

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Transporte de glicose em *Trichoderma reesei*:
Caracterização estrutural e funcional dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2*

Augusto S. Peixoto Ramos
Tese de Doutorado

Orientador: Prof. Dr. Hamza El-Dorrry

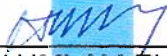
São Paulo
2002

“Transporte de Glicose em *Trichoderma reesei*: Caracterização Estrutural e Funcional dos Genes *Trhxt1* e *Trhxt2*”

AUGUSTO SÁVIO PEIXOTO RAMOS

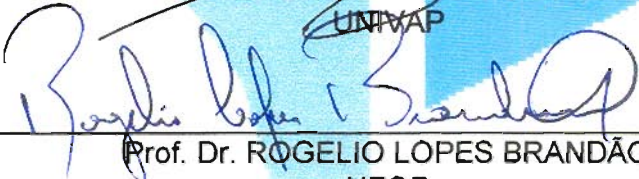
Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.


Aprovado por:


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


Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ – USP


Prof. Dr. FRANCISCO GORGÔNIO DA NOBREGA
UNIVAP


Prof. Dr. ROGELIO LOPES BRANDÃO
UFOP


Profa. Dra. MARIA CÉLIA BERTOLINI
IQ – UNESP - Araraquara

SÃO PAULO
05 DE NOVEMBRO 2002.

*A Cecilia Peixoto, minha avó,
com aprendi as coisas mais básicas
e, provavelmente, mais importantes da vida...*

Agradecimentos

A tese que ora se apresenta resulta, naturalmente, do esforço de várias pessoas, com as quais me sinto profundamente agradecido e com quem estarei sempre em débito.

Estou certo de que qualquer relação de nomes seria, acidentalmente, injusta; no entanto, seria igualmente injusto não mencionar, mesmo que de forma possivelmente inadequada, aqueles que, de um modo ou de outro, tornaram possível a realização deste trabalho.

Meus mais sinceros agradecimentos:

Ao professor Dorry e colegas de laboratório, com quem tive o privilégio de trabalhar e conviver, nos últimos anos: Adriano, Ari, Daniella, Danielinha, Dirce, Eric, Erik, Euclides, Luciana, Felipe, Fernando, Lia, Marluce, Maurício, Nathalie, Ribamar, Tatiana, Silvia, Wilton, Ynés e Zilda;

Aos demais colegas do instituto de química e de outras instituições, entre os quais: prof. Adilson (em memória), prof. Aldo, Ana Maria, prof. Andreas, Ariel, prof. Boris, Fernanda, prof. Flávio, Hazem, Jaime, Juan, Márcio, prof^a Maria Júlia, prof. Omar, prof. Pedro, prof. Rogélio, prof. Ronaldo e prof. Santelli (em memória);

A minha tia Lourdes e aos meus tios João de Deus e Deusinha;

Aos meus pais, João Antônio e Maria Tamar, aos meus irmãos João, Ana, Daniela e Bárbara, à Cida e a minha avó, Cecília Peixoto, sem os quais este trabalho não teria sequer se iniciado;

E a FAPESP, pelo apoio financeiro.

Minha gratidão a todos. Por inúmeras coisas:

Pela orientação e oportunidade;

Pelo tempo, cedido gentilmente;

Por todas as conversas e discussões acadêmicas. E, é claro, por todos os momentos de descontração;

Pelo envolvimento direto neste trabalho;

Pela concessão de uso de materiais e equipamentos e pela assistência técnica;

Por toda a atenção e preocupação;

Pelo apoio emocional e financeiro. Ambos foram igualmente importantes;

Pela companhia, tão próxima e íntima, apesar de tão distante. Por tudo o que temos compartilhado e por tudo o que ainda há por vir...

