ATP para cada mol de glicose consumida, enquanto o anaeróbico apresenta rendimento de 2 mols de ATP por mol de glicose. Conclui-se que no primeiro caso as velocidades de consumo de substrato e produção de ATP são menores que neste último (Stucki, 1980; Pfeiffer *et al.*, 2001).

Em recente publicação, Pfeiffer e colaboradores (2001) demonstram que o metabolismo fermentativo apresenta vantagem sobre o respiratório em situações nas quais a fonte de carbono seja abundante e a mesma seja disputada por mais de uma espécie, ou ainda, em condições em que o oxigênio seja limitante. Nestas situações, levam vantagem os organismos capazes de consumir mais rapidamente o substrato

disponível. Por outro lado, todos os competidores sofrem as consequências do rápido esgotamento do nutriente, limitando o potencial de crescimento de suas populações. Segundo os autores, a forma de se beneficiar do metabolismo respiratório é evitar a competição e promover a cooperação entre os consumidores de uma mesma fonte de nutriente – sejam eles da mesma espécie ou de espécies distintas. Assim, a utilização de vias que levam ao maior rendimento na produção de ATP pode se traduzir na geração de um maior número de descendentes. O metabolismo aeróbico nos eucariotos se desenvolveu com o surgimento das mitocôndrias (v. seção 2.1.1), depois que oxigênio se tornou mais abundante na atmosfera. Isto possibilitou maior rendimento na produção de ATP, inclusive, com a utilização de fontes de energia não fermentáveis, não exploradas previamente. É levantada, então, a hipótese de que o alto rendimento na produção ATP, proporcionado pela respiração, pode ter facilitado a transição evolucionária de organismos unicelulares para formas multicelulares indiferenciadas.

Em favor desta hipótese está a interessante observação de que fungos dimórficos como *Mucor racemosus*, que podem se desenvolver tanto na forma unicelular (levedura) como multicelular (micélio), apresentam metabolismo fermentativo quando na forma unicelular, mas respiram quando na forma multicelular (Inderlied *et al.*, 1978; Rogers *et al.*, 1974; Schulz *et al.*, 1974).

2.2.2 – Respostas à disponibilidade de glicose

A maioria dos microrganismos é capaz de utilizar diferentes fontes de carbono, mas a preferência é dada àquelas mais rápida e facilmente metabolizáveis em detrimento do consumo de outras fontes alternativas mais complexas. Uma forma de “gerenciar” esta prioridade consiste em reprimir a síntese de enzimas relacionadas ao catabolismo das fontes alternativas de carbono quando as preferenciais estão disponíveis. As vantagens por detrás deste controle encontram-se na utilização de fontes de carbono mais favoráveis (no aspecto energético) e na economia da energia que seria gasta com a síntese de outros sistemas catabólicos. A este tipo de controle dá-se a denominação “repressão catabólica por carbono” ou simplesmente “repressão catabólica”. Todavia, uma vez que a expressão implica o envolvimento de catabólitos no mecanismo de repressão, o que ainda não está totalmente esclarecido, alguns autores dão preferência ao termo “repressão por carbono” (Ronne, 1995; Gancedo, 1998; Carlson, 1999). Embora diferentes fontes de carbono produzam repressão, glicose é provavelmente a mais repressora e, em consequência, seus efeitos são os mais

estudados. Por esta razão também é muito empregada a expressão “repressão por glicose”. A repressão por glicose, então, é um caso específico do fenômeno geral de repressão por carbono (Ronne, 1995; Ruijter & Visser, 1997).

Em contraposição ao mecanismo de repressão por carbono, glicose facilita seu próprio metabolismo pela indução de genes nele envolvidos, como os que codificam enzimas glicolíticas e transportadores de glicose (DeRisi *et al.*, 1997; Muller *et al.*, 1995; Özcan & Johnston, 1995). Com relação à indução dos transportadores de glicose de *S. cerevisiae* (HXTs), por exemplo, o sinal é gerado por dois receptores de membrana, Snf3 e Rgt2 (de alta e baixa afinidade por glicose, respectivamente), similares aos próprios transportadores, mas sem a capacidade de realizar transporte (Özcan *et al.*, 1998). Estudos sobre estes receptores/sensores demonstraram que, ao contrário do que é proposto na repressão (ver adiante), o sinal para indução por glicose não depende do metabolismo deste substrato, mas de sua concentração (Özcan *et al.*, 1996). Postula-se que a ligação de glicose extracelular aos receptores provoca alterações conformacionais nos mesmos, desencadeando efeitos intracelulares (Johnston, 1999). Em contrapartida, um trabalho recente associa níveis de atividade da via glicolítica com a expressão de genes relacionados à regulação do ciclo celular, os quais são induzidos com o aumento do metabolismo de glicose (Newcomb *et al.*, 2003).

Os efeitos repressores de glicose se dão em diferentes níveis, porém o principal ocorre no nível transcricional (Gancedo, 1998). Em *S. cerevisiae*, transcritos de genes com diferentes funções celulares são reprimidos, como os envolvidos na respiração, TCA, gliconeogênese, além dos envolvidos no transporte e catabolismo de fontes alternativas de carbono (DeRisi *et al.*, 1997; Carlson, 1999).

Da principal via de repressão por glicose em *S. cerevisiae* participam várias proteínas (ou complexos) que interagem entre si para produzir os efeitos sobre a transcrição dos genes alvo. De acordo com o modelo atualmente aceito para esta via, o repressor Mig1 – uma proteína do tipo *zinc-finger* (Ostling *et al.*, 1996) – reconhece e se liga a uma sequência específica na região promotora de vários genes sujeitos à repressão por glicose e, recrutando Ssn6 (ou Cyc8) e Tup1, promove a repressão de sua transcrição (Johnston, 1999). Ao que parece, enquanto Mig1 responde pela ligação ao DNA, o bloqueio da transcrição é causado por Ssn6 e Tup1 (Treitel & Carlson, 1995). Snf1 (associada a seus reguladores Snf4, Sip1, Sip2 e Gal83) é outro elemento fundamental neste sistema, uma vez que o estado de ativação desta proteína-quinase parece determinar a localização celular de Mig1. Na ausência ou em baixas

concentrações de glicose, por meio de um mecanismo ainda não totalmente decifrado, Snf1 é ativada por fosforilação e esta, por sua vez, fosforila Mig1 causando sua inativação. Fosforilado, Mig1 libera seu sítio de ligação ao DNA e migra para o citoplasma, revertendo os efeitos da repressão por glicose. Em altas concentrações de glicose, Snf1 é desativada (defosforilada), resultando no rápido retorno de Mig1 para o núcleo e no restabelecimento dos efeitos repressores (DeVit *et al.*, 1997). Acredita-se que o complexo Glc7-Reg1 (proteína-fosfatase) seja responsável pela defosforilação de Mig1 e também pela inativação de Snf1 (Treitel *et al.*, 1998; Ludin *et al.*, 1998). Ainda não se conhece a natureza do sinal que regula a atividade de Snf1, mas especula-se que ela esteja associada aos níveis celulares de AMP (ou à relação AMP/ATP) que, por sua vez estão relacionados ao próprio metabolismo de glicose. Em baixas concentrações de glicose a ativação de Snf1 estaria relacionada aos níveis elevados de AMP, já em altas concentrações de glicose a depleção de AMP para formar ATP resultaria em inativação de Snf1 (Johnston, 1999; Wilson *et al.*, 1996). A possibilidade de que o sinal que desencadeia a repressão por glicose seja gerado durante o metabolismo deste mesmo substrato não descarta a hipótese de que glicose, ela mesma ou sua concentração, seja o sinal (Meijer *et al.*, 1998; Johnston, 1999).

Genes e transcritos com estruturas e funções similares às de Mig1 e Snf1 de *S. cerevisiae*, entre outros, já foram caracterizados em outras leveduras, fungos, plantas e mamíferos (Dowzer & Kelly, 1989; Strauss *et al.*, 1995; Takashima *et al.*, 1996). Embora os detalhes moleculares do mecanismo de repressão por glicose nas diferentes espécies, com suas semelhanças e diferenças, ainda estejam sendo desvendados, sabe-se que este mecanismo permaneceu muito conservado no curso da evolução.

Uma notável diferença, existente entre *S. cerevisiae* e a levedura *Kluyveromyces lactis* diz respeito à repressão da respiração. Ao contrário do que se verifica na primeira (DeRisi *et al.*, 1997), genes de componentes da cadeia respiratória de *K. lactis* não são reprimidos por glicose (Mulder *et al.*, 1995). Nesta levedura a respiração prevalece sobre a fermentação na presença de altas concentrações do carboidrato mas, longe de caracterizar uma exceção, isto parece ser típico de muitas leveduras (Breunig, *et al.*, 2000). O mesmo comportamento também foi observado em *T. reesei* (Chambergo *et al.*, 2002). Neste fungo, o equivalente de Mig1 é denominado Cre1 (Strauss *et al.*, 1995; Ilmén *et al.*, 1996; Takashima *et al.*, 1996), mas uma proteína (ou complexo) que exerça as funções de Snf1 ainda não foi caracterizada. Evidências recentes sugerem que a ativação de Cre1 ocorre pela ação de uma caseína-quinase II (serina/treonina quinase) e

não por uma proteína-quinase ativada por AMP (AMPK), como antes se imaginava (Cziferszky *et al.*, 2002). O complexo AMPK é um equivalente de Snf1, encontrado em mamíferos (Woods *et al.*, 1994; Hardie *et al.*, 1999). Ainda em *T. reesei*, foi verificado que, inversamente ao que se observa para Mig1, a fosforilação de Cre1 é essencial para a sua ligação ao DNA e os decorrentes efeitos da repressão por glicose (Cziferszky *et al.*, 2002). Apesar da mediação da repressão por Cre1 ser diferente da exercida por Mig1 – o que implica em diferenças fundamentais na(s) via(s) de sinalização da repressão por glicose –, outros dados indicam que os mecanismos de repressão, em si, ainda guardam muitas semelhanças entre *S. cerevisiae*, *T. reesei* e outros fungos (Cziferszky *et al.*, 2002).

Com o recente estabelecimento do banco de dados de ESTs de *T. reesei* e por meio da análise de *microarrays* de cDNA, demonstrou-se pela comparação entre os perfis transcricionais de genes do metabolismo primário de *T. reesei* e *S. cerevisiae* que, ao contrário desta levedura, o fungo apresenta metabolismo respiratório tanto em baixas como em altas concentrações de glicose (Chambergo *et al.*, 2002; DeRisi *et al.*, 1997). A comparação dos dados obtidos para *T. reesei* com o programa temporal de expressão gênica de *S. cerevisiae* submetida à passagem metabólica de fermentação para respiração, mostrou como diferença mais notável como os padrões de expressão dos transcritos do TCA podem determinar o destino de piruvato nos dois organismos. Se for considerado que o principal controle da expressão destes genes ocorre em nível transcricional, em *T. reesei* o piruvato será totalmente oxidado devido ao alto nível de expressão dos mRNAs do TCA quando a concentração de glicose é alta. Nas mesmas condições, *S. cerevisiae* converte piruvato a etanol como resultado da forte repressão dos genes do TCA (Chambergo *et al.*, 2002).

Em termos do mecanismo de repressão por glicose, pode-se especular que uma diferença entre os dois microrganismos esteja nas regiões promotoras de seus genes ortólogos*. É possível que durante a evolução *T. reesei* tenha perdido seqüências necessárias à ligação de Cre1. A análise de promotores dos genes que em *T. reesei* respondem de forma diferente à repressão por glicose (em comparação com *S. cerevisiae*) é objeto de pesquisas que já se encontram em andamento.

Análises de expressão gênica em larga escala, viabilizadas pela técnica de *microarrays* revelam tão somente os eventos que ocorrem no primeiro estágio do

* O termo ortólogo descreve genes em espécies diferentes, derivados de um antepassado comum. Genes ortólogos podem ou não ter a mesma função.

processo de expressão gênica e, neste sentido, a utilização de análises de fluxos metabólicos surge como forma de complementar a visão deste processo. As informações extraídas por meio da análise de fluxos mostram o resultado final da expressão gênica, considerando os passos posteriores à transcrição, como regulações co- e pós-traducionais, por exemplo. Este tipo de abordagem já foi empregado no estudo dos efeitos de glicose em *S. cerevisiae* (Gombert *et al.*, 2001) e neste trabalho é empregado para confirmação de dados do transcriptoma de *T. reesei*.

2.2.3 – Respostas aos níveis de oxigênio

A importância em se entender como as células “sentem” e respondem às concentrações de oxigênio cresceu com o surgimento de evidências da relação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com doenças degenerativas e envelhecimento (Ames *et al.*, 1993; Shigenaga *et al.*, 1994; Irani *et al.*, 1997). O oxigênio molecular (O₂) é um composto muito adequado ao papel que exerce no metabolismo de produção energética, uma vez que seu alto potencial de óxido-redução (potencial redox) garante grande conservação da energia contida em substratos reduzidos. Excetuando-se os organismos anaeróbios obrigatórios, os demais dependem de oxigênio para a produção de energia e reações biossintéticas e, ao mesmo tempo, devem se defender das ações danosas causadas por espécies reativas de oxigênio. Células, tecidos e organismos sentem quando oxigênio é limitante e respondem de forma adequada, sendo que a adaptação às alterações na concentração de oxigênio no ambiente depende de mudanças nos níveis de expressão de uma série de proteínas (Poyton, 1999).

S. cerevisiae é uma levedura anaeróbia facultativa; respira na presença de oxigênio mas é capaz de suprir suas necessidades energéticas através da fermentação quando em condições anaeróbicas. Cabe ressaltar que esta habilidade não depende exclusivamente da abundância de oxigênio, mas também do tipo de substrato disponível (se fermentável ou não) e de sua concentração (v. seção 2.2.2). Neste microrganismo, oxigênio afeta os níveis e, frequentemente, a atividade de inúmeras proteínas (Kwast *et al.*, 1998), dentre as quais estão componentes da cadeia respiratória e enzimas envolvidas na síntese de heme, esteróis, resposta ao stress oxidativo e fatores de iniciação de tradução. Os efeitos de oxigênio sobre as concentrações celulares de muitas destas proteínas são exercidos ao nível transcricional e os genes regulados por oxigênio são geralmente classificados como “genes aeróbicos” (transcritos na presença de oxigênio) e “genes hipóxicos” (cuja transcrição é favorecida por anóxia ou condições

microaerofilicas). São verificados, também, controles em nível traducional (em proteínas codificadas pelo DNA mitocondrial, por exemplo) e efeitos indiretos, como no caso da síntese de heme, para a qual O₂ é necessário (Poyton, 1999; Burke & Poyton, 1998; Bunn & Poyton, 1996).

Em mamíferos, a resposta a limitação de oxigênio vai desde alterações imediatas no metabolismo energético até a ativação de vias de controle da expressão gênica. No início da exposição a uma condição de hipóxia ou anóxia, ocorre uma rápida mudança no metabolismo, de aeróbico para anaeróbico, e supressão de reações que consomem energia (Hochachka, *et al.*, 1996). Após exposição prolongada a baixas tensões de oxigênio, outro conjunto de adaptações se inicia, envolvendo o aumento da ventilação pulmonar, da produção de eritrócitos, angiogênese, bem como alterações na expressão de genes envolvidos no transporte e metabolismo de glicose, entre outras (Bunn & Poyton, 1996; Hochachka, *et al.*, 1996; Ratcliffe *et al.*, 1998). Todas estas adaptações envolvem uma série de sensores de oxigênio dispostos na carótida, rins, fígado e na vasculatura pulmonar e de outros tecidos (Hochachka, *et al.*, 1998).

Com relação ao controle da expressão gênica mediada por oxigênio em *S. cerevisiae*, diferentes fatores de transcrição já foram identificados até o momento. Contudo, no que se refere particularmente àqueles envolvidos na regulação de determinados grupos de genes hipóxicos, os indícios apontam para a existência de uma complexa rede regulatória. Empregando *microarrays*, uma recente análise da expressão de genes hipóxicos de *S. cerevisiae* mostrou que estes representam quase 6% (~350 genes) de todo o genoma da levedura e que a grande maioria deles (dois terços) possivelmente é regulada por dois fatores de transcrição: Rox1, o mais bem estudado, e Upc2. Aproximadamente outros 450 genes são regulados negativamente em anóxia, o que significa que, ao todo, quase um sexto do genoma de *S. cerevisiae* é afetado pela disponibilidade de oxigênio (Kwast *et al.*, 2002).

Dos aspectos mais conhecidos desta regulação transcricional pode-se dizer que, de forma dependente da fonte de carbono e da presença de heme, os fatores de transcrição Hap1 (um homodímero) e o complexo tetramérico Hap2/3/4/5 ativam a expressão de genes aeróbicos em células cultivadas em aerobiose, mas não exercem nenhum efeito em anaerobiose (Kwast *et al.*, 1998). Também na dependência de heme, o fator HDS reprime genes aeróbicos na ausência de oxigênio, aliviando os efeitos repressores em condições de aerobiose (Poyton, 1999; Bunn & Poyton, 1996). Já o fator de transcrição Rox1 reprime a expressão de genes hipóxicos em células cultivadas sob

aeração normal (Kwast *et al.*, 1997 e 1998). Como *rox1* é um gene aeróbico ativado por Hap1 (portanto, reprimido em hipóxia), condições de anaerobiose possibilitam a expressão dos genes regulados pelo seu produto, Rox1p. Em mamíferos, os estudos sobre a regulação da expressão por oxigênio concentram-se sobre os genes hipóxicos. A indução mediada por hipóxia se dá pela ligação do fator de transcrição HIF-1 (de *hypoxia inducible factor*) às regiões flanqueadoras daqueles genes, mas aparentemente este não é o único fator envolvido (Bunn *et al.*, 1998; Poyton, 1999).

Com as informações disponíveis até o momento ainda é difícil comparar os mecanismos de transcrição regulados por oxigênio entre organismos tão distintos quanto leveduras e mamíferos. Já foram encontrados ortólogos funcionais em mamíferos para três subunidades de Hap2/3/4/5 (Sinha *et al.*, 1995), mas não para Hap1 ou Rox1. Também em levedura ainda não se conhece uma proteína com funções semelhantes a HIF-1. Em ambos os casos uma visão geral dos mecanismos envolvidos neste tipo de regulação ainda não pode ser traçada, mesmo porque não se sabe ao certo quantos fatores de transcrição podem estar envolvidos e nem se conhecem suas interações.

Também não existe ainda um consenso no que diz respeito aos mecanismos de percepção e sinalização da disponibilidade de oxigênio. Na busca de “sensores” surgiram indícios da existência de diferentes vias de sinalização e da participação de heme, da cadeia respiratória e espécies reativas de oxigênio (com envolvimento da citocromo *c* oxidase nestes dois últimos casos), bem como de alguma via de comunicação entre o genoma mitocondrial e o núcleo (Poyton, 1999; Dagsgaard *et al.*, 2001).

Em levedura, por exemplo, os resultados sugerem a atuação de heme por dois mecanismos: de acordo com o primeiro, uma vez que a concentração de oxigênio afeta a síntese de heme, os níveis deste composto seriam “o sinal”; pelo segundo mecanismo, heme, como grupo prostético de uma hemoproteína, sinalizaria a disponibilidade de oxigênio através de seu estado redox. Através do modelo proposto, o controle da expressão gênica em baixas concentrações de O₂ seria comandado pelos níveis de heme, enquanto nas concentrações mais elevadas, quando a disponibilidade de heme não é afetada, este controle seria ditado pelo seu estado redox (Poyton, 1999). O emprego de mutantes respiratório-deficientes e de inibidores da cadeia respiratória apontou a importância do transporte de elétrons e o envolvimento de citocromo *c* oxidase (uma hemoproteína) como o provável sensor de oxigênio, pelo menos para a indução de

alguns genes hipóxicos (Kwast *et al.*, 1999). Também em mamíferos existem evidências indiretas do envolvimento de heme e de uma hemoproteína na detecção de oxigênio (Bunn & Poyton, 1996). Proteínas candidatas seriam citocromo *b* NAD(P)H oxidase, que é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio e a própria citocromo *c* oxidase (Chandel *et al.*, 1998; Poyton, 1999).

A compreensão da Biologia em nível sistêmico vem merecendo crescente atenção. Tanto que um volume especial da revista *Science* foi recentemente dedicado à “Biologia de Sistemas” (volume 295, 2002). Sem desmerecer a importância de se identificar e caracterizar cada reação metabólica independentemente, tem aumentado a relevância da análise de redes metabólicas em conjunto, visando esclarecer como estas redes interagem entre si, bem como conceitos fundamentais de regulação de sistemas metabólicos. Tem contribuído para isto o acelerado desenvolvimento de poderosas ferramentas de investigação de genomas, proteomas e metabolomas. Seguindo esta tendência, o presente estudo da expressão gênica em larga escala, realizado com *T. reesei* submetido à transição de condições normais de aeração ao estado de hipóxia, é o primeiro visando uma análise mais abrangente dos efeitos das tensões de O₂ em um organismo multicelular.

2.3 – O modelo celular – *Trichoderma*

As espécies de fungos que compõem o gênero *Trichoderma* são muito versáteis quanto ao seu metabolismo. Apresentam necessidades nutricionais mínimas e caracterizam-se por um rápido crescimento e pela capacidade de produzir uma enorme gama de metabólitos secundários. Habitam o solo, além de material vegetal e madeira em decomposição. Em geral são organismos dominantes na microflora de solos de uma grande variedade de habitats, atribuindo-se o fato à sua diversa capacidade metabólica e à sua natureza competitiva, uma vez que possuem a habilidade de atacar outros fungos (Samuels, 1996).

Por terem se desenvolvido em um ambiente nutricionalmente pobre (Wainwright, 1993), adquiriram evolutivamente várias enzimas hidrolíticas que lhes conferem capacidade de obter glicose e outras fontes de energia a partir de polímeros freqüentemente encontrados no solo. Desta forma, estes microrganismos conseguem transformar uma variedade muito grande de materiais orgânicos tanto de origem natural quanto xenobiótica e são bem conhecidos pela hiper-produção de quitinases, celulasas e

hemicelulases, respectivamente envolvidas na lise de micélios de outros fungos (Haran *et al.*, 1996) e na hidrólise de celulose e outros polissacarídeos (Béguin & Aubert, 1994; Biely & Tenkanen, 1998).

Além destas, outras categorias de enzimas também são produzidas por *Trichoderma*, propriedade que tem conferido importância comercial, industrial e biotecnológica ao gênero. A aplicação destes fungos tem sido explorada em diferentes ramos da indústria: na área têxtil e de papel e celulose, enzimas celulolíticas são utilizadas para o tratamento e modificação de tecidos e fibras; na agroindústria e indústria alimentícia, *Trichoderma* e suas enzimas são empregados no melhoramento da composição nutricional de rações animais, aumento do rendimento da produção de óleos vegetais, em determinados estágios de produção de bebidas alcoólicas e sucos de frutas. Pelas suas características micoparasíticas, são utilizados também como agentes de controle biológico e indutores do crescimento vegetal (Samuels, 1996; Harman & Kubicek, 1998; Walsh *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1986; Altomare *et al.*, 1999).

Através das técnicas de Biologia Molecular, várias espécies têm sido convertidas em eficientes produtoras industriais de enzimas e, mais recentemente, genes de *Trichoderma* vêm sendo pesquisados para a ainda controversa geração de plantas transgênicas mais resistentes a fungos fitopatogênicos (Lorito *et al.*, 1998; Bolar *et al.*, 2000).

Isolada de barracas de algodão durante a Segunda Guerra Mundial, a espécie *Trichoderma reesei* é ímpar, pois é conhecida através de um único isolado: a cepa denominada QM6a (ATCC 13631) (Mandels & Reese, 1957). Este isolado ganhou reputação pela produção de celulasas em grandes quantidades e é o único precursor de várias cepas hiper-produtoras, exploradas industrialmente hoje em dia (Kuhls *et al.*, 1996; Mäntylä *et al.*, 1998).

Segundo o banco de dados taxonômicos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy>), *T. reesei* tem a seguinte classificação:

Nome da espécie: *Hypocrea jecorina* (sinônimo: *Trichoderma reesei* – anamorfo). Linhagem (abreviada): Eukaryota; Fungi; Ascomycota; Pezizomycotina; Sordariomycetes; Hypocreales; Hypocreaceae; *Hypocrea*.

Seu ciclo de vida é assexuado, com geração de esporos elipsóides (3,0-4,5 x 2,3-3,0 μ m) de coloração verde pálida. A germinação destes esporos dá origem a filamentos

ramificados denominados hifas, formadas por células dispostas em sequência e separadas por septos (Samuels, 1996; Gams & Bissett, 1998).