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas	vi
Resumo	vii
Abstract	viii
1. Introdução	1
2. Revisão de literatura	4
2.1. Transporte de glicose em eucariotos	4
2.2. Estímulo do transporte de glicose por hipoxia	12
2.3. O fungo filamentosso <i>T. reesei</i>	15
3. Objetivos	18
4. Materiais e métodos	19
4.1. Microorganismos	19
4.2. Condições de crescimento	19
4.3. Cultura contínua de <i>T. reesei</i>	20
4.4. Técnicas gerais de biologia molecular	21
4.5. Plasmídeos	21
4.6. Banco de dados de ESTs de <i>T. reesei</i>	23
4.7. Seqüenciamento de <i>Trhx1</i> e <i>Trhx2</i>	25
4.8. Preparação de soluções de glicose radioativa	26
4.9. Ensaio de transporte de glicose	27
4.10. Transformação de <i>T. reesei</i>	27
5. Resultados	29
5.1. Identificação de transportadores de glicose em <i>T. reesei</i>	29
5.2. Clonagem e seqüenciamento	35
5.3. Análise computacional de <i>Trhx1</i> e <i>Trhx2</i>	44
5.4. Análise da expressão de <i>Trhx1</i> e <i>Trhx2</i>	53
5.5. Expressão heteróloga em levedura	58
5.6. Nocaute de <i>Trhx1</i> em <i>T. reesei</i>	62
5.7. Caracterização do transporte de glicose em <i>T. reesei</i>	65
5.8. Expressão do sistema de celulasas de <i>T. reesei</i>	71
6. Discussão	75
7. Conclusões	84
8. Perspectivas	86
9. Referências Bibliográficas	87
<i>Curriculum Vitae</i>	98

Lista de abreviaturas e siglas

ATP	Adenosina trifosfato
CBH	Celobiohidrolase
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucléico complementar
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
ddNTP	didesoxirribonucleotídeo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , ácido desoxirribonucléico
EG	Endoglucanase
EPO	Eritropoetina
EST	<i>Expressed sequence tag</i> , seqüência expressa de DNA
Hyg B	Higromicina B
LORE	<i>Low oxygen response element</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i> , ácido ribonucléico mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucléico
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> , ácido ribonucléico ribossomal
TM	Segmento transmembrânico

Resumo

O fungo filamentoso *Trichoderma reesei* é caracteristicamente reconhecido pela produção de celulasas e hemicelulasas, que lhe permitem utilizar uma ampla variedade de polissacarídeos como fonte de carbono. Neste trabalho, descrevemos a caracterização de dois genes de *T. reesei*, *Trhxt1* e *Trhxt2*, que codificam proteínas com alta similaridade a transportadores de glicose de vários microorganismos. Os dois genes foram identificados em um banco de dados de ESTs de *T. reesei*. A análise computacional de *Trhxt1* e *Trhxt2* indica que ambos fazem parte da *major facilitator superfamily* (MFS), apresentando, tipicamente, 12 segmentos transmembrânicos. A expressão de *Trhxt1* ocorre apenas em baixos níveis de glicose ($\approx 100 \mu\text{mol l}^{-1}$), enquanto a de *Trhxt2* parece ocorrer de forma constitutiva, independentemente da fonte de carbono. Em baixas concentrações de oxigênio, a expressão de *Trhxt1* é induzida e a de *Trhxt2*, reprimida. O sistema de transporte em *T. reesei* apresenta um componente de afinidade muito alta por glicose ($K_m \approx 20 \mu\text{mol l}^{-1}$), semelhante ao de outros fungos filamentosos. Dados sobre o transporte de glicose em uma cepa mutante ΔTrhxt1 indicam que o gene *Trhxt1* está envolvido com o transporte em baixos níveis de glicose ($\leq 100 \mu\text{mol l}^{-1}$), que correspondem, provavelmente, aos valores encontrados no solo, o habitat natural de *T. reesei*. Interessantemente, a indução do sistema de celulasas de *T. reesei* por celulose está retardada no mutante ΔTrhxt1 , o que sugere a importância do transporte de glicose na expressão dos genes das celulasas. Finalmente, além de descrever os primeiros genes de transportadores de glicose em *T. reesei*, esperamos que este trabalho possa contribuir para o preenchimento de uma lacuna em relação ao transporte de açúcares em fungos filamentosos em geral.

Abstract

The filamentous fungus *Trichoderma reesei* is a natural soil inhabitant capable of metabolizing a vast number of polysaccharide substrates. In this work, we describe two genes of *T. reesei*, named *Trhxt1* and *Trhxt2*, which code for proteins with significant similarities to glucose transporters from other fungi. These genes were identified in an EST database of *T. reesei*. Sequence analysis of TrHXT1 and TrHXT2 revealed 12 putative transmembrane domains and several other characteristic motifs found in members of the major facilitator superfamily (MFS). *Trhxt1* is transcriptionally induced only by low levels of glucose ($\approx 100 \mu\text{mol l}^{-1}$), while *Trhxt2* expression is independent of both glucose concentration and carbon source. We also show that *Trhxt1* expression is enhanced when cells are exposed to low oxygen levels; in contrast, *Trhxt2* expression seems to be repressed at these conditions. Glucose transport in *T. reesei* is apparently mediated by a multicomponent uptake system, in which the high-affinity component has a K_m of approximately $20 \mu\text{mol l}^{-1}$. This low K_m value is similar to the values reported for glucose uptake by other filamentous fungi. Kinetics of glucose transport in a *T. reesei* ΔTrhxt1 strain suggests that *Trhxt1* is involved in glucose uptake in conditions of low glucose ($\leq 100 \mu\text{mol l}^{-1}$), which are most probably found in the soil, a low-nutrient environment. Interestingly, induction of the *T. reesei* cellulase system by cellulose is significantly delayed in the ΔTrhxt1 mutant, suggesting that glucose transport may be important to the mechanisms of expression of the cellulase genes. Finally, we hope that this work may be helpful to provide a better understanding of sugar uptake in filamentous fungi, for which there is little information available.

1. Introdução

A glicose se constitui em uma das mais importantes fontes de carbono e energia. Além de ser responsável pelo suprimento de ATP, a glicose é utilizada na biossíntese de vários compostos celulares, entre os quais estão glicoproteínas e moléculas de reserva de energia, tais como glicogênio, amido e triglicerídeos.

O papel da glicose não se limita, no entanto, à sua importância como nutriente. Este monossacarídeo, o mais abundante na natureza, exerce ainda um papel central na regulação do desenvolvimento e metabolismo. O controle exercido pela glicose na expressão gênica e na atividade protéica se dá em vários níveis: na concentração de moléculas de mRNA – cujo valor depende, por sua vez, da taxa de transcrição e da estabilidade do mRNA –; na taxa de tradução; e na taxa de degradação de proteínas (Gancedo, 1998).

Em microorganismos, a presença de glicose causa a repressão de um grande número de genes envolvidos no metabolismo de fontes alternativas de carbono. A este fenômeno geral dá-se o nome de repressão por glicose.

O efeito repressor da glicose no metabolismo é bem caracterizado em bactérias (Bruckner & Titgemeyer, 2002) e leveduras (Gancedo, 1998; Carlson, 1999). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a presença de glicose inibe a expressão dos genes de enzimas envolvidas no metabolismo de fontes alternativas de carbono, na gliconeogênese e no ciclo dos ácidos tricarboxílicos.

Por outro lado, a presença de glicose induz a expressão de outros grupos de genes nas células de *S. cerevisiae*, tais como os genes de enzimas da via glicolítica, de transportadores de glicose, de proteínas ribossomais, entre outros.

Em mamíferos, a concentração sanguínea de glicose é mantida relativamente constante, em torno de 5 mmol l^{-1} , apesar de variações constantes no suprimento e consumo do açúcar entre os diversos tecidos e órgãos. O aumento na taxa de captação de glicose pelos músculos e tecido adiposo, estimulado pelo hormônio insulina, é um dos principais modos de controle dos níveis de glicose no sangue. Alterações dos sistemas endócrino e neural de homeostase da glicose levam a graves doenças metabólicas, como a diabetes melito (Olson & Pessin, 1996; Bell & Polonsky, 2001; Saltiel & Kahn, 2001).

O transporte através da membrana plasmática é a primeira etapa no metabolismo da glicose, e consiste ainda, em geral, na etapa limitante. Devido à natureza polar da molécula de glicose, o seu transporte por difusão através da bicamada lipídica tende a ser muito

reduzido. Ao invés disso, nos organismos vivos, a captação de glicose é mediada por proteínas específicas, localizadas na superfície celular.

Em geral, o transporte de um dado substrato qualquer, tal como glicose, através da membrana plasmática, é classificado em passivo ou ativo. O transporte passivo é também denominado de difusão facilitada ou uniporte. Neste tipo de transporte, o fluxo através da membrana é bidirecional, de acordo com o potencial eletroquímico do substrato no interior da célula e no meio externo. No caso de solutos eletricamente neutros, o transporte é determinado unicamente pelo gradiente de concentração. O transporte de substratos carregados depende, além disso, da diferença de potencial elétrico através da membrana plasmática, cuja face citossólica se apresenta negativamente carregada. No fungo filamentoso *Neurospora crassa*, por exemplo, em condições de plena aeração, o potencial de membrana situa-se entre 180 e 220 mV (Burgstaller, 1997).