A forma de vida assexuada de um fungo é também chamada de anamórfica, enquanto a sexuada (que recombina-se por meiose) é denominada teleomórfica (Kuhls *et al.*, 1996). A primeira descrição taxonômica de *Trichoderma* data de 1794 e naquela época foram descritas quatro espécies, sem a percepção de que apenas os anamorfs estavam sendo descritos. Classificações taxonômicas são em grande parte fundamentadas em características morfológicas e, em geral, anamorfs e teleomorfos de uma mesma espécie apresentam características morfológicas diferentes. Assim, as duas formas de uma mesma espécie acabam recebendo nomes diferentes. Caso típico é o que ocorre com *T. reesei*, considerado como a forma anamórfica do fungo *Hypocrea jecorina* (teleomorfo), ambos representando a mesma espécie (Klein & Eveleigh, 1998; Kuhls *et al.*, 1996).

Celulases ou enzimas celulolíticas são denominações genéricas para designar mais de uma categoria de enzimas que atuam de forma sinérgica nas etapas de hidrólise de celulose (Henrissat *et al.*, 1985; Nidetzky *et al.*, 1993 e 1994). O sistema celulolítico que conferiu notoriedade ao gênero *Trichoderma* é composto por três diferentes categorias: Exoglucanases, ou celobiohidrolases (CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) retiram unidades de celobiose (dímero de glicose formado por ligação β -1,4) a partir das extremidades das cadeias do polissacarídeo. As endoglucanases (EG) (1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4) produzem quebras mais randômicas no interior de cadeias longas, gerando novas extremidades onde as CBHs podem atuar. Na etapa final da hidrólise atuam as β -glicosidases (EC 3.2.1.21), que dígerem celobiose e outros oligossacarídeos, liberando glicose (Béguin, 1990; Béguin & Albert, 1994). As diversas espécies do gênero *Trichoderma* têm sido utilizadas como modelo no estudo de diferentes fenômenos biológicos. *T. reesei*, em particular, se destacou no estudo do catabolismo de celulose e outros polissacarídeos. Seu sistema celulolítico é provavelmente um dos mais estudados em diversos aspectos, tais como o mecanismo de ação das celulases e a regulação da expressão de seus genes (El-Gogary *et al.*, 1989; Abrahão-Neto *et al.*, 1995; Henrique-Silva *et al.*, 1996; Carle-Urioste *et al.*, 1997; Ilmén *et al.*, 1997).

A cariotipagem molecular, realizada por meio de eletroforese de campo pulsado, já foi empregada para caracterização do genoma de diferentes espécies de *Trichoderma*.

Nas cepas QM6a e QM9414 de *T. reesei* verificou-se a presença de 6 a 7 cromossomos com tamanhos variando entre 2,8 e 6,9 Mb e estima-se que todo o genoma tenha cerca de 33 Mb (Mäntylä *et al.*, 1992; Herrera-Estrella *et al.*, 1993).

Até o início de 2002 o GenBank (banco de seqüências do NCBI) contava com apenas 109 seqüências de genes de *T. reesei*. Recentemente as pesquisas a respeito deste fungo ganharam uma contribuição que ao mesmo tempo se constitui numa ferramenta para futuros trabalhos. Foi criado um banco de dados público de ESTs (“*Expressed Sequence Tags*”) de *T. reesei* (<http://trichoderma.iq.usp.br>) contendo cerca de 1200 seqüências únicas de genes deste fungo (Chambergo *et al.*, 2002). Empregando estas seqüências e o uso de *microarrays* de DNA, foi analisado o perfil da expressão gênica de *T. reesei* durante o consumo de glicose e elucidado o programa temporal de expressão de genes envolvidos nas vias de seu metabolismo primário, nesta condição (Chambergo *et al.*, 2002) (seção 2.2.2). Para a realização dos trabalhos aqui apresentados, também foram utilizadas tais ferramentas. O número de ESTs no banco de dados foi aumentado para quase 2000 seqüências únicas e análises de *microarrays* foram utilizadas para estudar o perfil transcricional de genes de *T. reesei* sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio.

2.4 – Análise de fluxos metabólicos com ^{13}C

Pode-se definir Análise de Fluxos Metabólicos (AFM) como a quantificação dos fluxos no metabolismo de um determinado organismo, sob condições definidas, entendendo-se por fluxos, as velocidades de reações. Em verdade, fluxos metabólicos são parâmetros não mensuráveis, mas é possível quantificá-los por meio da combinação de medidas experimentais específicas e modelos matemáticos. O cálculo de fluxos pode ser realizado tanto por álgebra linear (que apresenta uma série de limitações) como por métodos mais sofisticados e informativos, como os algoritmos de otimização não-linear. O resultado é como uma “fotografia” do metabolismo, sem informações sobre a dinâmica do sistema. Desta forma, a realização deste tipo de análise ganha sentido na possibilidade de se comparar diferentes “fotografias”. Cada fotografia representa uma condição de cultivo para um determinado organismo, de modo que é possível comparar o mesmo organismo sob diferentes condições de cultivo ou diferentes mutantes de um organismo sob a mesma condição de cultivo. (Gombert, 2001; Gombert & Nielsen, 2003; Masum & Oppacher, 2001).

Os fundamentos da AFM surgiram no início dos anos 90 com a análise de fluxos metabólicos estequiométrica, ou linear (Varma & Palsson, 1994), que conta apenas com a estequiometria conhecida de uma dada rede de reações metabólicas. A única condição necessária é que o sistema biológico em estudo esteja em estado estacionário (equilíbrio), implicando que todos os metabólitos intracelulares apresentem concentrações constantes durante o tempo de realização do experimento, ou seja, que reações de formação de cada metabólito sejam balanceadas por reações de consumo. A condição de estado estacionário (ou pseudo-estacionário) pode ser satisfeita em cultivos contínuos (quimiostato) ou na fase de crescimento exponencial de cultivos descontínuos (batelada, ou “batch”), geralmente realizados em fermentadores (Wiechert, 2001; Gombert & Nielsen, 2003). Nesta condição, se alguns fluxos puderem ser medidos diretamente, como por exemplo as velocidades de consumo de substrato, de crescimento, de formação de produto(s) e/ou de produção de CO₂, pode ser possível calcular os fluxos a partir destas medidas e das relações estequiométricas descritas por um modelo metabólico (balanços de massa) (Wiechert, 2001; Gombert, 2001).

As limitações da AFM linear estão no fato de que reações bidirecionais (reversíveis) não podem ser resolvidas; não se podem distinguir vias paralelas que levam à formação de um produto a partir do mesmo substrato e ciclos metabólicos não acoplados a um fluxo mensurável não podem ser quantificados. Em adição, há a necessidade de que metabólitos energéticos como ATP, NAD(P)H, etc, também sejam balanceados, o que agrega um certo grau de incerteza aos cálculos (Wiechert, 2001).

A análise de fluxos metabólicos com ¹³C agrega o balanço de isótopos ao balanço de metabólitos da AFM linear e contorna suas limitações (Wiechert, 2001; Gombert & Nielsen, 2000; Christensen & Nielsen, 1999a). Seu ponto de partida é um experimento de marcação com ¹³C, no qual é utilizado um substrato marcado, como por exemplo a glicose marcada no carbono 1 ([1-¹³C]glicose). Com isso, os átomos marcados são distribuídos pela rede metabólica em função das atividades de cada uma de suas vias e, de acordo com o destino dos isótopos, os fluxos pelas diferentes vias nesta rede podem ser calculados. As marcações em alguns metabólitos intracelulares podem ser medidas por equipamentos de ressonância magnética nuclear (RMN) e de espectrometria de massa (MS).

Assim como na AFM linear, fluxos extracelulares como velocidades de consumo de substrato e de crescimento, também são informações necessárias para complementar as medidas de marcação isotópica. Entretanto, a relação entre fluxos metabólicos e as

marcações medidas é não-linear, de forma que não é possível calcular fluxos diretamente a partir de medidas experimentais, como no caso da AFM estequiométrica, mas são necessárias abordagens matemáticas muito mais elaboradas (Wiechert, 2002a).

Em um sistema celular no estado metabólico estacionário, o qual passa a ser alimentado com um substrato contendo os isótopos de ^{13}C , ocorrerá a distribuição dos mesmos por toda a rede metabólica, de forma que também é alcançado um estado isotópico estacionário em que as frações de moléculas diferencialmente marcadas em cada conjunto metabólico (proteínas, polissacarídeos, lipídios, etc.) se tornam constantes (Wiechert, 2002b). Nesta condição, a biomassa pode ser coletada e hidrolisada para a obtenção dos precursores dos referidos conjuntos metabólicos (aminoácidos e carboidratos, por exemplo) nos quais as medidas de marcação são realizadas. As marcações nestes compostos, por sua vez, refletem as marcações nas moléculas que os originaram, provenientes das vias metabólicas centrais de oxidação de glicose (glicólise, via das pentoses-fosfato e TCA), conforme esquematizado na Figura 1 (Zubay, 1988). Uma vez que se conheçam suas vias de síntese, é possível determinar a origem de cada átomo de carbono. Desta forma, a quantificação da marcação por ^{13}C em aminoácidos fornece medidas indiretas da abundância destes isótopos em seus respectivos precursores, e estas medidas refletem os fluxos metabólicos pelas vias em que eles trafegam.

Em suma, a tarefa fundamental da AFM com ^{13}C consiste em calcular fluxos metabólicos intracelulares a partir de medidas de fluxos extracelulares e de medidas de marcação isotópica intracelulares. Todavia, o procedimento computacional e matemático por detrás desta tarefa aparentemente simples consiste na etapa mais “misteriosa” para biólogos e bioquímicos matematicamente inexperientes. Tendo isto em mente, um matemático, especialista no assunto, publicou um artigo com o sugestivo título de “*A gentle introduction to ^{13}C metabolic flux analysis*” (Wiechert, 2002a) com o intuito de “lançar uma luz” sobre os métodos de avaliação de experimentos de marcação com carbono.

O emprego de substratos marcados, agregado a balanços de massa em torno de átomos de carbono individuais dos intermediários do metabolismo, permite que o destino dos átomos de ^{13}C no metabolismo seja rastreado. O conceito fundamental por detrás disto está na análise de *isotopômeros* dos metabólitos. Este termo vem da combinação das palavras isótopo e isômero e indica um dos diferentes estados de

Figura 1 – Vias de síntese de aminoácidos a partir de intermediários do metabolismo central de carboidratos. Setas contínuas indicam uma ou mais etapas da via (o número de etapas está indicado sobre as setas). Adaptado de Zubay (1988).

marcação em que se pode encontrar um determinado metabólito. Uma vez que uma molécula com n átomos de carbono pode ser marcada em cada uma das n posições, existem 2^n possíveis estados de marcação, ou seja, pode haver 2^n isotopômeros desta molécula (Malloy *et al.*, 1988). Em adição, há que se considerar a existência de isotopômeros de massa e de posição. Um isotopômero de massa aponta unicamente o número de átomos de ^{13}C presentes na molécula e não suas posições, havendo portanto apenas $n+1$ isotopômeros de massa para uma molécula com n átomos de carbono. Por outro lado, um isotopômero de posição é descrito por um dado número de átomos marcados em posições específicas na molécula, determinando seu padrão de marcação. Desta forma, a distribuição de isotopômeros de massa pode ser obtida a partir da distribuição de isotopômeros de posição (Christensen & Nielsen, 1999a). Como exemplo, tome uma molécula com 3 átomos de carbono, para a qual existem 8 isotopômeros de posição (2^3). De acordo com o número de átomos marcados, seja nenhum, um, dois ou três, esta molécula pode apresentar massa m_0 , m_1 , m_2 e m_3 , respectivamente, conforme ilustrado na Figura 2. Entretanto, esta informação não permite saber quais os carbonos que levam a marcação (veja por exemplo os casos de m_1 e m_2). A relação entre a distribuição de isotopômeros de massa e de posição em um sistema é calculada por meio de equações que levam em conta o número total de átomos de carbono na molécula, o número de carbonos marcados (isotopômeros de massa) e a abundância de cada isotopômero de posição (Christensen & Nielsen, 1999a).

Figura 2 - Isotopômeros de massa e posição. Estão representados os oito diferentes isotopômeros de posição e quatro de massa, possíveis para uma molécula com três átomos de carbono. Cada átomo de ^{13}C acrescenta uma unidade à massa molecular do composto. (Adaptado de Wiechert, 2002).

O estado de marcação alcançado por um sistema metabólico (célula) é descrito por meio de frações de isotopômeros de cada molécula marcada. Isto é, para um dado metabólito, as correspondentes frações representam porcentagens relativas a todas as possibilidades de marcação (que somam 1, ou 100%). O estado de marcação da célula é quantificado pelas distribuições de isotopômeros de todos os metabólitos. A identificação de isotopômeros e a quantificação das marcações são realizadas por meio de técnicas de ressonância magnética nuclear (RMN) e de espectrometria de massa (MS) (Szyperski, 1998). O emprego de técnicas de MS para a análise de redes metabólicas é mais comum em função da maior sensibilidade e facilidade de interpretação de resultados (Wiechert, 2001). A técnica designada por “GC-MS” acopla um cromatógrafo gasoso ao espectrômetro de massa. Na etapa cromatográfica os compostos da biomassa hidrolisada são separados e por meio da espectrometria de massa são medidas as marcações em alguns aminoácidos e carboidratos (Chistensen & Nielsen, 1999a). Com base no conhecimento das reações biossintéticas que levam à formação destes metabólitos, estas medidas são usadas para deduzir as marcações nos átomos de carbono de seus precursores.

Como já mencionado, os esqueletos de carbono dos aminoácidos são provenientes de intermediários das vias metabólicas centrais (glicólise, TCA e via das pentoses-fosfato) (v. Figura 1). Assim, conhecendo-se o padrão de marcação nos átomos de carbono dos aminoácidos resultantes da hidrólise da biomassa (medidas por GC-MS), é possível deduzir o padrão de marcação nos respectivos precursores.

A vantagem de se medir as marcações nos aminoácidos é que estes se encontram em grande proporção na biomassa e representam um conjunto de metabólitos mais constante. Já as concentrações de metabólitos precursores são geralmente muito pequenas, o que em adição à sua rápida renovação, torna muito difícil realizar medidas diretas na maioria dos casos (Gombert, 2001).

De posse dos dados de marcação, das medidas de alguns fluxos extracelulares e um modelo metabólico proposto, pode-se finalmente partir para a estimativa de fluxos metabólicos. Isto é feito através de um processo matemático iterativo, realizado por meio de programas especialmente desenvolvidos para a simulação de experimentos de marcação. Inicialmente, é assumida uma distribuição hipotética de fluxos pelas reações contidas no modelo metabólico e então é simulado um experimento de marcação com ^{13}C , com base nas frações de isotopômeros do substrato fornecido ($[1-^{13}\text{C}]$ glicose, por exemplo) e na distribuição hipotética de fluxos. Da distribuição de isotopômeros,

resultante da simulação, são computados os valores de marcação que seriam obtidos para os fluxos hipotéticos e a diferença entre estes valores e aqueles medidos experimentalmente (por GC-MS, por exemplo). De acordo com a discrepância calculada é realizada uma variação sistemática dos fluxos hipotéticos iniciais por meio de um algoritmo de otimização e uma nova simulação é realizada. Desta forma, o processo vai se repetindo até que os valores de marcação calculados sejam os mais próximos possíveis dos valores medidos. Se o modelo inicialmente proposto for adequado, os fluxos resultantes serão aqueles que melhor descrevem as atividades daquela rede metabólica na condição fisiológica estudada (Wiechert, 2001).

A análise de fluxos mostra o estado do metabolismo considerando o conjunto de todos os estágios envolvidos na expressão gênica, o que inclui transcrição, tradução, eventos pós-traducionais e aspectos regulatórios em todas as etapas. Assim, a combinação das informações geradas por meio desta técnica com as provenientes da análise transcricional proporciona uma visão ampla do processo, do começo ao fim.

Os experimentos envolvendo análises de fluxos metabólicos em *T. reesei*, apresentados neste trabalho, foram realizados por meio de colaborações estabelecidas com o *Center for Process Biotechnology*, da Universidade Técnica da Dinamarca (www.cpb.dtu.dk), liderado pelo Dr. Jens Nielsen e com os Drs. Andreas Karoly Gombert e Aldo Tonso, do Depto. de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP-SP (<http://leb.pqi.ep.usp.br>). Por razões discutidas adiante, os resultados obtidos têm ainda caráter preliminar. Contudo, eles mostram o potencial analítico da metodologia e apresentam grande consistência, principalmente ao serem confrontados com os dados das análises transcricionais, já previamente realizadas por nós em *T. reesei* (Chambergo, *et al.*, 2002).

3 – OBJETIVOS

O propósito deste trabalho foi estudar a influência que glicose e oxigênio, em diferentes concentrações, exercem sobre o metabolismo primário do fungo *Trichoderma reesei*. Para tanto, os seguintes objetivos foram propostos:

Determinar a sequência nucleotídica completa do genoma mitocondrial de *T. reesei*, sua estrutura e organização e, com estas informações, verificar os efeitos de glicose e oxigênio sobre a expressão de seus transcritos.

Descrever, através da análise de fluxos metabólicos, o destino dos átomos de carbono de glicose e visualizar o resultado final da expressão de genes envolvidos na oxidação deste substrato quando o mesmo é oferecido em baixas e altas concentrações.

Verificar, através da análise de *microarrays* de cDNA, qual o perfil transcricional de cerca de 2000 genes deste fungo em função de diferentes concentrações de oxigênio, focalizando especialmente aqueles envolvidos com seu metabolismo, mas visando também identificar outros genes afetados, como aqueles que potencialmente podem exercer funções regulatórias e atuar como sensores de oxigênio.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Microrganismos

Trichoderma reesei, cepa QM9414, obtida da American Type Culture Collection (ATCC - nº 26921).

Escherichia coli, cepa DH10B (GIBCO BRL), [F⁻ *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *deoR* *recA1* *endA1* *ara* Δ 139 D(*ara*, *leu*)7697 *galU* *galK1*⁻ *rpsL* *nupG*] – empregada para a transformação das bibliotecas de mtDNA, isolamento de clones e recuperação de plasmídios para seqüenciamento.

4.2 – Condições de cultivo

Para obtenção de esporos, *T. reesei* era cultivado por cerca de 7 dias a temperatura ambiente em meio PDA (*Potato Dextrose Agar* – Difco), em placas de Petri (10 cm de diâmetro) expostas à iluminação natural. Esporos eram coletados por ressuspensão em água deionizada, destilada, estéril, quantificados em hemocítômetro (placa de Neubauer) e utilizados para inóculo dos cultivos.

Cultivos em meio líquido foram realizados em frascos *erlenmeyer* e em fermentadores, em meio mínimo e em meio completo, cujas composições estão descritas na seção 4.3 (Soluções e meios de cultura). Conforme o propósito do cultivo, a fonte de carbono acrescentada ao meio era glicose ou glicerol, em concentrações que variavam de acordo com o experimento em execução. As concentrações de glicose no meio eram verificadas através de glicosímetros digitais portáteis (Advantage[®], Roche) e por medidas espectrofotométricas, através de um kit de determinação enzimática (SERA-PAK[®] Glucose, Bayer).

A temperatura era mantida em 28 °C e a agitação em 250 e 900 r.p.m., respectivamente, em cultivos realizados em incubadoras e fermentadores. Também em fermentadores, o pH era mantido em 6,0 pela adição de solução de NaOH, controlada por bomba peristáltica.

4.2.1 – Cultivos descontínuos

Para experimentos visando análises de fluxos metabólicos, os cultivos foram realizados em 200 mL de meio mínimo, em fermentador de 300 mL de capacidade. A

aeração era feita por uma agulha inserida no meio de cultura, com a injeção de ar comprimido filtrado, previamente borbulhado em solução de NaOH 2M para eliminação do CO₂ (visando assegurar que glicose seria a única fonte de carbono). Os inóculos foram realizados com esporos para a concentração final de $5 \cdot 10^6 \text{ mL}^{-1}$.

Em experimentos com substrato marcado foram utilizados 20 g/L (111 mM) iniciais de glicose, sendo 50% naturalmente marcada e 50% de [1-¹³C]glicose (Omicron Biochemicals Inc.). Ainda durante a fase exponencial de crescimento, todo o conteúdo do fermentador era coletado e filtrado a vácuo. A biomassa era lavada com água destilada, também sob vácuo, e em seguida armazenada a -80 °C.

Para a determinação de parâmetros de crescimento de *T. reesei*, como a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx.}}$) e o rendimento da biomassa em glicose ($Y_{X/S}$) nas condições experimentais utilizadas, os cultivos foram realizados de forma similar à descrita anteriormente, porém, em volume de 4 L de meio contendo substrato não marcado (equivalente ao termo “glicose naturalmente marcada”, uma vez que a ocorrência natural de ¹³C é de 1,1 %, o que deve ser considerado nos cálculos). Os parâmetros de crescimento, característicos do microrganismo para a condição de cultivo, são calculados com base em medidas de concentração celular (X), realizadas pela determinação da massa seca. Se realizadas em cultivos de pequeno volume estas medidas podem fornecer resultados imprecisos.

4.2.2 – Cultivos contínuos

Se a finalidade do cultivo fosse a análise de fluxos metabólicos, este era realizado em fermentador de 300 mL. Com a finalidade de estudar os efeitos de oxigênio sobre a expressão gênica os cultivos foram conduzidos em reatores de 2 L (New Brunswick – Bioflo), equipado com dois eletrodos de O₂ (Mettler Toledo), analisador de gases (CO₂ e O₂) e fluxômetros de massa (controlando as vazões de entrada de ar comprimido e N₂). Em ambos os casos o cultivo era iniciado como cultivo descontínuo e, ao final da fase exponencial de crescimento a dorna passava a ser alimentada com meio fresco a uma taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Por meio de bombas peristálticas eram realizadas a adição de meio fresco e a remoção simultânea do volume excedente do interior da dorna. No caso do fermentador de 2 L, o posicionamento de um tubo de saída (dreno) em nível apropriado garantia a manutenção do volume constante. Já o fermentador de 300 mL foi montado sobre uma balança acoplada a um computador

que, em função da variação positiva de massa, acionava a bomba de drenagem, controlando o volume interno.

Cultivos para a determinação de fluxos metabólicos:

As condições de inóculo e cultivo foram essencialmente as mesmas descritas no item anterior (seção 4.2.1). Contudo, o inóculo era realizado em meio contendo 3 g/L de glicose não marcada (fase de cultivo descontínuo) e no acionamento do cultivo contínuo o reator era alimentado por cerca de 5 tempos de residência* com meio contendo 2g/L (11,1 mM) de glicose não marcada, para que o fungo atingisse o estado estacionário fisiológico. Esta condição era verificada pela concentração celular, determinada por medidas de massa seca. Então, o frasco de alimentação era substituído por outro contendo meio com a mesma formulação, porém, com [1-¹³C]glicose. Mais 5 tempos de residência eram aguardados para que fosse alcançada a condição de estado estacionário isotópico, o que foi posteriormente confirmado por medidas de incorporação de ¹³C na composição da biomassa ao longo do cultivo (v. Figura 11). Durante o cultivo, amostras para determinação de massa seca, concentração de glicose, e medidas de marcação por ¹³C foram tomadas através da saída do dreno em tubos colocados em gelo. Alcançadas as condições estacionárias (fisiológica e isotópica), todo o conteúdo do fermentador era coletado e armazenado conforme descrito anteriormente (seção 4.2.1).

Cultivos para estudo dos efeitos de oxigênio sobre a expressão gênica:

Foi utilizado meio completo, suplementado com 1,0 g/L de extrato de levedura (AMRESCO) e 100 mM de glicose. Depois de alcançado o estado estacionário fisiológico em aeração plena, em intervalos de 1h o suprimento de O₂ foi gradativamente diminuído até a condição de anaerobiose e, em seguida foi retomada a condição inicial de suprimento de ar (v. Figura 13). Antes de cada alteração na concentração de O₂, ou entre uma condição e outra, alíquotas da cultura foram coletadas, filtradas e imediatamente congeladas em N₂ líquido para posterior extração de RNA.

* Tempo de residência é definido como o tempo necessário para alimentar a dorna com um volume de trabalho. Para uma taxa de diluição $d = 0,1 \text{ h}^{-1}$, um tempo de residência é igual a 10 horas.

4.3 – Soluções e meios de cultura

Meio mínimo (composição por litro): KH_2PO_4 , 15 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,6 g; solução de metais, 1 mL; CaCl_2 , 0,6 g (adicionado ao meio já autoclavado e resfriado à temperatura ambiente, a partir de uma solução estoque); pH 6,0.

Meio completo (composição por litro): KH_2PO_4 , 0,1 mol; K_2HPO_4 , 0,1 mol; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,1 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3 g; Tween 80, 2 mL; Proteose peptona 2 g; uréia, 0,3 g; solução de metais, 1 mL; CaCl_2 , 0,3 g (adicionado ao meio já autoclavado e resfriado à temperatura ambiente, a partir de uma solução estoque); pH 6,0.

Solução de metais (em porcentagem): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,16; ZnSO_4 , 0,14 e CoCl_2 , 0,2, dissolvidos em HCl 28 mM.