No transporte ativo, o acúmulo do substrato no interior da célula ocorre contra o seu gradiente de potencial eletroquímico. Há dois mecanismos de transporte distintos. No primeiro, denominado de transporte ativo primário, a captação do substrato está acoplada diretamente à hidrólise de ATP, que se constitui na força motriz do transporte. Cabe destacar aqui a superfamília de transportadores denominada *ATP-binding cassette (ABC) superfamily*. Os membros pertencentes a esta superfamília são complexos protéicos que realizam o transporte ativo primário de uma grande variedade de substratos, incluindo íons, carboidratos, aminoácidos e peptídeos (Iliggins, 1992).

No transporte ativo secundário, a captação do substrato está acoplada ao transporte simultâneo, e termodinamicamente favorável, de um outro soluto, normalmente Na^+ ou H^+ . Se ambos os solutos forem transportados no mesmo sentido, o transporte é denominado de co-transporte ou simporte; se o transporte ocorrer em sentidos contrários, de contra-transporte ou antiporte.

Transportadores de glicose de organismos tão diferentes quanto humanos e leveduras fazem parte de uma grande superfamília, denominada *Major Facilitator Superfamily (MFS)* (Marger *et al.*, 1993; Pao, *et al.*, 1998), constituída, atualmente, por 38 famílias, de acordo com *Transport Protein Database*, disponível em <http://tcdb.ucsd.edu/tcdb/background.php>. Os membros da MFS realizam o transporte passivo ou o transporte ativo secundário de diversos íons e metabólitos, entre os quais encontram-se aminoácidos, carboidratos e nucleosídeos.

Estruturalmente, estes transportadores são constituídos de uma única cadeia polipeptídica, contendo tipicamente 12 segmentos transmembrânicos (TM1-TM12), com uma longa e hidrofílica alça citoplasmática conectando TM6 e TM7.

Transportadores de glicose têm sido bem descritos em uma grande variedade de organismos, incluindo bactérias (Postma, *et al.*, 1993), leveduras (Boles & Hollenberg, 1997; Ozcan & Johnston, 1999), plantas (Williams *et al.*, 2000) e humanos (Olson & Pessin, 1996).

Dados sobre o transporte de glicose, e de outros monossacarídeos, em fungos filamentosos, no entanto, são em geral limitados, apesar da importância acadêmica e biotecnológica destes microorganismos.

Neste trabalho, descrevemos a caracterização, ao nível molecular, do transporte de glicose no fungo filamentoso *Trichoderma reesei*, um microorganismo que tem se destacado no estudo de diferentes fenômenos biológicos, e pelo seu potencial de uso biotecnológico. Além de descrever os primeiros genes de transportadores de monossacarídeos neste microorganismo, esperamos que este trabalho possa contribuir para o preenchimento de uma lacuna em relação ao transporte de açúcares em fungos filamentosos.

2. Revisão de literatura

2.1 Transporte de glicose em eucariotos

A seguir, é dada uma breve descrição do transporte de glicose em microorganismos eucariotos e em células de mamíferos, particularmente em seres humanos, com ênfase nas propriedades individuais dos transportadores de glicose identificados e caracterizados em cada organismo.

Transporte de glicose em leveduras

Na levedura *S. cerevisiae*, o transporte de glicose, e de outras hexoses, tais como frutose e manose, ocorre primariamente por difusão facilitada (Boles & Hollenberg, 1997). O transporte de dissacarídeos, como maltose e trealose, por outro lado, ocorre através do co-transporte de prótons (Serrano, 1977; Stambuk *et al.*, 1996; Stambuk *et al.*, 1998).

Células de *S. cerevisiae* são capazes de utilizar glicose, eficientemente, em um amplo intervalo de concentrações, desde valores muito baixos, inferiores a 5 mmol l⁻¹, a concentrações de até 1-3 mol l⁻¹, observadas em seu habitat natural (flores e frutas) (Phaff, 1986; Postma *et al.*, 1989). Para lidar com variações de até três ordens de magnitude na concentração de glicose, as células de *S. cerevisiae* dispõem de vários transportadores, com diferentes afinidades pelo substrato. Após o seqüenciamento do genoma de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996), uma família de vinte proteínas associadas ao transporte de hexoses foi identificada: Hxt1p-Hxt17p, Gal2p, Snf3p e Rgt2p (Kruckeberg, 1996).

O transporte de glicose em *S. cerevisiae* é finamente ajustado de acordo com a concentração extracelular do açúcar. Dessa forma, as células asseguram que a utilização do substrato disponível ocorra com maior eficiência. Este controle é exercido principalmente ao nível transcricional. Modificações pós-traducionais têm sido menos estudadas, mas a glicose também parece atuar na modulação da afinidade e no controle da inativação de certos transportadores (Ozcan & Johnston, 1999).

A análise cinética do transporte de glicose em *S. cerevisiae* indica, em geral, um sistema de transporte bifásico, representado por um componente de alta e outro de baixa afinidade por glicose. Na presença de alta concentração de glicose, apenas o componente de baixa afinidade contribui significativamente para a captação de glicose. É importante

reconhecer que cada um destes componentes corresponde, na verdade, a vários transportadores atuando simultaneamente, com valores de V_{max} e K_m diferentes e em sobreposição.

Em condições repressoras (glicose 2% m/v) – condições nas quais se observa o efeito repressor da glicose no metabolismo -, os valores de K_m dos componentes de alta e baixa afinidade por glicose estão em torno de, respectivamente, 2,0 e 45 mmol l⁻¹; em condições desrepressoras (glicose 0,05% m/v), os valores correspondentes de K_m estão próximos de 0,7 e 25 mmol l⁻¹. (Coons *et al.*, 1995; Reifengerger *et al.*, 1997).

As células de *S. cerevisiae* possuem sete transportadores principais, que são os responsáveis majoritários pela captação de glicose. Estes transportadores e sua afinidade relativa por glicose são: Hxt1p e Hxt3p, de baixa afinidade; Hxt2p e Hxt4p, de alta/intermediária afinidade; Hxt6p e Hxt7p, de alta afinidade; e Gal2p, o principal transportador de galactose, mas que também é capaz de transportar glicose com alta afinidade. Cepas de leveduras nas quais os genes destes transportadores foram nocauteados são incapazes de crescer na presença de glicose como única fonte de carbono (Reifengerger *et al.*, 1995; Kruckeberg *et al.*, 1999).

Ao invés de estarem envolvidos no transporte de glicose, Snf3p e Rgt2p parecem atuar como sensores de glicose, sinalizando, respectivamente, condições de baixa e alta concentração do açúcar. Diversas evidências experimentais apóiam esta suposição (Ozcan & Johnston, 1999). Entre elas, podemos destacar: i) Snf3p é necessário para a expressão, induzida por baixos níveis de glicose, de *HXT2* e *HXT4*, enquanto Rgt2p é necessário para a expressão, induzida por alta concentração de glicose, de *HXT1*; ii) ambos são incapazes de complementar cepas mutantes de *S. cerevisiae* deficientes no transporte de glicose; iii) a existência de mutações dominantes em *SNF3* e *RGT2* que causam a expressão constitutiva de *HXT1-HXT4*, mesmo na ausência de glicose.

Snf3p e Rgt2p são muito mais similares entre si (60% de identidade) do que com os demais membros da família *HXT* (identidade em torno de 30%). Em particular, estes transportadores possuem longas e atípicas caudas C-terminais, supostamente envolvidas na transdução de sinal. A similaridade entre as caudas C-terminais de Snf3p e Rgt2p se restringe a um elemento de 25 resíduos de aminoácidos, que ocorre duas vezes em Snf3p e apenas uma em Rgt2p (Ozcan *et al.*, 1996a).

Em Wieczorke *et al.* (1999), a capacidade de transporte dos demais membros da família *HXT* foi avaliada em uma cepa de *S. cerevisiae* na qual todos os vinte genes desta

família foram deletados. À exceção de Hxt12p, que se supõe que seja codificado por um pseudogene, todos os demais são capazes de captar pelo menos uma dentre as quatro hexoses: glicose, frutose, manose ou galactose.

Em outras espécies de leveduras, o estudo do transporte de glicose, sobretudo ao nível molecular, é relativamente recente. Apesar disso, vários transportadores de glicose, similares aos de *S. cerevisiae*, foram descritos em *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Pichia stipitis*.

Em *K. lactis*, a análise do transporte em função da concentração de glicose revelou a presença de dois componentes: um de alta afinidade (K_m de $\approx 1 \text{ mmol l}^{-1}$) e outro de baixa afinidade por glicose (K_m de 20-50 mmol l^{-1}). Ao contrário de *S. cerevisiae*, um número menor de transportadores parece estar relacionado à captação de glicose em *K. lactis*. Foram identificadas duas proteínas transportadoras: Rag1p, de baixa afinidade e induzido por glicose (Wesolowski-Louvel *et al.*, 1992) e Hgt1p, de alta afinidade e expresso de forma relativamente constitutiva (Billard *et al.*, 1996).