Tampão de ressuspensão: sacarose, 350 mM; EDTA pH 8,0, 50,0 mM; Tris-HCl pH 7,4, 10,0 mM; proteinase K, 20 $\mu\text{g/mL}$ adicionados no momento do uso.

Tampão de lise: NaCl, 150 mM; EDTA pH 8,0, 50,0 mM; Tris-HCl pH 7,4, 10,0 mM; proteinase K, 20 $\mu\text{g/mL}$ adicionados no momento do uso.

TE: Tris-HCl pH 7,5, 10 mM; EDTA pH 8,0, 1 mM.

STET-MW: 5 mL de Tween 20; 2 mL de NaCl 5M; 1,6 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0; 200 μL de EDTA 0,5 M pH 8,0; água deionizada suficiente para 100 mL. Filtrar em membrana de 0,22 μm e, imediatamente antes de usar, adicionar: 24 μL de RNase a 10 mg/mL e 0,5 mg de lisozima.

LB (composição por litro): triptona (ou peptona), 10 g; extrato de levedura, 5 g; NaCl, 10 g. Para preparação de LB-Agar, adicionar 15 g/L de Agar.

4.4 – Técnicas gerais de Biologia Molecular

Procedimentos e técnicas comumente utilizados na extração, manipulação e modificação de ácidos nucleicos foram realizados segundo descrito em Sambrook *et al.* (1989), Ausubel *et al.* (1992) ou, ainda, de acordo com protocolos específicos fornecidos com produtos, equipamentos e kits utilizados.

4.5 – Determinação de fluxos metabólicos

As amostras de micélio de *T. reesei*, cultivado na presença de [1-¹³C]glicose (seções 4.2.1 e 4.2.2), foram tratadas de acordo com a metodologia descrita por Thykaer *et al.* (2002), com modificações. Em síntese, o procedimento consiste na hidrólise da biomassa, derivação química dos aminoácidos e glicose em compostos mais voláteis e injeção no equipamento de GC-MS.

Cerca de 20 mg de biomassa foram hidrolisados em 1 mL de HCl 6M a 105 °C (30 min. para a posterior derivação de glicose e 16 a 24 horas para a derivação de aminoácidos). Os hidrolisados foram filtrados em membrana de 0,45 µm, divididos em alíquotas de 200 µL e liofilizados.

Na derivação de aminoácidos com etil-cloro formato (ECF), o hidrolisado seco era dissolvido em 200 µL de HCl 20 mM e 133 µL de piridina:etanol (1:4) antes da adição de 40 µL de ECF. Os derivados, extraídos para 350 µL de diclorometano por mistura e separação de fases, foram transferidos para tubos de GC-MS. Na derivação com (N,N)-dimetilformamida dimetil acetal (DMFDMA) o hidrolisado era dissolvido em 50 µL de metanol e 100 µL de acetonitrila, com posterior adição de 300 µL de DMFDMA. Após centrifugação o sobrenadante era transferido para tubos de GC-MS. O derivado de glicose (glicose penta-acetato) era obtido por dissolução do hidrolisado em 10 µL de água, 100 µL de anidrido acético e 10 µL de cloreto de acetila. A mistura de reação era transferida para tubos de GC-MS e deixada à temperatura ambiente por 3 horas antes da injeção no aparelho.

As amostras resultantes dos tratamentos anteriores foram analisadas em aparelho de GC-MS, modelo HP-G1723A (Hewlett-Packard), nas mesmas condições descritas por Christensen & Nielsen (1999a). No espectrômetro de massa os derivados, previamente separados pela cromatografia gasosa, eram ionizados, fragmentados e a distribuição de massa dos fragmentos era medida. As intensidades dos picos medidos no espectro de massa eram corrigidas e função da marcação natural por ¹³C nos átomos agregados no processo de derivação e, então, eram calculadas as marcações nos metabólitos intracelulares (aminoácidos e glicose), denominadas SFLs (sigla, em inglês, para o termo “marcações fracionárias somadas”). A partir das marcações nestes metabólitos e com base no conhecimento de suas vias de síntese, eram calculadas as marcações em seus precursores, intermediários das vias metabólicas centrais (glicólise, TCA e via das pentoses-fosfato). Todos os cálculos foram realizados em Excel

(Microsoft®), pela entrada dos dados extraídos do GC-MS em planilhas de cálculo pré-montadas. A teoria matemática envolvida pode ser encontrada na literatura (correções das marcações descritas por: Lee *et al.*, 1991; 1992; Wittmann & Heinzle, 1999; cálculos das marcações: Pedersen *et al.*, 2000).

Os cálculos de fluxos foram realizados por programas desenvolvidos na Universidade Técnica da Dinamarca (DTU) (Christensen e Nielsen 1999a e 1999b), baseados em MATLAB® (The Mathworks, Inc.). Os softwares devem ser alimentados com uma série de dados, como velocidade de consumo de glicose, velocidade específica de crescimento do microrganismo (μ), rendimento da biomassa em glicose ($Y_{X/S}$), composição da biomassa, valores das marcações medidas (SFLs), e um modelo metabólico. Este último consiste no conjunto de reações metabólicas cujos fluxos serão calculados. Parâmetros de crescimento (μ , $Y_{X/S}$) e consumo de substrato foram obtidos diretamente de medidas realizadas durante os cultivos. Assumindo que a composição da biomassa é função exclusiva de μ , e considerando a proximidade entre as espécies, os dados para *T. reesei* foram baseados em interpolações de resultados obtidos para *Penicillium chrysogenum* (Henriksen *et al.*, 1996), considerado os valores de μ calculados para *T. reesei*.

Diferentes modelos podem ser experimentados durante a realização dos cálculos, conforme a necessidade, visando um melhor ajuste matemático aos fluxos calculados. Assim, respeitando bioquímica e fisiologia do microrganismo, o modelo final é obtido após várias tentativas e representa aquele que resulta em menor erro nos cálculos. No caso de *T. reesei*, tanto para cultivos descontínuos como contínuos, foi utilizado o mesmo modelo, o qual é apresentado no Apêndice. As bases matemáticas envolvidas nos cálculos de fluxos metabólicos são descritas por Christensen & Nielsen (1999a; 1999b; 2000).

4.6 – Preparação de mtDNA

Foi empregado o método descrito por Garber & Yoder (1983), com algumas modificações. Esporos foram inoculados em 2,2 L de meio completo contendo 10 % de glicerol como fonte de carbono e cultivados sob agitação constante, distribuídos em 6 *erlenmeyers* de 1 L de capacidade. O micélio foi recolhido por filtração a vácuo em papel de filtro qualitativo (FISHERbrand - Fisher Scientific Company), pesado e congelado em nitrogênio líquido. Cerca de 90 g do filtrado foram triturados em gral de

porcelana, com constante adição de nitrogênio líquido. O macerado congelado foi adicionado, aos poucos, a 3 volumes de tampão de ressuspensão gelado e agitado por 15 min. em banho de gelo. A suspensão foi centrifugada a 3.500 r.p.m. e 4 °C durante 10 min. em rotor Sorvall SS-34. O sobrenadante foi coletado através de um funil com gaze e centrifugado a 30.000 r.p.m. e 4 °C durante 30 min. em rotor de ângulo fixo (Hitachi P50A2, equivalente ao Beckman Ti50.2). Os precipitados gelatinosos foram recuperados e combinados por ressuspensão em um volume total de 2,5 mL de tampão de lise gelado.

Então a suspensão foi processada em um homogeneizador e ao volume final (3,0 mL) foram adicionados 2 % (m/v) de SDS. A mistura foi incubada por 40 min. a 65 °C com agitação branda constante e depois transferida para gelo por 10 min. Em seguida, foi centrifugada a 7.000 r.p.m. e 4 °C em rotor Sorvall SS-34, também por 10 min. A extração de proteínas foi realizada por mistura com igual volume de fenol saturado com Tris 10 mM, pH 8,0 (Sigma), seguida por centrifugação a 3.000 r.p.m. a temperatura ambiente por 3 min. em rotor do tipo *swing* e coleta da fase aquosa (superior). O procedimento de extração foi repetido até que a interface ficasse clara depois da centrifugação. Então, a fase aquosa foi extraída duas vezes com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma) e uma vez com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) (Merk).

À solução contendo DNA total de *T. reesei* foi adicionado CsCl (Sigma) para a concentração final de 0,8 g/mL. Após transferência para tubo de 5,2 mL do tipo *quick-seal*, o volume foi completado com TE contendo 0,8 g/mL de CsCl e acrescentou-se solução estoque (10 mg/mL) de bisbenzimidazol (Hoechst 333258) para a concentração final de 120 µg/mL. O tubo foi centrifugado a 50.000 r.p.m. e 15 °C durante 18 h em rotor vertical Hitachi P65VT2 (equivalente ao Beckman VTi65). Sob luz UV foi possível verificar a separação de 2 bandas de DNA (v. Figura 4), coletadas separadamente com o auxílio de seringas. Para uma separação mais completa, cada fração coletada foi novamente centrifugada em solução de CsCl (0,8 g/mL em TE pH 7,5), nas mesmas condições acima (não é necessário adicionar mais solução de bisbenzimidazol). Em análise posterior dos padrões de digestão com enzimas de restrição, foi determinado que o mtDNA estava contido na banda superior, coletada após a primeira centrifugação.

A bisbenzimidazol foi removida por extrações com igual volume de isopropanol, previamente equilibrado com solução saturada de NaCl, até que a fase aquosa não mais

apresentasse fluorescência ao UV. O CsCl foi eliminado por diálise contra TE pH 7,5. Ao mtDNA foram adicionados 0,05 volume de LiCl 8 M e 2 volumes de etanol absoluto. Após 2 h a -20°C o DNA foi precipitado por centrifugação a 14.000 r.p.m. e 4°C durante 20 min., lavado com etanol 80 %, seco à temperatura ambiente e dissolvido em 75 μL de TE.

4.7 – Preparação de bibliotecas de mtDNA

Foram preparadas duas bibliotecas de *shotgun** de mtDNA em vetor pUC18, uma contendo insertos com tamanhos variando entre 500 e 1.000 pb e outra com fragmentos de 1.000 a 3.000 pb. O mtDNA foi fragmentado mecanicamente pelo método de nebulização, descrito a seguir:

Foi preparada a seguinte solução para nebulização:

mtDNA	35 μL ($\sim 17 \mu\text{g}$)
glicerol 50 % (estéril)	600 μL
H ₂ O	<u>365 μL</u>
	1000 μL

A solução foi transferida para o recipiente de um nebulizador (NS) – do tipo encontrado em farmácias – do qual se retirou a máscara de inalação, cobrindo-se a abertura com um pedaço de filme plástico (Parafilm M) perfurado várias vezes com uma agulha. A solução foi nebulizada com fluxo de N₂ ultrapuro a $\sim 0,7 \text{ kgf/cm}^2$ por três ciclos de 45 s, batendo-se sempre com os dedos na lateral do recipiente para que as gotículas aderidas à parede retornassem ao fundo. Após cada ciclo, batia-se o fundo do frasco contra a superfície da bancada, também para forçar a descida das gotas aderidas à parede. Em seguida o recipiente foi colocado em um rotor do tipo *swing* e centrifugado a 1.000 r.p.m. durante 4 min. em temperatura ambiente. Foram recuperados 725 μL , dos quais 20 μL foram aplicados em gel de agarose 0,8 % para verificação. O restante foi mantido a -20°C *over-night* para precipitação do DNA, depois da adição de 0,1 volume de acetado de sódio 3 M pH 7,0 e 1,0 mL de etanol absoluto. O DNA foi recuperado por centrifugação a 14.000 r.p.m. e 18°C por 30 min., lavado com 800 μL de etanol 80 % e centrifugado por mais 15 min. nas mesmas condições.

Depois de secar a temperatura ambiente, o precipitado foi dissolvido em 20 μL de TE e aplicado em um gel a 1% de agarose de baixo ponto de fusão (Sigma). Após

* Fragmentação randômica do DNA

eletroforese, foram recortados do gel dois pedaços contendo, respectivamente, fragmentos de mtDNA com faixas de tamanhos entre 500 e 1.000 pb e entre 1.000 e 3.000 pb. Cada pedaço de gel foi colocado em um tubo *eppendorf* contendo 200 μ L de TE e aquecido a 95 °C por cerca de 1 min. até sua fusão. As soluções resultantes foram extraídas duas vezes por mistura com igual volume de fenol equilibrado com TE e centrifugação a 12.000 r.p.m. em temperatura ambiente por 3 min. Nas condições mencionadas anteriormente os DNAs foram novamente precipitados e, em seguida, dissolvidos em 5 μ L de água.

Empregou-se, então, o kit Sure Clone™ (Amersham Pharmacia Biotech) para, de acordo com o protocolo fornecido, reparar as extremidades dos fragmentos de DNA com Klenow/PNK e purificá-los em colunas MicroSpin™. Na sequência, estes fragmentos foram ligados ao vetor pUC18, previamente digerido com *Sma* I e defosforilado (componente do mesmo kit). Para as ligações, realizadas *over-night* a 14 °C, foi empregada T₄ DNA ligase da New England Biolabs®, ao invés da enzima fornecida com o kit. Os produtos de cada ligação foram precipitados, redissolvidos em 5 μ L de água estéril e empregados na transformação de células competentes de *E. coli* DH10B, por eletroporação em aparelho Gene Pulser™ Apparatus (BIO-RAD). Células transformadas foram selecionadas em placas de LB-Agar contendo 100 μ g/mL de ampicilina, X-gal e IPTG.

4.8 – Extração de plasmídios para seqüenciamento

DNA plasmidial contendo insertos de mtDNA foi recuperado através da extração pelo método de fervura em microondas. Em placas de 96 poços, cada clone bacteriano selecionado das bibliotecas de mtDNA foi inoculado em 1,0 mL de meio CircleGrow® (BIO 101) contendo ampicilina (100 μ g/mL) e incubado por 24 h a 37 °C com vigorosa agitação. As placas foram, então, centrifugadas a 3.000 r.p.m. por 8 min. em um rotor *swing* Beckman S2096. O sobrenadante foi descartado por inversão. Adicionaram-se 25 μ L de água a cada poço e as placas foram vigorosamente agitadas até completa ressuspensão dos precipitados. Foram acrescentados 70 μ L de solução de lise STET-MW e as placas novamente agitadas por cerca de 15 s, depois do que foram deixadas em repouso por 5 min. a temperatura ambiente. Em seguida, foram levadas ao forno de microondas por dois ciclos de 30 s em potência máxima (em caso de ebulição,

os ciclos eram momentaneamente interrompidos). Imediatamente, 300 μL de água deionizada foram adicionados a cada poço e as placas incubadas em gelo por 10 min. antes de serem centrifugadas por 45 min. a 3.000 r.p.m. em rotor Beckman S2096.

Foram coletados 150 μL de cada sobrenadante, contendo DNA pronto para ser utilizado nas reações de seqüenciamento. O material foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ em placas de 96 poços, de fundo redondo. Amostras de 2 μL foram tomadas aleatoriamente para verificação qualitativa e quantitativa, por eletroforese em um gel de agarose a 0,8 %.

4.9 – Seqüenciamento de DNA

4.9.1 – Genoma mitocondrial

Os insertos de mtDNA das duas bibliotecas (seção 4.7) foram seqüenciados nos dois sentidos, utilizando-se os *primers* M13-forward e M13-reverso, em seqüenciador automático ABI Prism™ 377 DNA Sequencer (PE Biosystems). Foi empregado o kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (PE Biosystems), que se baseia no princípio do método de terminação com dideoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) de Sanger *et al.* (1977). As reações foram realizadas de acordo com as condições abaixo, em placas de 96 poços de fundo em V, em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem Inc.):

Mistura para 1 reação:

BigDye™ premix	1,0 μL
Tampão 2.5x (200 mM Tris-HCl pH9,0; 5 mM MgCl_2)	3,0 μL
DNA molde	3,0 μL
Primer M13 (forward ou reverso)	3,0 μL (3,2 pmoles)

Condições de reação: 96 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min. seguido de 40 ciclos de 96 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min., 52 $^{\circ}\text{C}$ por 20 segundos e 60 $^{\circ}\text{C}$ por 4 min.

O produto de reação era precipitado por adição de 30 μL de água e 60 μL de isopropanol, inversão por várias vezes e repouso a temperatura ambiente por 15 min. ao que se seguiam 45 min. de centrifugação a 3.000 r.p.m. (rotor Beckman S2096). O precipitado era lavado com 250 μL de isopropanol 75 %, seco por 15 min. a vácuo e dissolvido em 2 μL de tampão de aplicação (formamida deionizada : blue dextran a 5% em EDTA 25 mM pH 8,0; 5:1 v/v). No seqüenciador automático as amostras eram

aplicadas em gel de poliacrilamida a 5 % (LongRange, FMC), em eletroforeses de 7 h de duração.

As seqüências eram extraídas por meio do software Sequencing Analysis 3.3 (Applied Biosystem Inc.) e a “montagem” do genoma mitocondrial foi realizada com utilização do pacote de programas Phred/Phrap/Consed (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998) (<http://www.phrap.org>). A seqüência consenso do genoma mitocondrial foi finalizada com qualidade *phred* ≥ 20 em toda a sua extensão.

4.9.2 – ESTs de *T. reesei*

Por meio do seqüenciamento em larga escala de uma biblioteca de cDNA de *T. reesei* cultivado em glicerol, já se havia criado um banco de ESTs deste fungo (Chamberg *et al.*, 2002), com cerca de 1200 seqüências depositadas (<http://trichoderma.iq.usp.br>). Neste trabalho, partindo de uma biblioteca de cDNA de *T. reesei* cultivado em glicose, previamente preparada, o seqüenciamento de novos ESTs prosseguiu, visando a confecção de *microarrays* com maior capacidade analítica.

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático *MegaBace™1000* (Molecular Dynamics), em placas de 96 poços e emprego do kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (Amersham Bioscience), segundo protocolo fornecido com o mesmo. Por meio de um processo de triagem, com a utilização dos softwares Phred/Phrap (<http://www.phrap.org>) e Localblast (NCBI), as seqüências geradas foram selecionadas segundo critérios de qualidade (mínimo de 150 bases com qualidade *phred* ≥ 20) e não redundância com o banco já existente. Foram atribuídas identificações (putativas) às seqüências que obtiveram *score* ≥ 80 nos alinhamentos por BLASTX (NCBI).

A classificação funcional dos genes identificados foi baseada nas classificações utilizadas pelos bancos de dados EGAD (*The Expressed Gene Anatomy Database* – www.tigr.org/tdb/egad/egad.shtml) e SGD (*Saccharomyces Genome Database* – <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces>). Assim os genes foram subdivididos nas seguintes funções: defesa celular, divisão celular, sinalização celular, estrutura celular, metabolismo, síntese protéica, síntese de RNA, não classificados (identificação atribuída, função desconhecida) e “*no matches*” (aqueles cujas seqüências não encontraram um bom alinhamento por BLASTX com seqüências depositadas no GenBank).

4.10 – Anotação do genoma mitocondrial

O processo de anotação foi realizado por meio de diferentes softwares. Alguns são de utilização *on-line*, outros são distribuídos gratuitamente pelos seus criadores e/ou proprietários, através da Internet. A anotação propriamente dita de ORFs (*open reading frames*), tRNAs e rRNAs foi feita através do programa Sequin (Sequin Application Version 3.17 Standard Release) distribuído pelo NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a localização de prováveis ORFs foi utilizado o Orf Finder, componente do Sequin. Estas foram traduzidas em seqüências polipeptídicas hipotéticas, relacionadas em um único arquivo no formato FASTA (texto) e, através do software BlastClient (NCBI) (Madden *et al.*, 1996) foram comparadas com seqüências depositadas no GenBank (NCBI) via BLASTP (Altschul *et al.*, 1997).

Para localizar os tRNAs foi utilizado o programa tRNAscan-SE v.1.11 (Lowe & Eddy 1997), distribuído pelo laboratório de Sean Eddy (www.genetics.wustl.edu/eddy), da Washington University in St. Louis. Após anotação das ORFs e tRNAs, as seqüências nucleotídicas de regiões ainda não anotadas foram confrontadas com o GenBank através do programa BLASTN (Altschul *et al.*, 1997) para identificação dos RNAs ribossomais.

4.11 – Análise da expressão gênica mitocondrial (efeito de glicose)

A transcrição de genes mitocondriais de *T. reesei* frente a diferentes concentrações de glicose foi verificada por meio de *Northern blots*. As sondas empregadas são provenientes de clones das bibliotecas de mtDNA, selecionadas com auxílio dos programas Sequin e Consed.

Cerca de 2.10^8 esporos foram pré-inoculados em 200 mL de meio completo contendo 1% de glicerol e 2,5 mM de glicose e cultivados por cerca de 8 horas até a germinação, quando foram centrifugados, lavados em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,0 e transferidos para 1,2 L de meio completo contendo 80 mM de glicose (em erlenmeyer de 6 L). O cultivo prosseguiu até o esgotamento de glicose, cuja concentração foi monitorada periodicamente. Durante o cultivo, alíquotas de micélio foram recolhidas, filtradas e imediatamente congeladas em N₂. O micélio coletado foi macerado em gral de porcelana com constante adição de N₂ líquido até adquirir a aparência de pó. Após a transferência de quantidade adequada para tubos do tipo

ependorff, RNA total foi extraído com emprego de TRIzol[®] Reagent (GIBCO BRL), conforme protocolo fornecido com o produto.

4.12 – Produção e análise dos *microarrays* (efeito de oxigênio)

4.12.1 – Material para impressão e hibridização das lâminas

Os DNAs utilizados para a impressão de lâminas de *microarrays* foram amplificados por meio de reações de PCR, realizadas em placas de 96 poços, a partir de estoques dos clones bacterianos (mantidos a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$) selecionados das bibliotecas de cDNA (seção 4.9.2) e de mtDNA (seção 4.7) de *T. reesei*. Foram empregadas as seguintes condições reacionais, num total de 1920 amplificações:

Mistura para 1 reação:

Estoque bacteriano	$\cong 1\text{ }\mu\text{L}$ (com replicador de 96 pinos)
dNTPs	0,125 mM (cada)
Primer M13 (forward e reverso)	0,166 μM (cada)
MgCl ₂	1,5 mM
Tampão de reação	1 x
Biolase Taq polimerase (5U/ μL)	0,5 U
H ₂ O para volume final de	100 μL

Condições de reação: 95 $^{\circ}\text{C}$ por 4 min.; 40 ciclos de 95 $^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos, 55 $^{\circ}\text{C}$ por 45 segundos e 72 $^{\circ}\text{C}$ por 1 min.; seguidos por 72 $^{\circ}\text{C}$ por 5 min.

Os produtos de amplificação foram purificados em placas MultiScreen-FB filter plates, modelo MAFB-NOB50 (Millipore), segundo protocolo do fabricante (disponível em: <http://www.millipore.com/publications.nsf/docs/TN063> – acesso em 25/03/2003). Em seguida os DNAs foram precipitados com 0,7 volume de isopropanol, dissolvidos em 6 μL de água e 1 μL de cada amostra foi verificado por eletroforese em gel de agarose (Ready-To-Run Agarose Gels, Amershan Biosciences). Os 5 μL restantes foram transferidos para placas de 384 poços e remetidos em gelo seco à TeleChem International, Inc. (www.arrayit.com) onde, em triplicata, foram utilizados para a impressão das lâminas de *microarrays*.

A hibridização dos *microarrays* foi realizada com cDNAs, sintetizados a partir de RNA de amostras de *T. reesei* coletadas em experimento de privação de oxigênio (v. seção 4.2.2). A condição de estado estacionário fisiológico em aeração plena foi tomada

como referência e, durante a síntese, o cDNA correspondente foi marcado com Cy3-deoxiuridina trifosfato (fluorescência verde). Os cDNAs referentes a todas as condições de oxigenação experimentadas, inclusive o da condição referência, foram marcados com Cy5-deoxiuridina trifosfato (fluorescência vermelha). Cada uma das lâminas de *microarray* foi hibridizada com mistura de iguais proporções de cDNA-referência e cDNA de uma das condições de estudo.

Síntese dos cDNAs marcados, hibridização das lâminas, varreduras por *scanner* e extração dos dados brutos (imagens e dados numéricos) foram realizadas pela Genisphere™ (www.genisphere.com), para onde foram enviadas as amostras de RNA de *T. reesei*. Os dados devolvidos pela empresa consistem de imagens das varreduras realizadas nas lâminas, bem como planilhas contendo os dados brutos das intensidades de fluorescência de cada amostra impressa nas mesmas. Destas intensidades, medidas nos comprimentos de onda de emissão de cada fluoróforo, já estava subtraída a interferência de fundo (*background*).

4.12.2 – Análises e validação dos resultados de microarrays

Para a normalização dos dados de fluorescência em cada comprimento de onda, foi utilizada a metodologia descrita por Dudoit *et al.* (2000). A análise inicial dos dados é baseada nos valores de intensidades de fluorescência de Cy5 (vermelha) e Cy3 (verde) que, para facilitar a explanação, serão respectivamente designadas por R (*red*) e G (*green*). Primeiramente foi calculada a razão das intensidades R/G para cada elemento impresso, em cada lâmina de *microarray*. Em seguida, foi calculada a média das razões entre as triplicatas de cada elemento, estabelecendo o critério de que desvios relativos superiores a 25% da média das razões eliminariam o elemento cuja razão apresentasse o valor mais distante. Repetia-se então o cálculo da média com os dois elementos restantes e, se desta vez o desvio relativo fosse maior que 40%, aquele elemento era descartado.

Para os elementos que passaram por esta primeira seleção calcularam-se o logaritmo na base dois das médias das razões ($\log_2[\mu R/G]$) e o $\log_2$ da raiz quadrada do produto RG médio ($\log_2[\sqrt{RG}]$). Procedeu-se então à normalização dos dados pelo

método conhecido como “lowess” ou “regressão robusta com pesos locais”, realizada através do *software* S-PLUS 2000 Professional (MathSoft, Inc.), utilizando 20% como fração local. A idéia é obter, como valores das razões normalizadas, os resíduos entre os valores calculados pelo lowess e os valores experimentais. A partir dos dados normalizados foram aplicados testes estatísticos (teste *t*) para selecionar genes diferencialmente expressos em cada lâmina de *microarray*, com intervalo de confiança > 95%. O agrupamento de genes, segundo o perfil transcricional apresentado durante experimento de limitação de oxigênio foi realizado pelo método conhecido como SOM (*Self Organizing Maps*) por meio do *software* GeneCluster 1.0 – Molecular Pattern Recognition (Whithead/MIT Center for Genome Research) e por um programa específico, desenvolvido pelo Prof. Dr. João Pedro Simon Farah (Instituto de Química – USP-SP), que permite uma forma alternativa e mais amigável de visualização dos grupos formados pelo GeneCluster.

A validação dos resultados da análise de *microarrays* foi realizada por meio de *Northern blots*. Para tanto, amostras dos mesmos RNAs originados do experimento de restrição de oxigênio e empregados na produção dos cDNAs marcados com Cy3 e Cy5 foram hibridizados com sondas de DNA selecionadas do banco de ESTs, correspondentes às mesmas seqüências impressas nas lâminas dos *microarrays*.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – Genes mitocondriais e o efeito de glicose sobre sua expressão

5.1.1 – Genoma mitocondrial de *T. reesei*

Mitocôndrias são organelas fundamentais ao metabolismo energético aeróbico e, como abordado anteriormente, seus níveis de atividade e sua integridade constituem aspectos importantes que afetam o funcionamento de inúmeros processos celulares que vão além do metabolismo oxidativo de substratos, mas que de uma forma ou outra estão relacionados a ele.

Ao longo da implementação do banco de dados de ESTs de *T. reesei* em nosso laboratório, obtivemos dados suficientes para analisar as principais vias do metabolismo energético de glicose (glicólise, TCA, metabolismo alternativo de piruvato). Assim, empregando análises de *microarray* de cDNA estudamos o perfil de expressão de transcritos destas vias durante a exaustão de glicose no meio de cultura e o comparamos com aquele apresentado por *S. cerevisiae* na passagem do metabolismo fermentativo para o respiratório (DeRisi *et al.*, 1997). A implementação do banco de dados e as análises de *microarrays* resultaram do projeto de doutorado do colega Dr. Felipe Chambergo, do qual tive a oportunidade de participar efetivamente. Os resultados destas análises, ilustrados na Figura 3, apontam a prevalência do metabolismo aeróbico em *T. reesei* mesmo em concentrações elevadas de glicose, face aos níveis transcricionais de genes do TCA, bem diferentes dos apresentados pela levedura (v. Chambergo *et al.*, 2002 para detalhes).

O metabolismo aeróbico requer a expressão de proteínas envolvidas na atividade mitocondrial e o fluxo de prótons e elétrons através dos complexos da cadeia respiratória, formados por proteínas que são codificadas por genes mitocondriais e nucleares. Dada a importância essencial da participação das mitocôndrias no metabolismo respiratório e em virtude da prevalência deste tipo de metabolismo em *T. reesei*, buscamos determinar se transcritos codificados pelo seu genoma mitocondrial estão sujeitos à forte repressão por glicose, como ocorre com *S. cerevisiae*.

Uma vez que estes transcritos não estavam representados no banco de ESTs, o DNA mitocondrial deste fungo foi isolado e completamente seqüenciado.

Através do método descrito por Garber e Yoder (1983), baseado na separação de DNA genômico do mitocondrial em um gradiente de cloreto de cério/bisbenzimidazila,

observar a formação de bandas bem definidas para o primeiro, o mesmo não ocorre com o DNA nuclear, que forma um rastro ao longo do gel.

Figura 4 – Isolamento e caracterização do mtDNA de *T. reesei*. A) Frações de DNA separadas por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério, coradas com bisbenzimidazila e visualizadas sob luz UV. O DNA mitocondrial, menos denso que o genômico, foi coletado para a preparação das bibliotecas de mtDNA. B) Padrões de digestão por *Hind* III dos DNAs mitocondrial e genômico isolados de *T. reesei*, mostrando o diferente grau de complexidade entre eles. M = marcador de peso molecular.

Com o mtDNA isolado foram preparadas duas bibliotecas em pUC18. Para este fim, fragmentos randômicos foram gerados pelo método de nebulização e inseridos no sítio de *Sma* I daquele vetor (seção 4.7). A partir daquelas duas bibliotecas o genoma mitocondrial do fungo foi totalmente seqüenciado (seção 4.9.1). Uma representação em escala da montagem realizada com os *softwares* phred/phrap/consed é apresentada na Figura 5, destacando a região correspondente à seqüência consenso do genoma e o posicionamento de todos os *reads* que a compõem. Nesta seqüência a representação das bases nitrogenadas está assim distribuída: A = 15582, C = 5131, G = 6347 e T = 15070. Desta forma, no mtDNA de *T. reesei* o conteúdo em pares de bases A-T (30.652 pb) equivale a 72,8% do total.

A seqüência consenso de mtDNA apresenta qualidade *phred* ≥ 20 em toda a sua extensão, com qualidade média por base igual a 87 e menos de 1 erro esperado a cada 10.000 bases. O genoma mitocondrial está totalmente coberto por 675 *reads* originados

de clones das bibliotecas e produtos de PCR (Figura 5), com extensão média de 588,3 bases por *read*. Isto representa uma cobertura de 9,4 vezes a sua extensão, que é de 42.130 pb. Não existe nenhuma região no consenso coberta por menos do que três *reads*, sendo pelo menos um deles em sentido oposto aos demais. Este e os demais parâmetros de qualidade alcançados para esta sequência satisfazem os critérios de finalização adotados por diferentes projetos de seqüenciamento. A página do Projeto Genoma de *Drosophila* (www.fruitfly.org/sequence/index.html), por exemplo, relata que a Celera Genomics cobriu o genoma do inseto 12 vezes, empregando o mesmo tipo de abordagem utilizado para seqüenciamento utilizado neste trabalho (*shotgun*). Já na página do Programa Genoma Humano (www.ornl.gov/TechResources/Human_Genome/project/progress.html) é dito que as metas de finalização prevêem uma cobertura de 8 a 9 vezes para cada cromossomo.

Figura 5 – Representação da montagem computacional da sequência consenso do mtDNA de *T. reesei*. Com 42.130 pb, o genoma mitocondrial foi finalizado com 675 *reads*, montados pelos softwares *phred/phrap/consed*, proporcionando uma cobertura de 9,4 vezes sua extensão. A sequência consenso inteira, representada em vermelho, apresenta qualidade *phred* ≥ 20 , com média de 87 por base e erro estimado ≤ 1 por 10.000 pb. Nenhuma região está coberta por menos que três *reads*, sendo pelo menos um em sentido oposto aos demais.

Estrutura e organização do genoma mitocondrial de *T. reesei* foram determinadas por meio de uma série de recursos de bioinformática, utilizados nos procedimentos de anotação (seção 4.10), que revelaram um genoma circular codificando 19 polipeptídios, 2 RNAs ribossomais e 26 RNAs transportadores. Todos os elementos

anotados neste genoma são transcritos a partir da mesma fita do mtDNA, ou seja, em *T. reesei* a transcrição no genoma mitocondrial ocorre em um único sentido. As características deste genoma, descritas acima, estão resumidas na Tabela 1.

Tabela 1 – O genoma mitocondrial de *T. reesei* em números

Extensão da sequência consenso (pb)	42.130
Conteúdo de A	15.582
Conteúdo de C	5.131
Conteúdo de G	6.347
Conteúdo de T	15.070
A+T (%)	72,8
Nº de <i>reads</i> na montagem	675
Extensão média dos <i>reads</i> (pb)	588,3
Cobertura do genoma (nº de vezes a extensão)	9,4
Qualidade <i>phred</i> da sequência consenso	≥20
Qualidade média <i>phred</i> por base	87
Erro esperado a cada 10 kpb	≤ 1
Peptídeos codificados	19
rRNAs codificados	2
tRNAs codificados	26

Como a anotação é baseada em comparações com bancos de dados (ORFs e rRNAs) e na identificação de seqüências características ao longo do consenso (tRNAs), todo elemento anotado deve ser considerado como “provável” ou “putativo”, uma vez que não há confirmação experimental de sua identidade. A Figura 6 mostra o mapa do genoma mitocondrial de *T. reesei*.

Dos 19 polipeptídeos codificados pelo genoma mitocondrial de *T. reesei*, 14 correspondem à subunidades protéicas de complexos enzimáticos da cadeia respiratória e síntese de ATP. São elas, sete subunidades da NADH desidrogenase (NADH-ubiquinona oxidoreductase), componentes do complexo I da cadeia de transporte de elétrons (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 e ND6); citocromo *b*, do complexo III (CYTB); três subunidades da citocromo *c* oxidase, do complexo IV (COX1, COX2 e COX3) e as subunidades 6, 8 e 9 da ATP sintase (ATP6, ATP8, ATP9). Dos 5 polipeptídeos restantes, um corresponde à proteína ribossomal S5, três foram identificadas como prováveis maturases e o último não teve nenhuma função associada à sua seqüência.

Figura 6 – Mapa do genoma mitocondrial de *T. reesei*. Com 42.130 pb, este genoma é transcrito em uma única direção e codifica várias subunidades dos complexos ATP sintase, citocromo *c* oxidase e NADH desidrogenase. Também são encontrados genes para citocromo *b* e três prováveis maturases, além das subunidades pequena e grande de rRNA e tRNAs para todos os aminoácidos.

Tabela 2 – Genes mitocondriais de *Trichoderma reesei*

Gene	Descrição	Observação
ATP6	ATP sintase 6	Subunidades da ATP sintase (fosforilação oxidativa)
ATP8	ATP sintase 8	
ATP9	ATP sintase 9	
COX1	Citocromo <i>c</i> oxidase 1	Componentes do complexo IV da cadeia de transporte de elétrons
COX2	Citocromo <i>c</i> oxidase 2	
COX3	Citocromo <i>c</i> oxidase 3	
CYTB	Citocromo <i>b</i>	Complexo III (transporte de elétrons)
ND1	NADH-ubiquinona oxidoredutase 1	Componentes do complexo I da cadeia de transporte de elétrons
ND2	NADH-ubiquinona oxidoredutase 2	
ND3	NADH-ubiquinona oxidoredutase 3	
ND4	NADH-ubiquinona oxidoredutase 4	
ND4L	NADH-ubiquinona oxidoredutase 4L	
ND5	NADH-ubiquinona oxidoredutase 5	
ND6	NADH-ubiquinona oxidoredutase 6	
rnl	RNA ribossomal – subunidade grande	RNA ribossomal – subunidade pequena
rns	RNA ribossomal – subunidade pequena	
RPS5	Proteína ribossomal S5	

Os 2 rRNAs correspondem às subunidades pequena (rns) e grande (rnl) do ribossomo mitocondrial, sendo que a última é codificada por dois exons (rnl1 e rnl2) separados pelo gene da proteína ribossomal S5. As principais características mencionadas acima estão sumarizadas na Tabela 2.

Foram identificados tRNAs para todos os aminoácidos e, às vezes, mais de um tRNA para o mesmo aminoácido, como nos casos de arginina, leucina e serina, com dois tRNAs cada, e metionina, com três. Contudo, para um dos 26 prováveis tRNAs identificados pelo software tRNAscan-SE (seção 4.10), o aminoácido supostamente transportado não pôde ser determinado. Na Tabela 3 encontram-se informações a respeito dos tRNAs anotados no mtDNA de *T. reesei*.

Tabela 3 – tRNAs mitocondriais de *Trichoderma reesei*

tRNA #	Seqüência		Tipo	Códon
	Início	Fim		
1	1837	2739	nd	???
2	6340	6423	Tyr	UAC
3	6530	6603	Asp	GAC
4	6609	6692	Ser	AGC
5	6697	6768	Asn	AAC
6	7742	7812	Gly	GGA
7	8652	8723	Val	GUA
8	9110	9181	Ile	AUC
9	9209	9295	Ser	UCA
10	9301	9372	Trp	UGA
11	9423	9494	Pro	CCA
12	14328	14398	Thr	ACA
13	14402	14474	Glu	GAA
14	14475	14545	Met	AUG
15	14691	14763	Met	AUG
16	14768	14850	Leu	UUA
17	14943	15014	Ala	GCA
18	15020	15092	Phe	UUC
19	15093	15165	Lys	AAA
20	15243	15326	Leu	CUA
21	16086	16158	Gln	CAA
22	16333	16405	His	CAC
23	16538	16609	Met	AUG
24	23826	23896	Arg	CGU
25	31038	31111	Cys	UGC
26	40348	40418	Arg	AGA

Regiões que codificam tRNAs também estão envolvidas nos dois únicos casos em que se observam sobreposições de seqüências. Com 72 pb, a seqüência para tRNA^{Val} está inserida na porção terminal (3') da seqüência que codifica ND6. Também com 72 pb, há uma seqüência para tRNA^{Met} com início na posição de número 8 da região que codifica ND2. Não existe espaço intergênico entre as seqüências de ND2 e ND3 nem entre ND4L e ND5 (todos componentes do mesmo complexo enzimático), o que sugere que pelo menos estes dois pares de genes devam ser transcritos de uma só vez, sofrendo processamento posterior. Outros 3 transcritos mitocondriais que devem ser necessariamente processados, correspondem aos genes que codificam COX2, CYTB e COX1, que possuem, respectivamente, um, dois e cinco íntrons.

As seqüências nucleotídicas referentes às regiões anotadas (ORFs, rRNAs e tRNAs) estão disponíveis *on-line* na página "*Trichoderma reesei* EST Database and Mitochondrial Genome" (<http://trichoderma.iq.usp.br>), mantida pelo Instituto de Química da USP. A seqüência completa e anotada também foi depositada no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), onde pode ser encontrada através do número de acesso (*accession number*) AF447590.

5.1.2 – Efeito de glicose sobre a expressão de genes mitocondriais

O efeito de diferentes concentrações de glicose sobre a expressão de genes mitocondriais de *T. reesei* foi verificado, inoculando-se esporos recém germinados em meio contendo alta concentração de glicose (80 mM) e cultivando o fungo até a exaustão deste substrato. Durante o cultivo, em diferentes concentrações de glicose (52, 24, 11, 3 e 0,8 mol.L⁻¹) e também em diferentes tempos após seu total esgotamento do meio (imediatamente, e após 3,5 e 18,5 horas da exaustão de glicose) foram tomadas alíquotas de micélio para a extração de RNA total. As abundâncias dos RNAs transcritos pelo genoma mitocondrial foram verificadas por meio de *Northern blots* (seção 4.11).

Na Figura 7 é apresentada uma curva do consumo de glicose por *T. reesei*, indicando os pontos nos quais alíquotas foram tomadas para as análises por *Northern blots*. Os RNAs referentes a cada condição foram hibridizados com sondas de DNA mitocondrial, selecionadas a partir das bibliotecas de mtDNA (seção 4.7). Também foram hibridizadas a sonda obtida do banco de ESTs de *T. reesei* (seção 4.9.2) para COX6 (subunidade mitocondrial codificada pelo núcleo) e a sonda para o gene de actina (Matheucci Jr. *et al.*, 1995).

Figura 7 – Curva de consumo de glicose por *Trichoderma reesei*. Os pontos destacados em preto referem-se àqueles em que foi coletado micélio para extração de RNA total e análises por *Northern blots* de genes mitocondriais. As concentrações de glicose nestes pontos correspondem a 52mM, 24mM, 11mM, 3mM, 0,8 mM e zero para as três últimas amostras coletadas.

Os resultados das hibridizações estão apresentados na Figura 8 e mostram que a transcrição dos genes e rRNAs mitocondriais não se altera significativamente em função da concentração de glicose no meio. Para as concentrações mais elevadas de glicose, nos casos em que alguma diminuição transcricional pode ser observada, esta repressão é apenas parcial, não se verificando o impedimento completo da transcrição dos genes afetados. Isto ocorre, por exemplo, com ATP9, COX1 e 2, ND2, 3 e 5 e rnl1. Já os níveis dos transcritos ATP8, COX3, CYTB, ND1, ND6, rnl2 e rns não são afetados nem em concentrações de glicose tão altas como 50mM.

De maneira geral, nota-se que os transcritos mitocondriais já são relativamente abundantes na presença de glicose e, em alguns casos, seus níveis aumentam ligeiramente à medida que este substrato tem sua concentração diminuída. Isto mostra que o meio rico em glicose não reprime a expressão gênica mitocondrial em *T. reesei* de maneira tão pronunciada como ocorre com *S. cerevisiae* (Ulery *et al.*, 1994; Costanzo & Fox, 1990). A mesma observação também vale para o transcrito nuclear COX6,

fortemente reprimido por glicose na levedura (DeRisi *et al.*, 1997), mas não afetado em *T. reesei*.

Figura 8 – Perfil de transcrição de genes mitocondriais de *T. reesei* em função da concentração de glicose. A expressão gênica foi analisada por *Northern blots* para genes mitocondriais e nucleares de *T. reesei* submetido a ensaio de consumo de glicose (v. Figura 7). Verifica-se que mesmo em altas concentrações de glicose os níveis de transcritos mitocondriais são abundantes e, onde se nota alguma diminuição, ela não chega a bloquear a síntese de RNA. COX6 é um produto mitocondrial codificado pelo núcleo. Actina é empregada como controle.

Para *S. cerevisiae* em condições metabólicas semelhantes às empregadas neste experimento, as análises tanto do comportamento transcricional como de fluxos metabólicos mostram que na presença de altas concentrações de glicose este substrato será consumido através do metabolismo anaeróbico. Isto se deve ao fato de que enzimas do TCA são fortemente reprimidas (DeRisi *et al.*, 1997), refletindo na ausência de fluxo por essa via (Gombert *et al.*, 2001). Por sua vez, em *T. reesei* as análises de fluxos metabólicos dos carbonos originados da glicose através do TCA mostram que esta via se mantém funcionando de forma praticamente inalterada em presença de alta (5 g/L ou ~28 mM) ou baixa (<0,05 g/L ou <280 µM) concentração daquele substrato (v. seção

5.2). Em adição, o perfil transcricional dos genes do TCA durante o consumo de glicose mostra que a expressão das enzimas desta via praticamente não é afetada por diferentes concentrações deste açúcar (v. Figura 3). Os resultados da análise transcricional de genes mitocondriais, aqui apresentados, juntamente com os dados previamente obtidos para genes do TCA (Chambergo *et al.*, 2002), mostram claramente que o metabolismo aeróbico neste fungo não sofre repressão por glicose na presença de altas concentrações deste açúcar. Em outras palavras, *T. reesei* irá respirar em meio rico em glicose, enquanto que nas mesmas condições metabólicas, *S. cerevisiae* terá reprimidas as vias responsáveis pelo metabolismo aeróbico.

Conforme mencionado na seção 2 (Revisão da literatura), acredita-se que no curso da evolução organismos multicelulares capazes de respirar tenham se desenvolvido a partir de organismos unicelulares fermentadores (seção 2.2.1), depois do surgimento das mitocôndrias. Estas, por sua vez, teriam transferido a maior parte de seus genes para o núcleo, de acordo com o que é preconizado pela teoria que explica seu desenvolvimento (seção 2.1.1). Assim, não deve causar surpresa o fato de que as alterações moleculares que ocorrem em resposta às concentrações de glicose, determinando o fluxo de substratos pelo metabolismo aeróbico ou anaeróbico, sejam observadas tanto em genes mitocondriais como em genes nucleares que codificam proteínas endereçadas àquelas organelas.

5.2 – Análise de fluxos metabólicos

Por meio de experimentos de marcação com ^{13}C em condições de cultivo bem definidas e controladas, métodos analíticos como GC-MS para a quantificação das marcações em metabólitos intracelulares e métodos de cálculos que combinam balanço de massa e balanço de isótopos, é possível estimar fluxos em modelos metabólicos que contenham as reações bioquímicas de vias de interesse (seção 2.4).

Uma visão geral das etapas envolvidas na análise de fluxos metabólicos com utilização de ^{13}C , está esquematizada na Figura 9.

Em linhas gerais o processo consiste em um cultivo do organismo na presença de substrato marcado, coleta da biomassa depois de alcançados os estados fisiológico e isotópico estacionários, hidrólise da biomassa para obtenção de seus componentes (aminoácidos e carboidratos, por exemplo), derivação química para obtenção de

Figura 9 – Visão geral dos processos envolvidos na análise de fluxos metabólicos com utilização de ¹³C.

compostos mais voláteis que, em seguida são analisados por técnicas como a cromatografia gasosa associada a espectrometria de massa (GC-MS). Por fim, o conjunto de dados obtidos para o organismo é utilizado para a realização de simulações que irão resultar em estimativa dos fluxos pelas reações metabólicas incluídas no modelo em estudo.

5.2.1 – Parâmetros de crescimento e marcação isotópica da biomassa

As determinações dos chamados fluxos extracelulares, como velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) e rendimento da biomassa em glicose ($Y_{X/S}$) foram realizadas por meio de cultivos descontínuos, baseadas em medidas de concentração celular (X) de *T. reesei*, e de glicose no meio (S) (seção 4.2.1). Para esta finalidade, o emprego de fermentadores de maior volume útil (4 L) implica em desvios menores das medidas tomadas.

Os fluxos extracelulares são dados necessários para os cálculos de fluxos metabólicos (v. seção 2.4). Assim, foram construídas as curvas de crescimento e de consumo de glicose, caracterizando a fase de crescimento exponencial do microrganismo. Para o intervalo de tempo em que ocorre o crescimento exponencial, os valores de X (g de massa seca/kg de meio) e de S (g/L) foram utilizados para a obtenção de $\mu_{\text{máx}}$ e $Y_{X/S}$. A Figura 10 apresenta os perfis de crescimento e consumo de glicose, bem como a determinação gráfica dos fluxos extracelulares, mostrando que nas

Figura 10 – Características de crescimento de *T. reesei* em cultivos descontínuos. Medidas realizadas a partir de amostras coletadas de cultivos realizados em fermentadores de 4L, em meio mínimo contendo glicose como única fonte de carbono. Das medidas de concentração celular (X) e glicose (S) são calculadas a velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,15 \text{ h}^{-1}$) e o rendimento da biomassa em glicose ($Y_{X/S} = 0,46 \text{ g de biomassa/ g de glicose}$).

condições experimentais empregadas, *T. reesei* cresce com velocidade específica máxima de $0,15 \text{ g/L.h}^{-1}$ e rendimento de $0,46 \text{ g}$ de biomassa/ g de glicose.

Em cultivos contínuos, realizados na presença de $[1-^{13}\text{C}]$ glicose, as condições de estado estacionário fisiológico e isotópico foram verificadas por medidas de concentração celular e da incorporação de ^{13}C em metabólitos intracelulares. A incorporação isotópica foi verificada por GC-MS, através de análises feitas em alíquotas de biomassa tomadas ao longo do cultivo em presença do substrato marcado (seções 4.2.2 e 4.5). A cinética de marcação em metabólitos intracelulares selecionados pode ser visualizada na Figura 11. Os resultados mostram que depois de 3 tempos de residência a marcação permaneceu constante, assegurando que o organismo encontrava-se em estado estacionário isotópico quando toda a biomassa foi coletada para a análise dos fluxos metabólicos, isto é, após 5 tempos de residência na presença de $[1-^{13}\text{C}]$ glicose.

Figura 11 – Verificação do equilíbrio isotópico na biomassa de *T. reesei* cultivado em presença de $[1-^{13}\text{C}]$ glicose. Incorporação de ^{13}C em vários aminoácidos e glicose (Glc), medida por GC-MS nas amostras coletadas ao longo do cultivo contínuo. Com cerca de 3 tempos de residência após início da alimentação com glicose marcada já se verifica a condição de estado estacionário isotópico. Neste cultivo um tempo de residência equivale a 10 h. O número ao lado do metabólito medido corresponde à massa do íon molecular detectado pelo espectrômetro de massa.