Uma proteína de membrana, Rag4p, similar a Snf3p e Rgt2p (52-53 % de identidade) foi identificada em *K. lactis*. Rag4p apresenta, assim como os sensores de glicose de *S. cerevisiae*, uma longa cauda C-terminal, com um elemento de 25 resíduos de aminoácidos semelhante ao encontrado duas vezes em Snf3p e uma vez Rgt2p. Além da similaridade, evidências experimentais sugerem que Rag4p seja um sensor de glicose em *K. lactis*, desempenhando um papel semelhante ao de Snf3p e Rgt2p em *S. cerevisiae* (Svatopluk *et al.*, 2001).

Em *S. pombe*, a captação de glicose foi descrita por meio de um sistema dependente de energia, acoplado ao co-transporte de prótons (Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1997). Uma família de seis membros de transportadores de hexoses foi identificada: Ght1p-Ght6p. Dentre estes, Ght1p, Ght2p, Ght5p e Ght6p foram caracterizados como transportadores de glicose pela sua capacidade de complementar mutantes de *S. cerevisiae* deficientes no transporte de glicose. A função de *GHT3* e *GHT4* foi estudada através do nocaute destes genes, o que revelou que *GHT3* codifica um transportador específico de gluconato. A função de *GHT4* permanece desconhecida (Lichtenberg-Fraté *et al.*, 1997; Heiland *et al.*, 2000).

Na levedura patogênica *C. albicans*, um transportador de alta afinidade por glicose foi caracterizado por complementação heteróloga em *S. cerevisiae*. O gene *CaHGT1*

codifica um transportador de glicose típico de membros da MFS, com um valor de K_m em torno de 1 mmol l^{-1} . (Varma *et al.*, 2000).

Na levedura *P. stipitis*, foi demonstrado que o transporte de glicose é bifásico, com um componente de alta afinidade ($K_m \approx 90 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$) e outro de baixa afinidade por glicose ($K_m \approx 1,9 \text{ mmol l}^{-1}$). Três transportadores de glicose foram identificados em *P. stipitis*, Sut1p-Sut3p, que parecem ser os principais responsáveis pelo transporte de baixa afinidade por glicose (Weierstall *et al.*, 1999).

É importante notar que o transporte em *P. stipitis* ocorre com uma afinidade muito maior por glicose que em *S. cerevisiae*. Enquanto nas células de *S. cerevisiae*, o transporte de alta afinidade apresenta valores de K_m em torno de 1 mmol l^{-1} , em *P. stipitis* o K_m é da ordem de $90 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Os valores de K_m em *S. cerevisiae* são típicos de leveduras nas quais o transporte de glicose ocorre por difusão facilitada. Espécies de levedura adaptadas a ambientes pobres em nutrientes, como o solo e lagos, possuem normalmente um sistema de transporte ativo, acoplado à captação de prótons, com valores de K_m muito menores. É o caso de *P. stipitis* e *C. utilis* (Phaff, 1986; Postma *et al.*, 1989).

Em relação a carboidratos, o termo pobre em nutrientes refere-se, normalmente, a concentrações de glicose inferiores a $200 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (Burgstaller, 1997). A faixa de concentrações de glicose associada aos termos *alta* e *baixa afinidade*, portanto, dependem, de certa forma, do microorganismo a que se referem.

Transporte de glicose em mamíferos

O transporte de glicose em mamíferos é realizado por uma família de transportadores pertencentes a MFS, contendo 12 segmentos transmembrânicos. Os membros da família GLUT (*glucose transporters*) operam por difusão facilitada e são responsáveis pelo suprimento contínuo de glicose às diversas partes do corpo, além de serem cruciais na manutenção da homeostase sanguínea de glicose (Olson & Pessin, 1996).

Dentre os vários membros da família GLUT, ou isoformas, como são tradicionalmente chamados, GLUT1-4 e GLUT7 são responsáveis pelo transporte de glicose, enquanto GLUT5 se constitui em um transportador de frutose. GLUT6 é codificado por um pseudogene, contendo múltiplas inserções e códons de terminação.