Em cultivos descontínuos, o crescimento exponencial representa uma condição de crescimento balanceado, mas ainda assim, trata-se de uma situação diferente de um estado estacionário em cultivo contínuo. Contudo, para fins de determinação de

marcações em metabólitos intracelulares e, portanto, de estimativa de fluxos, foi demonstrado que na fase exponencial de crescimento de um cultivo descontínuo pode-se assumir a condição de pseudo estado estacionário para o metabolismo do organismo cultivado (Sauer *et al.*, 1999; Gombert, 2001).

5.2.2 – Análise dos dados de marcação

Através das análises realizadas por GC-MS foi possível medir a marcação por ^{13}C em uma série de fragmentos de aminoácidos e de glicose intracelular de *T. reesei* cultivado em diferentes condições metabólicas (seção 4.5). A fase exponencial de crescimento, nos cultivos descontínuos realizados, representou uma condição de elevada concentração de glicose, da ordem de 28 mM (5 g/L). Já o estado estacionário, em cultivo contínuo representou uma condição metabólica de baixa disponibilidade de glicose (<280 μM). Na Tabela 4 encontram-se os resultados das marcações por ^{13}C (SFLs), medidas para cada um dos fragmentos naquelas duas condições. As marcações nos aminoácidos refletem as marcações em seus precursores, que por sua vez, são originados das vias metabólicas centrais de oxidação de glicose (glicólise, via das pentoses-fosfato e TCA) (Zubay, 1988). Alanina, por exemplo, é sintetizada a partir de piruvato e seus átomos de carbono, nas posições 1, 2 e 3, correspondem aos carbonos de seu precursor, nas mesmas posições. Dessa forma, conhecendo-se as vias que levam à formação dos aminoácidos é possível determinar a origem de cada átomo de carbono utilizado nas reações de síntese (v. Figura 2). Isto implica que a quantificação da marcação em aminoácidos fornece medidas indiretas da abundância nos seus respectivos precursores. Esta abundância, por sua vez, é o resultado da atividade das vias metabólicas de formação daqueles precursores ou, em outras palavras, dos fluxos metabólicos por estas vias.

A inspeção de valores de SFLs de diferentes fragmentos, apresentados na Tabela 4, também é útil para a validação destas marcações, medidas através das análises realizadas por GC-MS. Neste sentido, a utilização de diferentes métodos de derivação dos componentes da biomassa (seção 4.5) é de grande contribuição, visto que as marcações em um mesmo conjunto de átomos de carbono podem ser medidas a partir de fragmentos originados de formas diferentes. Sabe-se, por exemplo, que os aminoácidos alanina e valina são ambos derivados de piruvato. Através dos valores de marcação medidos (SFLs) para os fragmentos destes aminoácidos e levando-se em conta os átomos de carbono do precursor presentes no fragmento, verifica-se a paridade dos

dados obtidos a partir de compostos gerados por derivações diferentes (ECF ou DMFDMA). Para as duas condições fisiológicas experimentadas, pode-se verificar, por exemplo, a proximidade dos valores de marcação para os fragmentos Ala99 e Ala116 (respectivamente, 29,3 e 29,7 para o cultivo descontínuo e 24,5 e 24,7 para o contínuo) ou para Val127 e Val144 (56,4 e 56,7 no descontínuo e 48,9 para ambos no contínuo). Nos dois exemplos, o primeiro fragmento é originado do aminoácido derivado quimicamente com DMFDMA, enquanto o segundo vem da derivação com ECF (v. seção 4.5 para detalhes sobre as derivações). Note-se também que para ambas as condições de cultivo a marcação nos fragmentos Ala99 ou Ala116, que contêm 2 átomos de carbono provenientes do piruvato, corresponde à cerca da metade da marcação nos fragmentos Val127 ou Val144, que possuem 4 carbonos oriundos deste precursor. Da mesma forma, podem-se comparar as marcações em Asp188 com aquelas em Thr146 (respectivamente, 48,8 contra 45,8 e 42,9 contra 41,6 no contínuo), uma vez que oxaloacetato fornece todos os átomos de carbono destes aminoácidos.

Tabela 4 – Marcações (SFLs) medidas por GC-MS

Metabólito ^{a,b}	Átomos de C no fragmento medido	Precursor ^c	SFLs (%)	sd	SFLs (%)	sd
			Descontínuo ^d		Contínuo	
Glc 331 ^G	1,2,3,4,5,6	G6P	96,6	0,48	87,7	0,05
Ser175 ^E	1,2	G3P	2,6	0,67	1,2	0,27
Ser132 ^E	2,3	G3P	26,4	0,24	22,7	0,20
Gly175 ^E	1,2	G3P	5,2	0,22	4,1	0,20
Gly144 ^D	1,2	G3P	5,2	0,02	3,8	0,09
Gly85 ^D	2	G3P	2,6	0,04	0,8	0,07
Ala116 ^E	2,3	PYR	29,7	0,04	24,7	0,02
Ala99 ^D	2,3	PYR	29,3	0,42	24,5	0,11
Ala158 ^D	1,2,3	PYR	31,3	0,38	25,6	0,03
Leu158 ^E	2,3,4,5,6	PYR+AcCoA	79,8	0,26	73,1	0,23
Val144 ^E	2,3,4,5	PYR	56,7	0,08	48,9	0,24
Val143 ^D	1,2	PYR	5,0	0,03	3,6	0,03
Val127 ^D	2,3,4,5	PYR	56,4	0,40	48,9	0,15
Val186 ^D	1,2,3,4,5	PYR	58,2	1,98	50,1	0,30
Asp188 ^E	2,3,4	OAA	48,8	0,24	42,9	0,23
Asp115 ^D	2	OAA	15,2	0,72	14,2	0,37
Asp216 ^D	1,2,3,4	OAA	58,8	0,27	53,3	0,11
Ile158 ^E	2,3,4,5,6	OAA+PYR	75,3	1,40	66,8	0,11
Thr175 ^E	1,2	OAA	24,8	0,85	23,3	0,14
Thr146 ^E	2,3,4	OAA	45,8	0,83	41,6	0,15
Pro142 ^E	2,3,4,5	AKG	61,9	0,30	56,1	0,17
Lys156 ^E	2,3,4,5,6	AKG+AcCoA	86,3	0,01	80,3	0,13
Glu143 ^D	1,2	AKG	32,7	1,03	28,5	0,07
Glu230 ^D	1,2,3,4,5	AKG	80,5	0,67	68,6	0,62
Phe192 ^E	2,3,4,5,6,7,8,9	E4P+PEP	73,8	0,24	60,6	0,40
Phe143 ^D	1,2	PEP	4,7	0,02	2,6	0,01

^a O número ao lado do metabólito medido representa a massa do íon molecular não marcado, detectado pelo espectrômetro de massa.

^b Em sobrescrito está indicado o método de derivação química empregada: G, glicose penta-acetato; D, DMFDMA; E, ECF (v. Materiais e métodos para detalhes).

^c Vias metabólicas centrais consideradas: glicólise, via das pentoses-fosfato e TCA. Abreviações: G6P, glicose-6-fosfato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; PYR, piruvato; AcCoA, acetil-CoA; OAA, oxaloacetato; AKG, α -cetoglutarato; PEP, fosfoenolpiruvato; E4P, eritrose-4-fosfato.

^d Para fins de comparação os valores das SFLs medidas estão dobrados. A marcação corresponde à metade da indicada, uma vez que nos cultivos empregaram-se 50% de [1-¹³C]glicose e 50% de glicose naturalmente marcada.

5.2.3 – Fluxos metabólicos em diferentes concentrações de glicose

A estimativa de fluxos metabólicos se dá sobre um modelo estequiométrico contendo as reações bioquímicas da rede que se quer investigar, por meio de cálculos que computam a diferença entre dados de marcação medidos experimentalmente com dados hipotéticos de marcação, resultantes de simulações de fluxos pelas vias consideradas no modelo. O objetivo dos cálculos é conseguir a menor diferença possível entre os dados medidos e calculados, o que implica dizer que, nesta condição, os fluxos metabólicos determinados na simulação representam aqueles que melhor descrevem as atividades daquelas vias, na condição fisiológica em que as marcações foram medidas.

Assim, foi possível estimar e comparar os fluxos de carbono pelo metabolismo central de *T. reesei* cultivado nas condições de baixa e alta disponibilidade deste substrato, conseguidas através de cultivos realizados em regime contínuo (quimiostato) e descontínuo (*batch*), respectivamente.

Como descrito na seção 2.4, os cálculos são realizados por meio de um processo iterativo, no qual vários ajustes nos fluxos simulados são feitos até que se consiga chegar ao menor erro, isto é, à menor diferença entre os valores de marcação calculados e medidos. Neste ponto, cabe ressaltar que se o modelo metabólico utilizado como base para os cálculos não for o mais apropriado, isto é, não representar as reações metabólicas do organismo estudado com fidelidade, os valores de marcação calculados não se aproximarão dos valores medidos ou, caso isto aconteça, os fluxos estimados não corresponderão à melhor representação do metabolismo *in vivo*. Desta forma, a definição do modelo baseia-se em dados experimentais e da literatura e em hipóteses adequadas, as quais são por vezes necessárias para complementar informações bioquímicas não disponíveis para o organismo em estudo, bem como para contornar problemas nos cálculos.

A Tabela 5 mostra a comparação dos valores de marcação medidos com os valores calculados a partir do modelo empregado. Pode-se observar que quase todas as marcações calculadas são muito próximas às SFLs medidas, admitido-se um erro absoluto de uma unidade na medida das marcações (Christensen & Nielsen, 1999a).

Para os experimentos realizados com *T. reesei*, o modelo metabólico que se mostrou mais adequado para as duas condições analisadas está apresentado no Apêndice, que inclui as transições dos átomos de carbono consideradas para o balanço de isótopos. Cabe ressaltar que nele não estão incluídas reações de formação de produtos extracelulares, como por exemplo, glicerol, etanol ou acetato, uma vez que

estes ou outros compostos não foram detectados em análises por HPLC, realizadas em amostras de meio de cultura coletadas de todos os cultivos.

A não formação de um produto extracelular mensurável é um fato a se lamentar, uma vez que isto constituiria uma valiosa contribuição para fins das estimativas de fluxos por permitir a elaboração de um modelo metabólico mais completo. Isto, por sua vez, tornaria os resultados mais precisos. Cabe também chamar a atenção ao fato de que a produção de acetato por *Trichoderma* cultivado em glicose, verificada no trabalho que realizamos anteriormente (Chamberg *et al.*, 2002), foi observada através de medidas espectrofotométricas de atividade enzimática, a partir de extratos celulares e não de amostras do meio de cultura.

Tabela 5 – Comparação de SFLs medidas e calculadas

Metabólito	SFLs (%)			
	Descontínuo		Contínuo	
	Medido	Calculado	Medido	Calculado
Glc 331	96,6	96,8	87,7	87,2
Ser175	2,6	5,6	1,2	3,5
Ser132	26,4	26,2	22,8	23,2
Gly175	5,2	6,2	4,1	3,4
Gly144	5,2	6,2	3,8	3,4
Gly85	2,6	2,7	0,8	1,5
Ala116	29,7	26,2	24,7	23,2
Ala99	29,3	26,2	24,5	23,2
Ala158	31,3	29,5	25,6	25,3
Leu158	79,8	76,1	73,1	67,5
Val144	56,7	52,5	48,9	46,4
Val143	5,0	5,6	3,6	3,5
Val127	56,4	52,5	48,9	46,4
Val186	58,2	55,7	50,2	48,5
Asp188	48,8	39,2	42,9	45,7
Asp115	15,2	18,0	14,2	14,9
Asp216	58,8	63,0	53,4	54,2
Ile158	75,3	78,8	66,8	68,9
Thr175	24,8	28,5	23,3	23,4
Thr146	45,8	52,5	41,6	45,7
Pro142	61,9	65,2	56,1	56,0
Lys156	86,3	88,4	80,3	76,8
Glu143	32,7	34,5	28,5	30,8
Glu230	80,5	78,5	68,6	68,1
Phe192	73,8	73,4	60,6	59,9
Phe143	4,7	5,6	2,6	3,5

Para detalhes a respeito da nomenclatura dos metabólitos, consultar as notas da Tabela 4

Dos valores de marcação calculados, tanto para o cultivo descontínuo como contínuo, foram extraídos os fluxos metabólicos estimados pelos programas de simulação, para cada reação contida no modelo. Os valores de fluxos são relativos ao consumo de 100 unidades arbitrárias de glicose como única fonte de carbono (por isto a necessidade de se utilizar meio de cultura de composição definida) e estão dispostos no diagrama esquemático do metabolismo primário de *T. reesei*, apresentado na Figura 12. A primeira e principal informação extraída da análise dos resultados é que não se verifica alteração significativa de fluxos pelas vias do metabolismo primário de glicose para qualquer das duas condições experimentadas, isto é, alta e baixa concentração de glicose.

Numa rápida comparação com os dados obtidos para a levedura *S. cerevisiae* (Gombert, *et al.*, 2001), a diferença mais marcante encontra-se no funcionamento do TCA. Enquanto os fluxos praticamente não são afetados em *T. reesei*, em altas concentrações de glicose este ciclo é interrompido em *S. cerevisiae*. Ao contrário do fungo, que não realiza metabolismo fermentativo, *S. cerevisiae* direciona cerca de 85% dos carbonos provenientes da glicose para a formação de etanol. Também na levedura, na mesma condição, 81% da glicose consumida segue para a formação de piruvato diretamente a partir das reações da via glicolítica, enquanto cerca de 16% do total segue pela via das pentoses-fosfato. Em *T. reesei* o fluxo direto pela glicólise é da ordem de 31% do substrato consumido, enquanto 62% são desviados pela via das pentoses.

No fungo, a semelhança observada entre os dados obtidos nas duas condições metabólicas é indicativa de que os efeitos de repressão por glicose não se fazem sentir sobre a oxidação deste substrato através do metabolismo aeróbico. O destino inalterado dos átomos de carbono provenientes da glicose rumo às reações do TCA mantém essencialmente os mesmos níveis de atividade respiratória em qualquer das duas condições.

Neste ponto, é importante fazer uma observação quanto ao destino do piruvato: Na Figura 12 existe uma aparente diferença nas vias de formação de acetil-CoA. Em princípio os resultados mostram que na presença de alta concentração de glicose, acetil-CoA seria preferencialmente formada através da reação catalisada pela enzima piruvato desidrogenase, enquanto que em baixa disponibilidade de glicose o maior fluxo se daria pelas enzimas piruvato descarboxilase, acetaldeído desidrogenase e acetil-CoA sintetase (o chamado desvio da piruvato desidrogenase). Estes dados, contudo, não

Figura 12 – Fluxos pelo metabolismo de produção de energia a partir de glicose em *Trichoderma reesei*. Valores obtidos para cultivos em presença de alta (5 g/L) e baixa (<0,01 g/L) concentrações de glicose estão apresentados, respectivamente, em **negrito** e *itálico*. Todos os fluxos são relativos ao consumo de glicose como única fonte de carbono (100 unidades arbitrárias). G6P, glicose-6-fosfato; F6P, frutose-6-fosfato; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; PEP, fosfoenolpiruvato; PYR, piruvato; ACA, acetaldeído; ACE, acetato; AcCoA, acetil-CoA; OAA, oxaloacetato; FUM, fumarato; AKG, α-ceto glutarato.

necessariamente correspondem à realidade e isto se deve ao fato de que justamente o destino do piruvato constitui o “ponto fraco” desta metodologia. O que se verifica aqui é a ocorrência de duas vias paralelas levando à formação de um produto a partir do mesmo substrato. Isto não seria problema, não fosse o fato de que as duas vias formam um produto que mantém as mesmas relações de posição dos átomos de carbono com o substrato. Em outras palavras, considerando que o carbono do piruvato na posição 1 seja aquele liberado na forma de CO₂, os carbonos 2 e 3 corresponderão, respectivamente, aos carbonos 1 e 2 do grupo acetil, seja qual for sua via de síntese. Neste caso, a origem da acetil-CoA não pode ser determinada através de medidas por GC-MS, o que seria possível apenas se em uma das duas vias os carbonos 2 e 3 do piruvato dessem origem aos carbonos 2 e 1 do grupo acetil. Vale lembrar que nas simulações de distribuição de fluxos, os programas atribuem valores a todas as reações contidas no modelo, de forma que o balanço estequiométrico de massa possa ser fechado. Portanto, para as reações de formação de acetil-CoA a partir de piruvato, os valores de fluxos observados na Figura 12 resultam da impossibilidade sua determinação por meio do método empregado.

Independente deste fato, nenhum outro problema do gênero ocorre para as demais reações esquematizadas na figura. Assim, os resultados das análises de fluxos pelas vias principais do metabolismo primário de obtenção de energia representam o retrato final do processo de expressão gênica, para cada condição estudada. Com o emprego desta metodologia conclui-se que tanto para *S. cerevisiae* como para *T. reesei* os fluxos refletem os resultados obtidos das análises dos transcritos de enzimas destas vias, observadas em condições experimentais semelhantes (DeRisi *et al.*, 1997; Gombert *et al.*, 2001; Chambergo *et al.*, 2002). Dessa forma, assim como já demonstrado para *S. cerevisiae* e *K. lactis* (Gancedo, 1998; Zeeman *et al.*, 2000), fica evidente que, também em *T. reesei*, a regulação do destino do piruvato proveniente da glicólise é exercida na etapa transcricional.

5.2.4 – Avaliação crítica dos resultados da AFM em *T. reesei*

Como mencionado no fim da seção 2.4, as análises de fluxos metabólicos apresentadas neste trabalho só puderam ser realizadas por meio de colaborações interdisciplinares, estabelecidas com o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Depto. de Engenharia Química da Poli-USP (<http://leb.pqi.ep.usp.br>) e com o *Center for Process Biotechnology*, da Universidade Técnica da Dinamarca (www.cpb.dtu.dk). Graças aos recursos financiados pela FAPESP pude passar três meses na DTU

realizando os cultivos de *T. reesei* na presença de [1-¹³C]glicose, as análises por GC-MS e os cálculos de fluxos metabólicos.

Como acontece com todo procedimento experimental, principalmente nas etapas de implementação, é sempre possível identificar aspectos que apontam para a necessidade de posterior otimização. Neste caso não poderia ser diferente. Assim, levando-se em conta o curto espaço de tempo disponível para realizar experimentos com este grau de complexidade (sem mencionar o fato de se estar trabalhando em um ambiente que, de início, não é familiar), a avaliação que se pode fazer ao final é a seguinte:

Em vista das análises dos dados de marcação (seção 5.2.2), seguramente obtidos no estado estacionário isotópico (seção 5.2.1) os resultados alcançados mostraram-se consistentes e, se comparados às informações provenientes da análise do perfil transcricional de *T. reesei* em diferentes concentrações de glicose (v. Figuras 3 e 12), tudo nos leva a crer em sua coerência. Contudo, algumas dificuldades experimentais foram enfrentadas durante a realização dos cultivos e constituem motivos para determinar a necessidade de repetição dos experimentos, visando eliminar qualquer possibilidade de dúvidas e críticas.

É preciso ressaltar que cultivar um fungo filamentoso em fermentador (especialmente numa dorna de volume tão reduzido) não é tarefa tão simples. Só como exemplo, são grandes as chances de entupimentos das entradas e saídas de meio e de gases, causados pelas hifas. E problemas dessa natureza foram de fato enfrentados. Em adição, um problema, cuja solução só foi identificada quando já me encontrava de volta ao Brasil, diz respeito ao meio de cultura utilizado. Habitados a realizar cultivos descontínuos, em frascos agitados em incubadoras, não nos demos conta de que o pH utilizado (6.0) favorece a precipitação de sais de fosfato, mais solúveis em pHs mais baixos. Apesar do fungo ser capaz de dissolver os cristais e utilizar os nutrientes, o acúmulo de precipitado no frasco de alimentação (mesmo com o líquido sendo continuamente agitado) pode ter contribuído de forma significativa para alterar a composição do meio que efetivamente entrava na dorna. Neste caso, tendo em vista que foi empregado meio mínimo, parâmetros como concentração celular e razão de crescimento podem ter sofrido alterações caso outro substrato que não a glicose tenha se tornado limitante. Dessa forma, mais uma aproximação foi necessária no momento de realizar as estimativas de fluxos, assumindo para os cultivos contínuos o mesmo valor

de rendimento da biomassa em glicose ($Y_{X/S}$) determinado para os cultivos descontínuos (seção 5.2.1).

Por estes motivos é que anteriormente foi dito que os resultados aqui apresentados são de caráter preliminar, apesar de acreditarmos na consistência dos dados obtidos.

Atualmente, esforços conjuntos estão sendo empreendidos pelo nosso laboratório e pelo Laboratório de Eng. Bioquímica da Poli-USP, no sentido de viabilizar a realização de todas as etapas da análise de fluxos metabólicos no Brasil.

5.3 – Efeitos de oxigênio sobre a expressão gênica de *T. reesei*

5.3.1 – Limitação de O_2 em cultivo contínuo

A determinação dos efeitos de diferentes concentrações de oxigênio sobre a expressão gênica de *T. reesei* foi realizada no fungo cultivado em fermentador sob regime de cultivo contínuo (seção 4.2.2), tendo glicose como substrato limitante. Nesta modalidade de cultivo, também denominada quimiostato, as vazões de entrada de meio e saída do conteúdo da dorna são iguais, o que é obtido através da alimentação de meio com uma bomba peristáltica e remoção por outra, constantemente ligada, que retira meio conforme o nível de líquido atinge o bocal de saída, mantendo o volume constante. O emprego do cultivo contínuo permite o estudo do comportamento de um microrganismo sob condições bem controladas de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, concentração de nutrientes, etc., visto que é alcançado e mantido um estado estacionário de crescimento (equilíbrio), no qual todas as variáveis comuns a um cultivo descontínuo permanecem constantes ao longo do tempo.

Para a realização de experimento em que a disponibilidade de oxigênio seria estudada, a alimentação contínua foi acionada ao término da fase de crescimento exponencial e aguardou-se o estabelecimento da condição de estado estacionário em condição de aeração plena. Cerca de 70 horas após o inóculo, já na condição de equilíbrio fisiológico, o suprimento de O_2 foi gradativamente diminuído em intervalos de 1h até a condição de anaerobiose (alcançada com a injeção de nitrogênio). Em seguida, foi retomada a condição inicial de aeração. Antes de cada alteração na concentração de O_2 , ou entre uma condição e outra, alíquotas da cultura foram coletadas para a extração de RNA total de *T. reesei*. Estão apresentados na Figura 13 e na Tabela 6, os níveis de oxigênio dissolvido (OD), CO_2 , glicose e de concentração celular,

medidos durante o período em que se promoveram variações na disponibilidade de O_2 . Na figura também estão indicados os pontos em que amostras de micélio foram coletadas para a extração de RNA, destinado às análises de *microarrays*.

No estado estacionário, a concentração celular é determinada pela concentração do substrato limitante, que neste caso é glicose. Dessa forma, praticamente toda a glicose que entra no fermentador é prontamente consumida, o que mantém sua concentração sempre em níveis muito baixos (da ordem de μM). Observa-se através da Figura 13 e Tabela 6 que quando a concentração de O_2 cai de 0,2 para 0,1 mg/L (tempo = 4 h) a concentração de glicose no meio começa a aumentar, indicando que a partir deste ponto já não é mais este o substrato limitante, mas sim o oxigênio. Sem ter uma via alternativa para a oxidação de glicose, o consumo deste carboidrato diminui na falta do aceptor final de elétrons da cadeia respiratória, chegando a cessar quando é atingida a condição de anaerobiose (entre a 6ª e 7ª horas do experimento).

Figura 13 – Cultivo contínuo de *T. reesei* em condição de limitação de oxigênio. Monitoração dos níveis de oxigênio dissolvido (OD), produção de CO_2 e medidas das concentrações celulares e glicose durante o experimento. Em intervalos de 1h a concentração de O_2 foi gradativamente diminuída e alíquotas de micélio foram coletadas para a extração de RNA e análises de *microarrays*. As setas indicam a tomada de amostras. Em verde está indicado o ponto de aeração tomado como referência e em vermelho as condições-teste. Para a análise de *microarrays* o cDNA sintetizado a partir do RNA referência foi marcado com Cy3-dUTP. Os demais foram marcados com Cy5-dUTP.

Tabela 6 – Dados do ensaio de limitação de oxigênio

Tempo (h)	O ₂ dissolvido (mg/L)	Glicose (mM)	Consumo de glicose (g/g.h)
0	5,0	0,08	0,099
1:00	2,5	0,08	0,099
2:00	1,0	0,14	0,099
3:00	0,5	0,10	0,099
4:00	0,2	0,10	0,099
5:00	0,1	3,54	0,040
5:30	0,0	7,48	0,020
6:00	0,0	11,02	0
6:30	N ₂	16,93	0
7:00	N ₂ → O ₂	20,47	0,030
9:00	5,0	28,93	0,040

Em face disto e, como era de se esperar, nota-se que após o início do acúmulo de glicose a concentração celular sofre um decréscimo (tempo > 5 h), chegando a valores cerca de 23% abaixo do patamar inicial. Apesar das retiradas de alíquotas e das reduções anteriores na concentração de O₂ dissolvido, a concentração celular vinha se mantendo relativamente constante até então.

As medidas de produção de CO₂ proporcionam uma boa idéia da atividade respiratória do fungo durante o experimento. Uma observação importante que se pode extrair destes dados diz respeito à viabilidade das células após o período de stress ao qual foram submetidas. Isto é comprovado pela retomada na produção de CO₂ logo após o restabelecimento da condição inicial de aeração, indicando a volta do consumo de oxigênio. Proporcionalmente à concentração celular, a concentração de CO₂ ao término do cultivo representa cerca de 85% dos valores iniciais.

Para melhor caracterizar as condições fisiológicas impostas ao fungo neste experimento, convencionou-se tratar por “hipóxia” o período do experimento em a concentração de O₂ variou entre 5,0 e 0,1 mg/L (entre os tempos 0 e 5 horas). Até este ponto os eletrodos ainda podiam medir a concentração de oxigênio e ainda era possível verificar o consumo de glicose. O período entre 5 e 7 horas, por sua vez, foi assumido como condição de anaerobiose ou “anóxia”, desconsiderando-se, por exemplo, a pequena quantidade de oxigênio dissolvida no meio de alimentação, o limite inferior de sensibilidade dos eletrodos de O₂ ou o grau de pureza do N₂ injetado. Estas aproximações podem justificar o fato de não se verificar, em nenhum momento, a produção nula de CO₂, que em seus níveis mais baixos é de cerca de 10% da inicial.

É importante observar a incapacidade de consumir glicose em condições extremas de limitação de oxigênio, demonstrada por *T. reesei*. Este fato atesta sua classificação como um organismo estritamente aeróbio, incapaz de re-programar sua rede metabólica para realização de um processo fermentativo, como faz *S. cerevisiae* e outros organismos unicelulares anaeróbios facultativos. Em um ensaio similar a este, realizado com a levedura, não seria esperado um acúmulo de glicose como o observado aqui, com *Trichoderma*.

Do ponto de vista experimental, é necessário observar que, alterando a disponibilidade de oxigênio para o fungo, o aumento da concentração de glicose no decorrer do ensaio surge como uma segunda variável no sistema. Este fato traz consigo uma séria implicação, que precisa ser levada em consideração. Uma vez que a concentração de glicose no meio chega a níveis próximos de 30 mM, o efeito de repressão por glicose sobre a expressão gênica não pode ser ignorado. Assim, o comportamento transcricional de genes de *T. reesei*, discutido nas próximas seções, não pode ser atribuído exclusivamente ao efeito da disponibilidade de oxigênio, pelo menos ao longo do período de anóxia, no qual a glicose atinge níveis considerados repressores.

5.3.2 – Análises preliminares dos *microarrays*

As lâminas de *microarrays* foram hibridizadas com cDNAs sintetizados a partir do RNA extraído das amostras de *T. reesei* coletadas durante a limitação de oxigênio (seções 4.2.2, 4.12.1 e 5.3.1). A condição de estado estacionário fisiológico em aeração plena (OD = 5,0 mg/L), correspondente à primeira amostra coletada, foi tomada como referência e está indicada com a seta verde na Figura 13. Foram produzidas dez lâminas de *microarrays*, uma para cada condição de aeração. Cada lâmina foi hibridizada com mistura de iguais proporções de cDNA-referência (marcado com Cy3 – verde) e cDNA da correspondente condição-teste (marcado com Cy5 – vermelho). Desta forma, a primeira lâmina foi hibridizada com duas populações de cDNA da condição referência, uma marcada com Cy3 e outra com Cy5. A segunda foi hibridizada com cDNA referência-Cy3 e teste-1-Cy5, a terceira com cDNA referência-Cy3 e teste-2-Cy5, e assim por diante.

A análise das intensidades de fluorescência ou, mais propriamente, a relação entre as fluorescências Cy5/Cy3, fornece informações a respeito das abundâncias dos transcritos representados nos *microarrays* em cada condição, com relação às suas abundâncias na condição de referência. Em outras palavras, a razão das intensidades de

fluorescência (R) para cada gene é interpretada como a razão das concentrações de seu mRNA nas duas condições analisadas (teste/referência). Para facilitar a interpretação dos resultados, os valores das razões calculadas são convertidos em logaritmos na base 2 ($\log_2 R$). Desta forma, em comparação com a condição de referência, induções e repressões de mesma magnitude, por exemplo, tornam-se numericamente iguais, com sinais opostos. Para o caso de não variação, $R = 1$ e portanto, $\log_2 R = 0$. Esta notação é particularmente útil para a visualização gráfica dos resultados através de *softwares* que, em geral, produzem figuras nas quais a cor preta é atribuída à não variação ($\log_2 R = 0$) e tonalidades de vermelho e verde representam, respectivamente, os valores positivos (indução) e negativos (repressão).

Empregando *softwares* apropriados (v. seção 4.12.2), numa primeira análise das dez lâminas produzidas, verificou-se a ocorrência de algum problema com a hibridização da placa referente a 2,5 mg/L de O_2 dissolvido (tempo = 1h) e por esta razão ela foi excluída das análises posteriores. De acordo com os critérios de seleção aplicados às triplicatas dos 1920 genes de *T. reesei* (seção 4.12.2) representados nas demais lâminas, 1856 foram escolhidos para análise. A Figura 14 apresenta o perfil transcricional destes 1856 genes selecionados, referente a todo o período do experimento (hipóxia e anóxia). Eles estão agrupados pelo método designado por SOM (“*Self Organizing Maps*” – mapas auto-organizáveis), em função das tendências apresentadas face às variações na disponibilidade de O_2 (comportamento transcricional). Segundo a categoria funcional, atribuída com base em bancos de dados como EGAD e SGD (seção 4.9.2), estes 1856 estão assim distribuídos: 28 em defesa celular, 20 em divisão celular, 37 em sinalização celular, 28 em estrutura celular, 225 em metabolismo, 151 em síntese protéica, 27 em síntese de RNA, 159 não classificados e 1180 “*no matches*”.

Através do agrupamento por SOM, a formação dos grupos ou “*clusters*”, apresentados na Figura 14 promove uma separação preliminar de genes que possuem comportamentos similares nas condições estudadas. Numa primeira análise destes grupos, de caráter puramente visual, verifica-se nos *clusters* c2 a c7 e c9 a ocorrência de indução da transcrição tanto em condições de hipóxia (entre 1,0 e 0,1 mg/L de O_2) como de anóxia (N_2 e 0,0 mg/L de O_2). No *cluster* c11 nota-se tendência de indução apenas em hipóxia, enquanto nos *clusters* c8 e c10, apenas em anóxia. Repressão em hipóxia e anóxia é observada nos componentes dos *clusters* c15-20, enquanto aos genes dos

Figura 14 – Perfil de expressão de genes de *T. reesei* submetido à limitação de oxigênio. Pelo método de SOM, 1856 genes representados nos *microarrays* foram agrupados em 25 *clusters* (c0 a c24), de acordo com o comportamento transcricional frente à variação na disponibilidade de O₂. Para cada *cluster* há um gráfico com a tendência de expressão (linha azul) e as dispersões (linhas vermelhas) dentro do grupo. O número de genes que compõe cada grupo está indicado ao lado no número do *cluster*. Nos gráficos os pontos vermelhos representam a condição referência e os demais, cada uma das condições de estudo. À direita, outra forma de visualização dos mesmos grupos, onde cada linha representa um gene e cada coluna uma condição de aeração. A condição de hipóxia está destacada em amarelo e em azul a condição de anóxia. R = condição referência (OD = 5 mg/L). Induções e repressões são representadas, respectivamente, em vermelho em verde.

grupos c12-14 pode ser atribuída tendência de repressão mais pronunciada apenas em anóxia. Nos *clusters* c0, c1 e c21-24 praticamente não se observa variação nos níveis transcricionais.

Inicialmente, o comportamento transcricional de qualquer gene na lâmina referente ao último ponto do experimento (OD = 5,0 mg/L; tempo = 9 h) deve ser considerado com certa ressalva, tendo sempre em vista que esta condição representa o alívio de uma situação estressante para o organismo e que não foi dado a ele tempo suficiente para voltar ao estado estacionário inicial. Portanto, apesar da disponibilidade de oxigênio ser a mesma do início do experimento, é de se esperar que em vários casos os níveis transcricionais sejam diferentes nas duas condições. Em adição, conseguir interpretar o significado biológico do comportamento transcricional de muitos genes nesta condição pode se constituir numa difícil tarefa. Contudo, a observação de alterações na expressão gênica neste ponto (especialmente induções), constitui mais uma evidência da viabilidade celular ao término do ensaio de limitação de O₂.

Depois desta primeira avaliação dos dados, procedeu-se à validação dos resultados obtidos dos *microarrays* por meio da comparação com várias hibridizações feitas através de *Northern blots*. De dezoito hibridizações realizadas, para genes induzidos e reprimidos, duas não coincidiram com os resultados de *microarrays*, sendo que em uma delas verificou-se um problema com a sonda utilizada. Em geral, o processo de validação mostrou boa correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas, conforme demonstrado na Figura 15, que apresenta algumas das comparações realizadas.

Figura 15 – Validação de resultados de *microarrays*. Por comparação, *Northern blots* realizados com o mesmo material empregado na confecção e hibridização dos *microarrays* mostram concordância entre os resultados obtidos. ACS, acetil-CoA sintase; BTF3, fator de transcrição; HSP, proteínas de choque térmico; HXT1, transportador de glicose de alta afinidade; MBF1, co-ativador transcricional; PDC, piruvato descaboxilase; PYK, piruvato quinase.

5.3.3 – Identificação de genes diferencialmente transcritos

Uma vez que o processo de validação demonstrou que os resultados são confiáveis, buscou-se identificar aqueles genes cuja variação nos níveis de transcrição é significativa nas condições experimentais empregadas e quais, dentre eles, apresentavam-se pelo menos 3 vezes mais induzidos ou reprimidos com relação à condição referência. Para este fim, foi primeiramente aplicado um teste *t* aos resultados extraídos de cada lâmina de *microarray*, para selecionar aqueles genes cuja expressão é significativamente afetada, com intervalo de confiança > 95%. Seguindo este critério, genes foram selecionados quando passaram no teste em pelo menos uma das lâminas, com exceção daquela correspondente à condição referência. Desta maneira, dos 1856 genes representados no experimento, foram separados 330 diferencialmente expressos ($P < 0,05$), entre os quais foram identificados 265 cujos níveis de expressão variaram 3 ou mais vezes com relação à condição inicial de aeração plena.

Também pelo método de agrupamento por SOM, estes genes foram organizados em *clusters* que estão apresentados na Figura 16. Aqueles numerados de c0 a c7 contêm

144 genes induzidos, enquanto nos *clusters* c8 a c14 encontram-se distribuídos os demais 121, reprimidos nas condições experimentais. A Figura 16 também mostra a distribuição dos genes pelos grupos, de acordo com sua classificação funcional.

Dos 144 genes cuja transcrição foi induzida com a diminuição de oxigênio, 106 estão classificados como “*No matches*”, isto é, suas seqüências não encontraram bom alinhamento por BLASTX com seqüências depositadas no GenBank. Dos 38 restantes, 9 não puderam ser classificados quanto à função biológica, 7 estão envolvidos com processos de defesa celular, 14 são relacionados ao metabolismo, 5 encontram-se associados à síntese de RNA, 2 pertencem à categoria de estrutura celular e 1 à de divisão celular. Uma lista destes 38 genes, separados por função e subfunção está apresentada na Tabela 7. Na mesma tabela encontra-se a localização de cada um deles dentro dos *clusters* formados por SOM, mostrados na Figura 16.

Com relação aos genes reprimidos pela limitação de oxigênio, os não identificados (*No matches*) somam 58 dos 121. Dos outros 63, cinco não estão classificados, 7 encaixam-se na categoria de divisão celular, 5 em sinalização, 2 em estrutura celular, 14 estão relacionados ao metabolismo e a grande maioria pertence à categoria de genes relacionados aos processos de síntese protéica, sendo que do total de 30 genes deste grupo, 21 representam proteínas ribossomais. Excluídos os genes não identificados, os demais estão listados na Tabela 8, classificados quanto à função/subfunção e com indicação de sua localização nos *clusters* da Figura 16.

Numa primeira análise desta distribuição funcional, nota-se que dos genes selecionados pelos critérios descritos acima, todos aqueles associados aos processos de defesa celular e síntese de RNA estão relacionados na Tabela 7, isto é, foram induzidos pela limitação de O₂. Em contrapartida, todos aqueles relacionados com sinalização celular e síntese protéica são encontrados apenas entre os genes reprimidos (Tabela 8).

Frente às condições limitantes impostas ao organismo pelo experimento, a ativação de genes relacionados com a defesa celular (cujas subfunções incluem processos ligados à detoxificação e resposta ao stress) é uma medida com significado biológico evidente, e portanto, é realmente de se esperar que genes com funções relacionadas encontrem-se induzidos nesta situação. Como exemplo, pode-se encontrar neste grupo uma proteína de choque térmico, função relacionada com a resposta ao stress.

Figura 16 – Genes de *T. reesei* diferencialmente expressos sob condições limitantes de oxigênio. Do total de genes representados nos *microarrays*, 330 foram significativamente afetados pela limitação de O₂ ($P < 0,05$). Destes, 265 tiveram os níveis de expressão alterados em pelo menos 3 vezes com relação à condição referência (R) e foram agrupados pelo método de SOM, nos *clusters* numerados de c0 a c14. O número de genes induzidos e reprimidos, de acordo com sua classificação funcional, está indicado.

Quanto aos genes relacionados com síntese de RNA, nota-se a indução da RNA polimerase II, de dois fatores de transcrição e de duas proteínas relacionadas com o processamento de RNA. Neste caso é provável que um nível mais elevado destas proteínas esteja sendo necessário para assegurar a transcrição dos inúmeros genes ativados pela condição imposta ao organismo. Neste ponto, a atenção se volta para os genes relacionados com síntese protéica, encontrados apenas entre aqueles que estão reprimidos (Tabela 8). Nesta categoria encontram-se genes para 21 proteínas ribossomais, um relacionado com modificação pós-traducional, um com a síntese de tRNA e dois que codificam fatores de tradução. Entretanto, neste mesmo grupo de genes reprimidos encontram-se cinco associados com a renovação protéica (“turnover”). Assim, o que se pode aventar é que, apesar da redução de mRNAs de genes relacionados com o processo de síntese protéica, os níveis já existentes das proteínas relacionadas com este processo permaneceriam em patamares suficientes para a manutenção de atividades celulares essenciais. A confirmação desta hipótese só seria possível com a análise dos níveis de proteínas específicas envolvidas com a tradução.

Com relação aos genes relacionados com sinalização celular, presentes apenas entre os induzidos pela limitação de O₂, três deles supostamente codificam proteínas transportadoras ou canais de membrana e dois codificam proteínas de sinalização intracelular. Um estudo mais detalhado das funções biológicas específicas de cada uma destas proteínas seria necessário para se concluir algo a respeito do comportamento transcricional observado. No enfoque de estudos dessa natureza, contudo, dever-se-ia considerar que na falta de uma alternativa ao metabolismo aeróbico, espera-se que todos os ajustes realizados na rede metabólica de *T. reesei* em condições limitantes de oxigênio devam visar redução do consumo de energia e de processos não essenciais. Um bom exemplo disto talvez seja a repressão de sete genes relacionados com processos de divisão celular, sendo que apenas um gene desta categoria encontra-se relacionado entre aqueles que foram induzidos (Tabela 7). É notável, entretanto, que neste único caso, o ortólogo deste gene em *Aspergillus nidulans* codifica uma proteína essencial para o processo de esporulação, que se constitui um meio de preservação/proteção do organismo em condições nutricionais adversas (Liu & Morris, 2000). Tal informação justifica o comportamento transcricional verificado para este gene e sua presença no meio daqueles relativamente mais expressos.

Tabela 7 – Genes de *T. reesei* induzidos pela limitação de oxigênio

FUNÇÃO - SUBFUNÇÃO	IDENTIFICAÇÃO (clone - identidade)	CLUSTER
Defesa celular - Detoxificação	2590 - rehydriin protein homolog - yeast (Candida albicans)	0
Defesa celular - Detoxificação	2974 - (AL513410) probable SnodProt1 PRECURSOR [Neurospora crassa]	1
Defesa celular - Detoxificação	0803 - monoxygenase	5
Defesa celular - Resposta ao stress	0013 - (AF362390) heat shock protein Hsp104 [Candida albicans]	0
Defesa celular - Resposta ao stress	14H10 - (GI:12802355) Emericella nidulans thioredoxin and Saccharomyces cerevisiae Trx1p	0
Defesa celular - Resposta ao stress	0004 - (AF362390) heat shock protein Hsp104 [Candida albicans]	6
Defesa celular - Resposta ao stress	0074 - probable proteinase subunit - fission yeast (Schizosaccharomyces pombe)	6
Divisão celular - Ciclo celular	1904 - putative (GI:3236453) Emericella nidulans SNAD (snad) mRNA (2e-06; score 46)	1
Estrutura celular - Parede celular	3572 - soluble cell wall protein	3
Estrutura celular - Citoesqueleto	15F04 - Actin, gamma	4
Metabolismo - Açúcares / glicólise	0680 - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3
Metabolismo - Açúcares / glicólise	0111 - (AF387300) NADP-dependent mannitol dehydrogenase [Cladosporium fulvum]	6
Metabolismo - Energia / TCA	ATP6	0
Metabolismo - Energia / TCA	1365 - cytochrome c549	1
Metabolismo - Energia / TCA	3555 - nadh-ubiquinone oxidoreductase	3
Metabolismo - Energia / TCA	3734 - (AB016807) flavohemoglobin [Fusarium oxysporum]	4
Metabolismo - Energia / TCA	3975 - (AJ290969) alternative oxidase [Podospira anserina]	4
Metabolismo - Energia / TCA	2977 - (NC_003424) pyruvate decarboxylase [Schizosaccharomyces pombe]	4
Metabolismo - Energia / TCA	3950 - pyruvate decarboxylase	7
Metabolismo - Lipídios	4208 - (NC_003424) putative fatty acid hydroxylase [Schizosaccharomyces pombe]	1
Metabolismo - Lipídios	4057 - related to SREBP cleavage activating protein	2
Metabolismo - Lipídios	4280 - (NC_003424) c-5 sterol desaturase [Schizosaccharomyces pombe]	4
Metabolismo - Lipídios	2547 - enoyl-coa hydratase	7
Metabolismo - Transporte	HXT1- high-affinity hexose transporter	7

Tabela 7 – Genes de *T. reesei* induzidos pela limitação de oxigênio - continuação

Síntese de RNA - Fatores de transcrição	4080 - (AJ251521) putative transcription factor [<i>Acremonium chrysogenum</i>]	0
Síntese de RNA - Fatores de transcrição	0314 - ATF/CREB-family transcription factor atf21 - fission yeast (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	7
Síntese de RNA - Processamento	3619 - (GI:18376101) similarity to rRNA processing protein, YDL111c, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
Síntese de RNA - Processamento	4276 - atp-dependent rna helicase	3
Síntese de RNA - RNA polimerases	1086 - rna polymerase II subunit	4
Não classificado	26C12 - (NC_003424) CDP-alcohol phosphatidyltransferase [<i>Schizosaccharomyces pombe</i>]	0
Não classificado	1935 - reductase	1
Não classificado	3492 - (AF072709) putative oxidoreductase [<i>Streptomyces lividans</i>]	3
Não classificado	3621 - putative (GI:18420014) glutamate hydroxyepitidase (7e-14; score 66) <i>Arabidopsis thaliana</i>	4
Não classificado	1116 - putative (GI:21902204) <i>Hypocrea virens</i> nonribosomal peptide synthetase (tex1) gene	4
Não classificado	1661 - contains putative Serine/Threonine protein kinases active-site signature (<i>S. cerevisiae</i>)	4
Não classificado	3142 - putative n-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase	5
Não classificado	2324 - acetate kinase (acetokinase)	6
Não classificado	0331 - yju2p	7

Tabela 8 – Genes de *T. reesei* reprimidos pela limitação de oxigênio

FUNÇÃO - SUBFUNÇÃO	IDENTIFICAÇÃO (clone - identidade)	CLUSTER
Divisão celular – Ciclo celular	4128 - cell division control protein 48	8
Divisão celular – Ciclo celular	2012 - sit4 suppressor, dnaJ homolog; Sis1p [Saccharomyces cerevisiae]	10
Divisão celular – Ciclo celular	1624 - (AF421549) CDH1-D [Gallus gallus]	10
Divisão celular – Estrut. de cromossomo	2858 - putative histone H4 (refer to GI:1121218 Mortierella alpina histone H3.2 and H4.2 genes)	9
Divisão celular – Estrut. de cromossomo	1561 - Histone H3	9
Divisão celular – Estrut. de cromossomo	07C05 - (AY062171) histone H2A [Neurospora crassa]	9
Divisão celular – Estrut. de cromossomo	2090 - Histone H2B	10
Sinalização - Canais / transporte	0358 - putative (GI:1302583) FRE4 (ferric-chelate reductase activity) (S.cerevisiae) 4e-06 (Score 44)	8
Sinalização - Canais / transporte	0089 - (AL590605) putative membrane transporter [Schizosaccharomyces pombe]	10
Sinalização - Canais / transporte	0901 - putative (GI:5139349) cfl1 ferric reductase (C.albicans) 1e-09 (Score 69)	12
Sinalização - Sinalizador intracelular	2439 - (AF338871) rho GTPase; RhoA [Aspergillus nidulans]	8
Sinalização - Sinalizador intracelular	1273 - 14-3-3 protein homolog	10
Estrutura celular - Parede celular	33C03 - (AL670005) Chitin Synthase 1 (chs-1) [Neurospora crassa]	8
Estrutura celular - Parede celular	16G09 - (AF450092) extracellular matrix protein precursor [Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici]	9

Tabela 8 – Genes de *T. reesei* reprimidos pela limitação de oxigênio - continuação

Metabolismo - Açúcares / glicólise	0264 - aldehyde dehydrogenase	9
Metabolismo - Açúcares / glicólise	35A11 - (AY081178) mannitol-1-phosphate dehydrogenase [Aspergillus niger]	10
Metabolismo - Açúcares / glicólise	3422 - glucan 1,4-alpha-glucosidase [imported] - Neurospora crassa	14
Metabolismo - Aminoácidos	0127 - s-adenosylmethionine synthetase	8
Metabolismo - Aminoácidos	15E12 - putative (GI:9858834) Neurospora sitophila NADP-specific glutamate dehydrogenase	9
Metabolismo - Aminoácidos	21C05 - (AF275676) cobalamin-independent methionine synthase [Aspergillus nidulans]	10
Metabolismo - Cofator	0231 - pyridoxine biosynthesis protein pdx1 [imported] - Cercospora nicotianae	10
Metabolismo - Energia / TCA	0169 - malate dehydrogenase	8
Metabolismo - Energia / TCA	4311 - atp synthase protein 9	8
Metabolismo - Energia / TCA	16G08 - (AJ243817) ATP citrate lyase, subunit 2 [Sordaria macrospora]	8
Metabolismo - Energia / TCA	2353 - acetyl-coenzyme A synthetase	10
Metabolismo - Transporte	0714 - probable V-ATPase, 20K chain [imported] - Neurospora crassa	9
Metabolismo - Transporte	0793 - peptide transporter ptr2-a	10
Metabolismo - Transporte	06E06 - (Z83828) AmMst-1 [Amanita muscaria]	11
Síntese protéica - Fator de tradução	3417 - (AB001574) SUI1 homologue [Schizosaccharomyces pombe]	11
Síntese protéica - Fator de tradução	0630 - eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 (eif-3 beta)	8
Síntese protéica - Modificação pós-traducional / endereçamento	2457 - peptidylprolyl isomerase (EC 5.2.1.8) A precursor, mitochondrial - cyclosporin fungus	9
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	2015 - 60s ribosomal protein l7-c	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	2843 - 40S ribosomal protein S4	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	43A11 - (GI:15638979) 60S ribosomal protein L37A (2e-12; score 78) Branchiostoma belcheri	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	3432 - 60s ribosomal protein l2	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	08A11 - putative (GI:2737907) ribosomal protein (crps-7) gene (1e-15; score 89) Neurospora crassa	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	3628 - ribosomal protein l2a (l5a) (rp8) (y16)	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	12E02 - (NC_003423) 60s ribosomal protein l7-c. [Schizosaccharomyces pombe]	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	3506 - 60s ribosomal protein l12	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	2163 - ribosomal protein s28	8

Tabela 8 – Genes de *T. reesei* reprimidos pela limitação de oxigênio - continuação

Síntese protéica - Proteínas ribossomais	2322 - 40S ribosomal protein S9 (S7)	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	0681 - (AF198447) 60S ribosomal protein L3 [Aspergillus nidulans]	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	1844 - putative ribosomal protein L32e (2e-10; score 67) (emb AL033391.1 CAC20C1 C.albicans)	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	2663 - (AF401567) ribosomal protein L13 [Ictalurus punctatus]	8
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	1758 - 60S ACIDIC RIBOSOMAL PROTEIN P2	9
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	3716 - ribosomal protein l3 (rp1) (y11)	10
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	28A06 - (NC_001134) mitochondrial ribosomal protein S9; Mrps9p [Saccharomyces cerevisiae]	10
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	12D07 - (NC_001147) Homology to rat L18a; Rpl20bp [Saccharomyces cerevisiae]	13
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	22F11 - 40S ribosomal protein S7	13
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	3413 - ribosomal protein L23 - human	13
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	3031 - (GI:18496630) mitochondrial ribosomal RNA large subunit (Hypocrea jecorina)	11
Síntese protéica - Proteínas ribossomais	2492 - probable ribosomal protein Rps8bp [imported] - Neurospora crassa	11
Síntese protéica - Renovação protéica	07H02 - (AJ319745) serine protease 2 [Pyrenopeziza brassicae]	9
Síntese protéica - Renovação protéica	0041 - vacuolar protease a precursor	9
Síntese protéica - Renovação protéica	4013 - (AB051820) carboxypeptidase [Aspergillus nidulans]	9
Síntese protéica - Renovação protéica	3560 - secreted aspartic protease 4	9
Síntese protéica - Renovação protéica	2912 - aminopeptidase II (yscII)	11
Síntese protéica - Síntese de tRNA	15E06 - (NC_003424) glutamyl-trna synthetase, cytoplasmic [Schizosaccharomyces pombe]	13
Não classificado	1000 - hypothetical protein	8
Não classificado	33B01 - (NM_118880) putative protein; protein id: At4g27450.1	9
Não classificado	3280 - hypothetical protein	11
Não classificado	2626 - probable xylulose-5-phosphate/fructose-6-phosphate phosphoketolase	14
Não classificado	0174 - (NC_000911) hypothetical protein [Synechocystis sp. PCC 6803]	14

5.3.4 – Genes do metabolismo primário de produção de energia

Nas seções iniciais desta tese, oxigênio foi destacado como um composto que exerce papel fundamental no metabolismo de produção de energia em praticamente todos os organismos, incluindo anaeróbios facultativos como *S. cerevisiae*. Por este motivo, é de extrema importância que estes organismos tenham como modular e re-programar funções essenciais de seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de oxigênio.

Para promover adaptações a condições distintas, vários genes envolvidos no metabolismo energético (composto por inúmeras vias) devem ser induzidos, enquanto outros tantos devem ser reprimidos. Assim, parece natural que aqueles genes classificados sob a categoria funcional “Metabolismo” estejam igualmente distribuídos entre as Tabelas 7 e 8, com 14 induzidos e 14 reprimidos (ainda que o valor numérico não deva ser mais do que pura coincidência).

Entre aqueles induzidos, merecem destaque os que codificam enzimas da via glicolítica (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e da via alternativa do metabolismo de piruvato (piruvato descarboxilase). Em condições limitantes de oxigênio, a ativação de genes destas duas vias em *Trichoderma* pode significar a conservação de mecanismos regulatórios que, em organismos unicelulares como *S. cerevisiae*, desviam eficientemente para o metabolismo anaeróbico os carbonos originados da glicose. Porém, como já demonstrado anteriormente, neste fungo este desvio parece não ocorrer. Em função destas observações, independentemente dos critérios de seleção descritos anteriormente, aplicados para identificar aqueles genes que sob condições limitantes de oxigênio apresentaram grande variação em seus níveis transcricionais, decidiu-se analisar individualmente nos *microarrays* o comportamento de todos os genes relacionados ao metabolismo primário de produção de energia.

Tendo em vista que *T. reesei* apresenta metabolismo estritamente aeróbico, nesta análise o critério utilizado foi verificar o comportamento transcricional daqueles genes de interesse apenas na fase do experimento caracterizado como condição de hipóxia. Assim, para cada gene analisado, verificaram-se as abundâncias relativas dos transcritos nas concentrações de O₂ iguais a 1,0; 0,5; 0,2 e 0,1 mg/L. Como já mencionado anteriormente, ainda que neste último ponto tenha se verificado o início de acúmulo de glicose no meio, a condição foi igualmente tratada como hipóxia, visto que os eletrodos ainda podiam detectar a presença de oxigênio e, mesmo diminuído, ainda se verificava o consumo de glicose.

Os resultados destas análises estão esquematizados na Figura 17 que, em primeira instância, indica uma desaceleração generalizada do metabolismo aeróbico em *T. reesei* quando oxigênio se torna um fator limitante. A evidente diminuição na abundância relativa dos transcritos de enzimas do TCA, por exemplo, é indício da modulação negativa que deve ocorrer no metabolismo energético deste fungo para que ele possa se adequar a uma condição em que a capacidade de produção de energia é limitada. Talvez seja em função disto que as enzimas piruvato descarboxilase (PDC) e acetil-CoA sintetase (ACS) se encontrem, respectivamente, induzida e reprimida. Como sugerido previamente, este comportamento poderia refletir uma “memória evolutiva” (ou resquício) do mecanismo que na falta de oxigênio redireciona as moléculas de piruvato para o metabolismo anaeróbico. Em *K. lactis*, por exemplo, a expressão de piruvato descarboxilase é induzida em nível transcricional por baixas concentrações de O₂ e por glicose (Kiers, *et al.*, 1998). Ainda assim, apesar dos níveis consideráveis desta enzima e da álcool desidrogenase, na presença de oxigênio aquela levedura não produz etanol, o que parece estar associado à presença inibitória do complexo piruvato desidrogenase, favorecendo a formação de acetil-CoA (Breuning, *et al.*, 2000).

Assim, tendo em vista que na análise de *microarrays* estão sendo analisadas abundâncias relativas de transcritos frente a uma condição de referência, a repressão do TCA observada em *T. reesei* na condição de hipóxia não necessariamente significa o bloqueio desta via. Muito provavelmente, o efeito que se esperaria verificar neste caso é uma redução no fluxo de metabólitos que seguem por este caminho.

Apesar disto, nota-se que a porção da via glicolítica abaixo de gliceraldeído-3-fosfato (GA-3-P) praticamente não é afetada ou é até ligeiramente induzida, conforme indica o comportamento transcricional verificado para genes das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TDH) e enolase (ENO). Embora os níveis de transcritos para frutose-bisfosfato aldolase (FBA) e triose-fosfato isomerase (TPI) estejam diminuídos, o fluxo de glicose pela via glicolítica poderia se dar pelas reações da via das pentoses-fosfato, que podem assumir a função dos primeiros passos da glicólise (Jacoby, *et al.*, 1993) visto que a expressão de glicose-6-fosfato desidrogenase (ZWF), transaldolase (TAL) e transcetolase (TKL) é ligeiramente aumentada.

Figura 17 – Expressão de genes do metabolismo primário de *T. reesei* em condição de hipóxia. Em tons de vermelho e verde estão indicados genes que tiveram os níveis de transcrição aumentados e diminuídos, respectivamente. A intensidade das cores representa o grau de indução e/ou repressão. Em branco estão representados genes cuja expressão não foi afetada e em amarelo aqueles que não estão presentes no banco de ESTs de *T. reesei*. Estão destacadas a via glicolítica (cinza), a via das pentoses-fosfato (azul) e o TCA (laranja).

5.3.5 – Genes mitocondriais

De maneira geral, o comportamento transcricional de genes mitocondriais, codificados tanto pelo núcleo como pelo mtDNA, não sofre grandes variações, mas todo o tipo de tendência pode ser verificado. Na condição de hipóxia, entre os transcritos codificados pelo genoma mitocondrial é possível encontrar alguns com seus níveis inalterados, como ATP8, ATP9, CYTB, e ND2 e outros que são parcialmente reprimidos, como no caso de COX1, COX2, COX6, ND1 e ND3. Vários genes nucleares que codificam proteínas mitocondriais também se encontram relativamente reprimidos, como ocorre com aqueles que originam as cadeias alfa, beta e delta da ATP sintase e COX6. No entanto, alguns dos genes codificados pelo núcleo apresentem-se induzidos, como é o caso das subunidades COX6b e COX11 e de uma NADH-ubiquinona oxidoreductase e uma oxidase alternativa.

Vale aqui recordar que o complexo enzimático citocromo *c* oxidase (COX) é apontado como um provável sensor da disponibilidade de oxigênio (v. seção 2.2.3). Em *S. cerevisiae*, O₂ afeta a expressão da grande maioria das subunidades deste complexo em nível transcricional, enquanto alguns são afetados pós-transcionalmente (COX1 e 2) (Dagsgaard *et al.*, 2001). Com exceção do gene que codifica COX5b que é induzido por baixas concentrações de oxigênio, todos os demais são aeróbicos, ou seja, expressos otimamente em condição de normóxia e reprimidos em hipóxia/anóxia (Poyton, 1999; Dagsgaard *et al.*, 2001).

Apesar dos diferentes comportamentos transcricionais verificados entre os genes mitocondriais de *T. reesei*, o conjunto das tendências, tanto para estes genes quanto daqueles relacionados ao metabolismo primário (discutidos na seção anterior) guarda uma boa correlação com o que se observa em análises de *microarrays* realizadas com *S. cerevisiae* submetida à condição de anóxia (Kwast, *et al.*, 2002). Excetuando-se o fato de a limitação de oxigênio não levar à produção de etanol neste fungo, verifica-se nos dois organismos a tendência de repressão transcricional dos genes relacionados ao TCA e cadeia respiratória e indução (ou manutenção) dos níveis transcricionais de genes que codificam enzimas da via glicolítica.

5.3.6 – Genes não identificados

De acordo com os dados apresentados na seção 5.3.2, das 1856 seqüências representadas nos *microarrays*, 1180 são relativas a genes não identificados. Isto significa que aqueles genes classificados como “*No matches*” constituem mais de 60 %

dos ESTs de *T. reesei* disponíveis até o momento. Somente entre os 265 genes selecionados por apresentarem variação maior do que 3 vezes nos níveis transcricionais (seção 5.3.3) existem 164 não identificados (106 induzidos e 58 reprimidos).

Estes valores apontam para a necessidade de investigações mais aprofundadas a respeito da função de seus produtos e da análise do papel que eles possam vir a exercer na regulação do metabolismo, frente a diferentes disponibilidades de O₂ e glicose. Estudos neste sentido poderiam ser significativos para a elucidação de mecanismos envolvidos nos processos que sinalizam a disponibilidade destes compostos, bem como das regulações metabólicas desencadeadas por eles. Exemplos de abordagens que poderiam ser utilizadas nestes estudos consistem no “nocaute” de alguns destes genes para verificações fenotípicas e análises de *microarrays* em condições variadas de disponibilidade de O₂ e glicose ou, ainda, no seqüenciamento dos promotores destes genes para tentar identificar regiões-consenso, alvos potenciais de fatores de transcrição (com funções já conhecidas ou não) envolvidos na resposta aos níveis de oxigênio e glicose.

A identificação de novos genes que em *T. reesei* respondem às diferentes tensões de O₂ poderia, eventualmente, aumentar as chances de se identificarem redes regulatórias compartilhadas por diferentes organismos. Com isso, poderiam surgir informações que ajudassem a fechar lacunas ainda existentes dentro do que já se conhece dos mecanismos regulatórios afetados por oxigênio.

5.3.7 – Fatores de regulação da transcrição

Um aspecto muito interessante da tecnologia de *microarrays* está na possibilidade de se identificar, de uma só vez, vários genes que não apenas se mostram afetados pelas condições experimentais estudadas, mas que podem ser, eles mesmos, potenciais reguladores da expressão de vários outros genes responsivos a estas condições. Candidatos naturais a exercer tal papel são as proteínas classificadas como fatores e co-fatores de transcrição.

Entre os 1856 genes de *T. reesei* destacam-se cinco que codificam produtos que exercem tais funções e que foram afetados pela limitação de oxigênio. Um destes genes tem como produto um ortólogo de BTF3, uma proteína muito conservada em eucariotos, primeiramente identificada em células HeLa (Zheng *et al.*, 1987; Potashkin *et al.*, 1996). Diferentes funções são atribuídas a esta proteína, que faz parte de um complexo que se liga a polipeptídios nascentes (NAC – *nascent polypeptide-associated*

complex), ao DNA e também interage com a RNA polimerase II. BTF3 já foi relacionada com o endereçamento de proteínas para o retículo endoplasmático e mitocôndria, com o processo de morte celular programada (apoptose) e à repressão de vários genes (George *et al.*, 1998; Brockstedt *et al.*, 1999; Hu & Ronne, 1994; Whitby & Dixon, 2001).

O fator de transcrição PACC é uma proteína do tipo *zinc-finger*, que no fungo filamentosso *Acremonium chrysogenum* está relacionada com a regulação transcricional de genes envolvidos com a biossíntese de cefalosporina C (Schmitt *et al.*, 2001).

Foi também identificada uma proteína da família ATF/CREB, do tipo “zíper de leucina” (bZIP) que se liga a regiões do DNA responsivas a níveis de cAMP (CRE – *cAMP responsive elements*). Em *S. cerevisiae*, o repressor SKO1, desta família, interage com Mig1 e está ligado à repressão por glicose da enzima invertase (SUC2) (Nehlin *et al.*, 1992).

As duas últimas proteínas com atividades regulatórias são MBF1 (*Multiprotein bridging factor-1*) e SCAP (SREBP *cleavage-activating protein*, SREBP designando *sterol regulatory element binding proteins*). A primeira é um co-fator também muito conservado em diferentes espécies e que age como uma ponte, promovendo a interação de diferentes receptores nucleares com a maquinaria basal de transcrição. Em humanos MBF1 está relacionada com regulação do metabolismo de lipídios (Brendel *et al.*, 2002). A segunda é uma proteína de membrana que, em mamíferos, funciona como sensor de esteróis e conduz SREBPs ao complexo de Golgi, onde são clivadas e liberam domínios transcionalmente ativos que migram para o núcleo e induzem genes envolvidos com a captação e síntese de colesterol (Goldstein *et al.*, 2002; DeBose-Boyd *et al.*, 1999; Nohturfft *et al.*, 2000).

Sob condições de limitação de oxigênio, o comportamento transcricional apresentado pelos genes que codificam estas cinco proteínas reguladoras está ilustrado na Figura 18. De todos, nota-se que o mais afetado é o gene que codifica a proteína SCAP, que sofre forte indução desde as primeiras reduções nos níveis de oxigênio até a condição de anóxia. Entretanto, com a retomada da aeração este efeito parece ser prontamente revertido. O gene que codifica ATF21 (da família ATF/CREB) sofre uma indução mais moderada, verificada principalmente na região de anóxia. É interessante notar que em levedura esta proteína está ligada ao efeito de repressão por glicose e que, no caso de *Trichoderma*, sua indução acompanha o acúmulo de glicose no meio pelo menos até o ponto anterior à retomada da aeração, quando se verifica o efeito contrário.

Tendo glicose como parâmetro, torna-se difícil compreender o porquê da repressão quando níveis deste açúcar encontram-se próximos de 30 mM. Isto reforça o fato de que neste experimento o comportamento transcricional não pode ser encarado como um efeito exclusivo da concentração de oxigênio, nem tampouco de glicose, visto que ambos são variáveis do sistema. Também o gene do fator PACC apresenta-se ligeiramente induzido em anóxia, mas o efeito é bem mais pronunciado quando oxigênio é novamente fornecido.

Já os fatores de transcrição BTF3 e MBF1 encontram-se bem reprimidos na condição de anóxia e isto pode ser notado, inclusive, pelos *Northern blots* feitos para fins da validação (v. Figura 15).

Dada a importância destes elementos com grande potencial para exercer ações reguladoras, estudos posteriores a respeito destas proteínas deverão consistir em identificar experimentalmente as funções que elas exercem no metabolismo de *T. reesei*, com especial ênfase sobre os efeitos de glicose e oxigênio. Também aqui, o emprego de nocaute gênico e análises por *microarrays* podem ser utilizados.

Figura 18 – Expressão de genes que codificam fatores e co-fatores de transcrição. Estão apresentados os perfis de expressão em condições de limitação de oxigênio de cinco reguladores de transcrição encontrados no banco de ESTs de *T. reesei*. R indica concentração de O₂ = 5 mg/L. A condição de hipóxia está destacada em amarelo e a de anóxia em azul.

6 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesta tese são apresentados os resultados de estudos que abordam efeitos das diferentes concentrações de glicose e oxigênio sobre a expressão gênica e o metabolismo primário de produção de energia do fungo filamentoso *Trichoderma reesei*.

O trabalho apresenta a sequência completa do genoma mitocondrial deste fungo, com sua estrutura e organização. De posse desta informação, o comportamento transcricional dos genes codificados pelo mtDNA pôde ser avaliado em resposta a diferentes condições metabólicas. Foi inicialmente verificado que os transcritos mitocondriais praticamente não são afetados por glicose e poucos têm seus níveis ligeiramente diminuídos em concentrações mais elevadas deste açúcar. Porém, a transcrição de nenhum deles chega a ser completamente reprimida nesta condição, levando-nos a concluir que os componentes do genoma mitocondrial de *T. reesei* não estão sujeitos ao efeito de repressão por glicose.

Através de análises de fluxos metabólicos dos carbonos de glicose, também foi possível verificar os efeitos deste substrato sobre capacidade respiratória de *T. reesei*. Com isso, foram confirmados os dados provenientes das análises transcricionais, que realizamos anteriormente. Apesar de ainda terem caráter preliminar, os resultados obtidos a partir da AFM forneceram informações condizentes com aqueles já disponíveis. Assim, fica definitivamente caracterizado que o principal efeito regulatório de glicose em *T. reesei*, responsável pela condução de seus metabólitos através do metabolismo aeróbico, ocorre no nível transcricional.

Com o emprego da tecnologia de *microarrays* de cDNA, o trabalho também identificou vários genes afetados pela disponibilidade de oxigênio. Verificou-se, em vários casos, uma perfeita correlação entre o comportamento transcricional e a função celular desempenhada pelos produtos de genes diferencialmente afetados, possibilitando agrupá-los em categorias funcionais. Isto abre caminho para estudos de aspectos básicos da regulação da expressão gênica, como a localização de elementos-consenso nos promotores destes genes, para então tentar reagrupá-los de acordo com fatores transcricionais que os regulam. Da mesma forma, abre-se caminho para a identificação de fatores de transcrição que atuem como reguladores ou sensores das flutuações de oxigênio.

Finalmente, espera-se que este trabalho possa ajudar a identificar genes que tenham ortólogos com funções correlatas em diferentes organismos. Neste aspecto, foram identificados neste trabalho alguns transcritos afetados pela limitação de oxigênio, com funções já conhecidas até em humanos (BTF3, MBF1 e SCAP são exemplos). Contudo o grande número de ESTs de genes desconhecidos representa um potencial para novas descobertas.

Como desafio futuro, é do interesse de nosso laboratório realizar nocaute de genes com este potencial e tentar desvendar suas funções, estudando os mutantes, por exemplo, por meio de novas análises de *microarrays*.

7 – BIBLIOGRAFIA

- Abrahão-Neto, J., Rossini, C.H.B., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Crivellaro, O., El-Dorry, H. (1995) Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* **34**,10456-62.
- Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E. (1999) Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**,2926-33.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**,3389-402.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M. (1993) Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**,7915-22.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**,457-65.
- Attardi, G., Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**,289-333.
- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. (1992) *Short Protocols in Molecular Biology. 2.ed. A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. New York.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W., Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**,25-31.
- Béguin, P., Aubert, J.P. (1994) The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**,25-58.
- Béguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annu. Rev. Microbiol.* **44**,219-48.
- Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J. (1997) GenBank. *Nucl. Acids Res.* **25**,1-6.
- Bereiter-Hahn, J., Voth, M. (1994) Dynamics of mitochondria in living cells: shape changes, dislocations, fusion, and fission of mitochondria. *Microsc. Res. Tech.* **27**,198-219.
- Biely, P., Tenkanen, M. (1998) Enzymology of hemicellulose degradation. In *Trichoderma & Gliocladium*. v.2. Gary E. Harman & Christian P. Kubicek (eds). Taylor & Francis, London.
- Bolar, J., Norelli, J. L., Wong, K.-W., Hayes, C. K., Harman, G. E., Aldwinckle, H. S. (2000) Increased resistance to scab of endochitinase transgenic McIntosh apple lines. *Phytopathology* **90**, 72-77.
- Brendel, C., Gelman, L., Auwerx, J. (2002) Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a cofactor for nuclear receptors that regulate lipid metabolism. *Mol. Endocrinol.* **16**,1367-77.

- Breunig, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wésolowski-Louvel, M., Zeeman, A.M. (2000) Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* **26**, 771-780.
- Brockstedt, E., Otto, A., Rickers, A., Bommert, K., Wittmann-Liebold, B. (1999) Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein. Chem.* **18**,225-31.
- Bunn, H.F., Gu, J., Huang, L.E., Park, J.W., Zhu, H. (1998) Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *J. Exp. Biol.* **201**,1197-201.
- Bunn, H.F., Poyton, R.O. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.*, **76**,839-885.
- Burke, P.V., Poyton, R.O. (1998) Structure/function of oxygen-regulated isoforms in cytochrome *c* oxidase. *J. Exp. Biol.* **201**,1163-75.
- Calhoun, M.W., Oden, K.L., Gennis, R.B., de Mattos, M.J., Neijssel, O.M. (1993) Energetic efficiency of *Escherichia coli*: effects of mutations in components of the aerobic respiratory chain. *J. Bacteriol.* **175**,3020-5.
- Carle-Urioste, J.C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A., El-Dorry, H. (1997) Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.* **272**,10169-74.
- Carlson, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**,202-7.
- Chambergo, F.S., Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J.S., Ramos, A.S.P., Ferreira Jr., J.R., Abrahão-Neto, J., Farah, J.P.S., El-Dorry, H. (2002) Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using expressed sequence tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J. Biol. Chem.*, **277**,13983-8.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., Schumacker, P.T. (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**,11715-20.
- Chang, Y.-C., Chang, Y.-C., Baker, R. (1986) Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis.* **70**,145-8.
- Christensen, B., Nielsen, J. (1999a) Isotopomer analysis using GC-MS. *Metab. Eng.* **1**,282-90.
- Christensen, B., Nielsen, J. (1999b) Metabolic network analysis, a powerful tool in metabolic engineering. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **66**,209-31.
- Christensen, B., Nielsen, J. (2000) Metabolic network analysis of *Penicillium chrysogenum* using ¹³C-labeled glucose. *Biotechnol. Bioeng.* **68**,652-9.
- Costanzo, M.C., Fox, T.D. (1990) Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **24**,91-113.
- Cuezva, J.M., Krajewska, M., de Heredia, M.L., Krajewski, S., Santamaria, G., Kim, H., Zapata, J.M., Marusawa, H., Chamorro, M., Reed, J.C. (2002) The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression. *Cancer Res.* **15**,6674-81.

- Cziferszky, A., Mach, R.L., Kubicek, C.P. (2002) Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J. Biol. Chem.*, **17**,14688-94.
- Dagsgaard, C., Taylor, L.E., O'Brien, K.M., Poyton, R.O. (2001) Effects of anoxia and the mitochondrion on expression of aerobic nuclear COX genes in yeast: evidence for a signaling pathway from the mitochondrial genome to the nucleus. *J. Biol. Chem.* **276**,7593-601.
- Dang, C.V., Semenza, G.L. (1999) Oncogenic alterations of metabolism. *Trends Biochem Sci.* **24** 68-72.
- Darnel, J., Lodish, H., Baltimore, D. (1990) in *Molecular Cell Biology 2.ed.*, p 686-689, Scientific American Books, New York.
- Daxhelet, G.A., Coene, M.M., Hoet, P.P., Cocito, C.G. (1989) Spectrofluorometry of dyes with DNAs of different base composition and conformation. *Anal. Biochem.* **179**,401-3.
- de Zamaroczy, M., Bernardi, G. (1986) The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae* – a review. *Gene.* **47**,155-77.
- DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L., Espenshade, P.J. (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* **99**,703-12.
- Delsite, R., Kachhap, S., Anbazhagan, R., Gabrielson, E., Singh, K.K. (2002) Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. *Mol. Cancer* **1**,6.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* **278**, 680-6.
- DeVit, M.J., Waddle, J.A., Johnston, M. (1997) Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell.* **8**,1603-18.
- Dowzer, C.E., Kelly, J.M. (1989) Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression. *Curr. Genet.* **15**,457-9.
- Dudoit, S., Yang, Y.H., Callow, M.J., Speed, T.P. (2000) Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical report # 578, (<http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/zarray/Html/matt.html>) (acesso em 25/03/2003)
- El-Gogary, S., Leite, A., Crivellaro, O., Eveleigh, D., El-Dorry, H. (1989) Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in *Trichoderma reesei*. *Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**,6138-41.
- Ewing, B., Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**,186-94.
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**,175-85.
- Ferea, T.L., Botstein, D., Brown, P.O., Rosenzweig, R.F. (1999) Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**,9721-6.
- Fitton, V., Rigoulet, M., Ouhabi, R., Guerin, B. (1994) Mechanistic stoichiometry of yeast mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry.* **16**, 9692-8.
- Forsburg, S. L., Guarente, L. (1989) Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**,153-80.

- Gams, W., Bissett, J. (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium*. v.1 (Christian P. Kubicek & Gary E. Harman, eds), pp. 3-34.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**,334-61.
- Garber, R.C., Yoder, O.C. (1983) Isolation of DNA from filamentous fungi and separation into nuclear, mitochondrial, ribosomal, and plasmid components. *Anal. Biochem.* **135**,416-422.
- George, R., Beddoe, T., Landl, K., Lithgow, T. (1998) The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**,2296-301.
- Goldstein, J.L., Rawson, R.B., Brown, M.S. (2002) Mutant mammalian cells as tools to delineate the sterol regulatory element-binding protein pathway for feedback regulation of lipid synthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**,139-48.
- Gombert, A.K. (2001) Análise de redes metabólicas em *Saccharomyces cerevisiae*. Tese de doutoramento apresentada à Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- Gombert, A.K., Moreira dos Santos, M., Christensen, B., Nielsen, J. (2001) Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *J. Bacteriol.* **183**,1441-51.
- Gombert, A.K., Nielsen, J. (2000) Mathematical modeling of metabolism. *Curr. Opin. Biotechnol.* **11**,180-6.
- Gombert, A.K., Nielsen, J. (2003) Quantification of metabolic fluxes. *Encyclopedia of Life Science* (Em publicação).
- Gordon, D., Abajian, C., Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**,195-202.
- Gray, M.W. (1992) The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* **141**,233-57. *apud* Scheffler, I.E. (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**,3-31.
- Gray, M.W. (1993) Origin and evolution of organelle genomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**,884-90. *apud* Scheffler, I.E. (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**,3-31.
- Gray, M.W., Burger, G., Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* **283**,1476-81.
- Grivell, L.A. (1989) Nucleo-mitochondrial interactions in yeast mitochondrial biogenesis. *Eur. J. Biochem.* **182**,477-93.
- Haran, S., Schickler, H., Chet, I. (1996) Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiology* **142**,2321-31.
- Hardie, D. G., Salt, I. P., Hawley, S. A., Davies, S. P. (1999) AMP-activated protein kinase: an ultrasensitive system for monitoring cellular energy charge. *Biochem. J.* **338**,717-22.
- Harman, G. E., Kubicek, C. P. (1998) *Trichoderma and Gliocladium*. v.2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor & Francis, London. 393p.

- Hendrick, J.P., Hodges, P.E., Rosenberg, L.E. (1989) Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**,4056-60.
- Henriksen, C.M., Christensen, L.H., Nielsen, J., Villadsen, J. (1996) Growth energetics and metabolic fluxes in continuous cultures of *Penicillium chrysogenum*. *J. Biotechnol.* **45**,149-64.
- Henrique-Silva, F., Carraro-Pereira, D., Pereira, G., El-Gogary, S., Carle-Urioste, J., Matheucci Jr., E., Crivellaro, O., El-Dorry, H. (1996) Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**,229-37.
- Herrera-Estrella, A., Goldman, G.H., van Montagu, M., Geremia, R.A. (1993) Electrophoretic karyotype and gene assignment to resolved chromosomes of *Trichoderma* spp. *Mol. Microbiol.* **7**,515-21.
- Hochachka, P.W. (1998) Mechanism and evolution of hypoxia-tolerance in humans. *J. Exp. Biol.* **201**,1243-54.
- Hochachka, P.W., Buck, L.T., Doll, C.J., Land, S.C. (1996) Unifying theory of hypoxia tolerance: molecular/metabolic defense and rescue mechanisms for surviving oxygen lack. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**,9493-8.
- Hu, G.Z., Ronne, H. (1994) Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res.* **22**,2740-3.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M.L., Penttilä, M.E. (1997) Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**,1298-306.
- Ilmén, M., Thrane, C., Penttilä, M. (1996) The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol. Gen. Genet.* **251**,451-60.
- Inderlied, C.B., Sypherd, P.S. (1978) Glucose metabolism and dimorphism in *Mucor*. *J. Bacteriol.* **133**, 1282-6.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997) Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* **275**,1649-52.
- Jacoby, J., Hollenberg, C.P., Heinisch, J.J. (1993) Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Mol. Microbiol.* **10**,867-76.
- Johnson, L.V., Walsh, M.L., Chen, L.B. (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**,990-4.
- Johnston, M. (1999) Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet.* **15**,29-33.
- Kelly, J.M., Drysdale, M.R., Sealy-Lewis, H.M., Jones, I.G., Lockington, R.A. (1990) Alcohol dehydrogenase III in *Aspergillus nidulans* is anaerobically induced and post-transcriptionally regulated. *Mol. Gen. Genet.* **222**,323-8.
- Kiers, J., Zeeman, A.M., Luttik, M., Thiele, C., Castrillo, J.I., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (1998) Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* **14**,459-69.

- Klein, D., Eveleigh, D.E. (1998) Ecology of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium*. v.1. p.57-74. Christian P. Kubicek and Gary E. Harman. eds.
- Koehler, C.M., Merchant, S., Schatz, G. (1999) How membrane protein travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* **24**,428-32.
- Koivula, A., Linder, M., Teeri, T.T. (1998) Structure-function relationships in *Trichoderma* cellulolytic enzymes. In *Trichoderma & Gliocladium*. v.2. Gary E. Harman & Christian P. Kubicek (eds). Taylor & Francis, London.
- Kuhls, K., Lieckfeldt, E., Samuels, G.J., Kovacs, W., Meyer, W., Petrini, O., Gams, W., Borner, T., Kubicek, C.P. (1996) Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**,7755-60.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., Brown, K., Poyton, R.O. (1997) REO1 and ROX1 are alleles of the same gene which encodes a transcriptional repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **32**,377-83.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., Poyton, R.O. (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *J. Exp. Biol.* **201**,1177-95.
- Kwast, K.E., Burke, P.V., Staahl, B.T., Poyton, R.O. (1999) Oxygen sensing in yeast: Evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**,5446-51.
- Kwast, K.E., Lai, L., Menda, N., James III, D.T., Aref, S., Burke, P.V. (2002) Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *J. Bacteriol.* **184**,250-65.
- Lee, W.N., Bergner, E.A., Guo, Z.K. (1992) Mass isotopomer pattern and precursor-product relationship. *Biol. Mass Spectrom.* **21**,114-22.
- Lee, W.N., Byerley, L.O., Bergner, E.A., Edmond, J. (1991) Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. *Biol. Mass Spectrom.* **20**,451-8.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) in *Princípios de Bioquímica*. 2.ed. p28-9, Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., São Paulo, Brasil.
- Liao, X., Butow, R.A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell* **72**,61-71.
- Liao, X., Small, W.C., Srere, P.A., Butow, R.A. (1991) Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**,38-46.
- Liu, B., Morris, N.R. (2000) A spindle pole body-associated protein, SNAD, affects septation and conidiation in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.* **263**,375-87.
- Loontjens, F.G., Regenfuss, P., Zechel, A., Dumortier, L., Clegg, R.M. (1990) Binding characteristics of Hoechst 33258 with calf thymus DNA, poly[d(A-T)], and d(CCGGAATTCCGG): multiple stoichiometries and determination of tight binding with a wide spectrum of site affinities. *Biochemistry* **29**,9029-39.
- Lorito, M., Woo, S. L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Mucciflora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* **95**,7860-5.
- Lowe, T.M., Eddy, S.R. (1997) "tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence". *Nucl. Acids Res.* **25**,955-64.

- Ludin, K., Jiang, R., Carlson, M. (1998) Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**,6245-50.
- Madden, T.L., Tatusov, R.L., Zhang, J. (1996) Applications of network BLAST server. *Methods Enzymol.* **266**,131-41.
- Malloy, C.R., Sherry, A.D., Jeffrey, F.M. (1988) Evaluation of carbon flux and substrate selection through alternate pathways involving the citric acid cycle of the heart by ^{13}C NMR spectroscopy. *J Biol Chem.* **25**, 6964-71. *apud* Wiechert, W., (2001) ^{13}C Metabolic flux analysis. *Metabolic Eng.* **3**,195–206.
- Mandels, M., Reese, E.T. (1957) Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.* **73**,269-78.
- Mäntylä, A., Paloheimo, M., Suominen, P. (1998) Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. In *Trichoderma & Gliocladium*. v.2. Gary E. Harman & Christian P. Kubicek (eds). Taylor & Francis, London.
- Mäntylä, A.L., Rossi, K.H., Vanhanen, S.A., Penttilä, M.E., Suominen, P.L., Nevalainen, K.M. (1992) Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum* (*reesei*) strains. *Curr. Genet.* **21**,471-7.
- Margulis, L. (1981) *Symbiosis in Cell Evolution*. Freeman, San Francisco.
- Masum, H., Oppacher, F. (2001) Regulatory networks and genomic algorithms. In Nagib Callaos, Ivan Nunes da Silva, and Jorge Molero, editors, Proceedings of the World Multiconference on Systemics, Cybernetics and Informatics (SCI 2001/ISAS 2001), vol.3. IIIS, 2001. (carleton.ca/~hmasum/papers/RegulatoryGenomic.pdf).
- Matheucci Jr., E., Henrique-Silva, F., El-Gogary, S., Rossini, C.H.B., Leite, A., Vera, J.E., Urioste, J.C., Crivellaro, O., El-Dorry, H. (1995) Structure, organization and promoter expression of the actin-encoding gene in *Trichoderma reesei*. *Gene*, **161**,103-6.
- Máximo, V., Sobrinho-Simões, M. (2000) Hurthle cell tumours of the thyroid. A review with emphasis on mitochondrial abnormalities with clinical relevance. *Virchows. Arch.* **437**,107-15.
- Mazurek, S., Boschek, C.B., Eigenbrodt, E. (1997) The role of phosphometabolites in cell proliferation, energy metabolism, and tumor therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**,315-30.
- McCammon, M.T., Epstein, C.B., Przybyla-Zawislak, B., McAlister-Henn, L. Butow, R.A. (2003) Global transcription analysis of Krebs tricarboxylic acid cycle mutants reveals an alternating pattern of gene expression and effects on hypoxic and oxidative genes. *Mol Biol Cell.* **14**, 958-72.
- Meijer, M.M.C., Boonstra, J., Verkleij, A.J., Verrips, C.T. (1998) Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *J. Biol. Chem.* **273**,24102-7.
- Mulder, W., Scholten, I.H., Grivell, L.A. (1995) Carbon catabolite regulation of transcription of nuclear genes coding for mitochondrial proteins in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Genet.* **28**,267-73.
- Muller, S., Boles, E., May, M., Zimmermann, F.K. (1995) Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**,4517-19.

- Nass, S., Nass, M.M.K. (1963) Ultramitochondrial fibers with DNA characteristics. *J. Cell. Biol.* **19**,593-629. *apud* Scheffler, I.E. (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**,3-31.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M., Ronne, H. (1992) Yeast SKO1 gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription. *Nucleic Acids Res.* **20**,5271-8.
- Newcomb, L.L., Diderich, J.A., Slattery, M.G., Heideman, W. (2003) Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryot. Cell* **2**,143-9.
- Nidetzky, B., Hayn, M., Macarron, R., Steiner, W. (1993) Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. *Biotechnol. Lett.* **15**,71-6.
- Nidetzky, B., Steiner, W., Claeysens, M. (1994) Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochem J.* **1**,817-23.
- Nohturfft, A., Yabe, D., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Espenshade, P.J. (2000) Regulated step in cholesterol feedback localized to budding of SCAP from ER membranes. *Cell* **102**,315-23.
- Östling, J., Carlberg, M., Ronne, H. (1996) Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell. Biol.* **16**,753-61.
- Özcan, S., Dover, J., Johnston, M. (1998) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**,2566-73.
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wolfl, S., Johnston, M. (1996) Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**,12428-32.
- Özcan, S., Johnston, M. (1995) Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol. Cell. Biol.* **15**,1564-72.
- Parikh, V.S., Morgan, M.M., Scott, R., Clements, L.S., Butow, R.A. (1987) The mitochondrial genotype can influence nuclear genes expression in yeast. *Science* **235**,576-80.
- Pedersen, H., Christensen, B., Hjort, C., Nielsen, J. (2000) Construction and characterization of an oxalic acid nonproducing strain of *Aspergillus niger*. *Metab. Eng.* **2**,34-41.
- Pedersen, P.S., Frederiksen, O., Holstein-Rathlou, N.H., Larsen, P.L., Qvortrup, K. (1999) Ion transport in epithelial spheroids derived from human airway cells. *Am. J. Physiol.* **276**,L75-80.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., Bonhoeffer, S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science* **292**,504-7.
- Polyak, K., Li, Y., Zhu, H., Lengauer, C., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Trush, M.A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1998) Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet.* **20**, 291-3.
- Potashkin, J., Wentz-Hunter, K., Callaci, J. (1996) BTF3 is evolutionarily conserved in fission yeast. *Biochim. Biophys. Acta.* **1308**,182-4.
- Poyton, R.O. (1999) Models for oxygen sensing in yeast: implications for oxygen-regulated gene expression in higher eucaryotes. *Respir. Physiol.* **115**,119-33.
- Poyton, R.O., McEwen, J.E. (1996). Crosstalk Between Nuclear and Mitochondrial Genomes. *Annu. Rev. Biochem.* **65**,563-607.

- Ratcliffe, P.J., O'Rourke, J.F., Maxwell, P.H., Pugh, C.W. (1998) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factor-1 and the regulation of mammalian gene expression. *J. Exp. Biol.* **201**,1153-62.
- Rogers, P.J., Clark-Walker, G.D., Stewart, P.R. (1974) Effects of oxygen and glucose on energy metabolism and dimorphism of *Mucor genevensis* grown in continuous culture: reversibility of yeast-mycelium conversion. *J. Bacteriol.*, **119**, 282-93.
- Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* **11**,12-17.
- Ruijter, G.J.G., Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **151**,103-14.
- Sambrook, J., Frisch, E.F., Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3.v. Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samuel, D. (1996) Investigation of ancient Egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science* **273**,488-90.
- Samuels, G.J. (1996) *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycology Research*, **100**,923-35.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**,5463-7.
- Sauer, U., Lasko, D.R., Fiaux, J., Hochuli, M., Glaser, R., Szyperski, T., Wuthrich, K., Bailey, J.E. (1999) Metabolic flux ratio analysis of genetic and environmental modulations of *Escherichia coli* central carbon metabolism. *J. Bacteriol.* **181**,6679-88.
- Schatz, G. (1996) The protein import system of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**,31763-6.
- Schatz, G., (1998) The doors to organelles. *Nature* **395**,439-40.
- Scheffler, I.E. (2001) A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion* **1**,3-31.
- Schmitt, E.K., Kempken, R., Kuck, U. (2001) Functional analysis of promoter sequences of cephalosporin C biosynthesis genes from *Acremonium chrysogenum*: specific DNA-protein interactions and characterization of the transcription factor PACC. *Mol. Genet. Genomics* **265**,508-18.
- Schulz, B.E., Kraepelin, G., Hinkelmann, W. (1974) Factors affecting dimorphism in *Mycotypha* (*Mucorales*): a correlation with the fermentation-respiration equilibrium. *J Gen Microbiol.* **82**, 1-13.
- Semenza, G.L. (1999) Perspectives on oxygen sensing. *Cell.* **6**, 281-4.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., Ames, B.N. (1994) Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**,10771-8.
- Shyjan, A.W., Butow, R.A. (1993) Intracellular dialogue. *Curr. Biol.* **3**, 398-400.
- Siemens, T.V., Nichols, D.L., Zitomer, R.S. (1980) Effect of mitochondrial functions on synthesis of yeast cytochrome *c*. *J. Bacteriaol.* **142**, 499-507.
- Singh, K.K. (1998) Mitochondrial DNA mutations in aging, disease, and cancer, Springer, New York, USA.
- Sinha, S., Maity, S.N., Lu, J., de Crombrughe, B. (1995) Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**,1624-8.

- Stephanopoulos, G., Aristidou, A.A., Nielsen, J. (1998) *Metabolic Engineering*. San Diego, Academic Press.
- Strauss, J., Mach, R.L., Zeilinger, S., Hartler, G., Stoffler, G., Wolschek, M., Kubicek, C.P. (1995) Cre1, the carbon catabolite repressor protein from *Trichoderma reesei*. *FEBS Lett.* **376**,103-7.
- Stucki, J.W. (1980) The optimal efficiency and the economic degrees of coupling of oxidative phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **109**,269-83.
- Szyperski, T. (1998) ¹³C-NMR, MS and metabolic flux balancing in biotechnology research. *Q. Rev. Biophys.* **31**, 41-106.
- Takashima, S., Nakamura, A., Iikura, H., Masaki, H., Uozumi, T. (1996) Cloning of a gene encoding a putative carbon catabolite repressor from *Trichoderma reesei*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**,173-6.
- Thykaer, J., Christensen, B., Nielsen, J. (2002) Metabolic network analysis of an adipoyl-7-ADCA-producing strain of *Penicillium chrysogenum*: Elucidation of adipate degradation. *Metab. Eng.* **4**,151-8.
- Treitel, M.A., Carlson, M. (1995) Repression by SSN6–TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**,3132-6.
- Treitel, M.A., Kuchin, S., Carlson, M. (1998) Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **18**,6273-80.
- Tzagoloff, A. (1982) in *Mitochondria* 342p., Plenum Press, New York and London.
- Tzagoloff, A., Myers, A.M. (1986) Genetics of mitochondrial biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 249-288.
- Ulery, T.L., Jang, S.H., Jaehning, J.A. (1994) Glucose repression of yeast mitochondrial transcription: kinetics of derepression and role of nuclear genes. *Mol. Cell. Bio.* **14**,1160-70.
- Varma, A., Palsson, B.O. (1994) Metabolic flux balancing: basic concepts scientific and practical use. *Biotechnology* **12**,994–8. *apud* Wiechert, W., (2001) ¹³C Metabolic flux analysis. *Metabolic Eng.* **3**,195–206.
- Vaulont, S., Vasseur-Cognet, M., Kahn, A. (2000) Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* **13**, 31555-8.
- Vellai, T., Vida, G., (1999) The origin of eukaryotes: the difference between prokaryotic and eukaryotic cells. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **266**, 1571-7.
- Wainwright, M. (1993) Oligotrophic growth of fungi – stress or natural state?, in *Stress Tolerance of Fungi*, Jennings, D.H., Ed., Mercel Dekker, New York. *apud* Burgstaller, W. (1997) Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* **23**,1-46.
- Walsh, G.A., Power, R.F., Headon, D.R. (1993) Enzymes in the animal-feed industry. *Trends Biotechnol.* **11**, 424-30.
- Whitby, M.C., Dixon, J. (2001) Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J. Mol. Biol.* **306**,703-16.
- Wiechert, W. (2002a) A gentle introduction to ¹³C metabolic flux analysis. *Genet. Eng. (NY)* **24**,215-38.
- Wiechert, W. (2002b) Modeling and simulation: tools for metabolic engineering. *J. Biotechnol.* **94**,37-63.
- Wiechert, W., (2001) ¹³C Metabolic flux analysis. *Metabolic Eng.* **3**,195–206.

- Wilson, W.A., Hawley, S.A., Hardie, D.G. (1996) Glucose repression/derepression in budding yeast: SNF1 protein kinase is activated by phosphorylation under derepressing conditions, and this correlates with a high AMP:ATP ratio. *Curr. Biol.* **6**,1426-34.
- Wittmann, C., Heinzle, E. (1999) Mass spectrometry for metabolic flux analysis. *Biotechnol. Bioeng.* **62**,739-50.
- Woods, A., Munday, M. R., Scott, J., Yang, X. L., Carlson, M., Carling, D. (1994) Yeast Snf1 is functionally related to mammalian AMP-activated protein kinase and regulates acetyl-CoA carboxylase *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **269**,19509-15.
- Zheng, X.M., Moncollin, V., Egly, J.M., Chambon, P. (1987) A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* **50**,361-8.
- Ziegler, A., von Kienlin, M., Decorps, M., Remy, C. (2001) High glycolytic activity in rat glioma demonstrated *in vivo* by correlation peak ^1H magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* **15**, 5595-600.
- Zubay, G. (1988) *Biochemistry* 2.ed. New York, Macmillan.

APÊNDICE

Modelo metabólico utilizado nos cálculos de fluxos metabólicos de *Trichoderma reesei*.
Embaixo de cada composto estão indicadas as transições dos átomos de carbono.

% Consumo de glicose

```

1  GLC          -> G6P
   abcdef      abcdef

```

% Via glicolítica

2	G6P		->	F6P
	abcdef			abcdef
3	F6P + G6P		->	G6P + F6P
	abcdef ghijkl			abcdef ghijkl
4	F6P		->	G3P + G3P
	abcdef			cba def
5	G3P		->	PEP
	abc			abc
6	PEP		->	PYRCYT
	abc			abc

% Via das pentoses-fosfato

7	G6P abcdef	->	CO + P5P a bcdef
8	P5P + P5P abcde fghij	->	S7P + G3P fgabcde hij
9	S7P + G3P + P5P + P5P fgabcde hij klmno pqrst	->	P5P + P5P + S7P + G3P abcde fghij pqklmno rst
10	S7P + G3P abcdefg hij	->	F6P + E4P abchij defg
11	F6P + E4P + S7P + G3P abchij defg nopqrst klm	->	S7P + G3P + F6P + E4P abcdefg hij nopklm qrst
12	P5P + E4P abcde fghi	->	F6P + G3P abfghi cde
13	F6P + G3P + P5P + E4P abfghi cde jklmn opqr	->	P5P + E4P + F6P + G3P abcde fghi jkopqr lmn

% Formação de acetato

14 PYRCYT -> ACA + CO
abc bc a

15 ACA -> ACE
ab ab

% Formação de acetil-CoA no citoplasma

```

16  ACE                                -> ACCOACYT
    ab                                ab

```

% Reação anaplerótica

```

17  PYRCYT + CO      -> OAA
    abc             d      abcd

```

% Ciclo dos ácidos tricarboxílicos

18	PYRMIT	->	ACCOAMIT + CO
	abc		bc a
19	OAA + ACCOAMIT	->	ICIT
	abcd ef		dcbafe
20	ICIT	->	AKG + CO
	abcdef		abcef d
21	AKG	->	FUM + CO
	abcde		bcde a
22	FUM + FUM	->	OAA + OAA
	abcd + efgh		abcd hgfe
23	OAA	->	FUM
	abcd		abcd

```
% Metabolismo de treonina, serina e glicina
```

```
24 G3P          -> SER
    abc         abc
25 SER          -> GLY + C1
    abc         ab   c
26 SER + GLY + C1 -> SER + GLY + C1
    abc   de   f   def   ab   c
27 THR          -> GLY + ACA
    abcd        ab   cd
28 GLY + ACA + THR -> THR + GLY + ACA
    ab   cd   efgh abcd   ef   gh
29 OAA          -> THR
    abcd        abcd
```

```
% Drenagem de intermediários para síntese de macromoléculas
```

```
30 G6P          -> G6POUT
    abcdef      abcdef
31 P5P          -> P5POUT
    abcde      abcde
32 E4P          -> E4POUT
    abcd      abcd
33 G3P          -> G3POUT
    abc      abc
34 PYRCYT       -> PYRCYTOUT
    abc      abc
35 PYRMIT       -> PYRMITOUT
    abc      abc
36 OAA          -> OAAOUT
    abcd      abcd
37 AKG          -> AKGOUT
    abcde      abcde
38 ACCOACYT     -> ACCOACYTOUT
    ab      ab
39 ACCOAMIT     -> ACCOAMITOUT
    ab      ab
40 SER          -> SEROUT
    abc      abc
41 GLY          -> GLYOUT
    ab      ab
42 C1           -> C1OUT
    a      a
```

```
% Formação de CO2
```

```
43 CO          -> COOUT
    a      a
```

```
% Transportes
```

```
44 ACCOACYT     -> ACCOAMIT
    ab      ab
45 PYRCYT       -> PYRMIT
    abc      abc
```