Outros transportadores da família GLUT foram recentemente identificados. Uma descrição destes novos membros e de sua caracterização funcional, quando disponível, é dada por Joost & Thorens (2001).

No intestino e nos túbulos renais, a captação de glicose ocorre contra um elevado gradiente de concentração, através do co-transporte ativo de íons Na^+ , por transportadores (*sodium-glucose transporters*, SGLTs) presentes na membrana apical das células epiteliais. Estes transportadores são distintos dos membros da família GLUT, e sua expressão tecidual é altamente específica.

As diferentes isoformas da família GLUT, por outro lado, estão presentes em todos os tipos celulares de mamíferos, em graus variados de sobreposição. Apesar disso, no entanto, é possível delinear um quadro geral de expressão, localização e função de cada transportador.

GLUT1 é expresso de forma generalizada, mas está principalmente localizado nos fibroblastos, eritrócitos e no endotélio da barreira hematoencefálica. Além disso, GLUT1 é está presente em altos níveis no tecido fetal.

GLUT3 é o principal transportador nos neurônios e é responsável, juntamente com GLUT1, pelo suprimento de glicose no tecido nervoso.

GLUT2 é encontrado na membrana basolateral de células epiteliais do intestino delgado, túbulo renal, células pancreáticas e fígado. A glicose captada pelos transportadores SGLTs, na membrana apical do intestino e túbulos renais, é encaminhada à corrente sanguínea por GLUT2.

GLUT4, por sua vez, é encontrado principalmente nos músculos e no tecido adiposo, nos quais é responsável pelo transporte regulado por insulina. Na ausência do estímulo hormonal, a maior parte de GLUT4 está retida em vesículas intracelulares. Sob a ação da insulina, estas vesículas são rapidamente deslocadas para a superfície celular, ocasionando um aumento agudo e intenso no transporte de glicose.

GLUT7 está associado ao retículo endoplasmático (RE) de hepatócitos. A glicose produzida no lúmen do RE pela ação da glicose-6-fosfatase é levada ao citoplasma por GLUT7, e daí encaminhada ao meio extracelular por GLUT2.

A caracterização cinética da família GLUT tem sido feita por diferentes métodos experimentais e em diferentes tipos celulares (Carruthers A., 1990), o que dificulta uma comparação adequada entre os diferentes transportadores. Isto pode ser contornado, entretanto, pela análise da expressão de cada transportador, isoladamente, em oócitos de

Xenopus laevis (Olson & Pessin, 1996). Através destes estudos, é possível verificar que GLUT3 e 4 são os transportadores que possuem maior afinidade por glicose, enquanto GLUT2 é o que apresenta a menor afinidade.

A maior afinidade de GLUT3 por glicose é particularmente importante no caso do cérebro, que depende quase que exclusivamente de glicose como fonte de energia.

Nos hepatócitos, por outro lado, é importante que o fluxo bidirecional de glicose não seja uma etapa limitante, mas que ocorra livremente de acordo com a concentração sanguínea de glicose. Isto é obtido pela utilização de um transportador (GLUT2) com um valor relativamente alto de K_m . No estado pós-prandial (após uma refeição), a entrada de glicose nos hepatócitos permite o seu metabolismo através da via glicolítica e/ou a síntese de glicogênio. No estado de jejum, por outro lado, a diminuição da atividade da glicocinase presente no fígado e a ativação da gliconeogênese conduzem a um aumento na concentração intracelular de glicose, que resulta no seu efluxo para a corrente sanguínea.

Transporte de glicose em fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são organismos heterotróficos com a capacidade de utilizar uma ampla variedade de fontes de carbono e nitrogênio. Muitas espécies são saprófitas, capazes de se desenvolver em matéria orgânica em decomposição, enquanto outras se envolvem, preferencial ou obrigatoriamente, em associações parasíticas ou simbióticas com plantas e animais.

Além do solo, os principais habitats de fungos filamentosos são plantas, vivas ou mortas, e fontes de água doce ou salgada. Conforme discutido anteriormente, devido à relativa escassez de nutrientes no solo, leveduras e fungos filamentosos adaptados a este ambiente utilizam um sistema de transporte ativo, do tipo simporte ou antiporte, como uma estratégia comum para a captação de nutrientes (Burgstaller, 1997).

Em *N. crassa* e *Aspergillus nidulans*, o transporte de glicose foi caracterizado do ponto de vista cinético na década de 1970. Ao nível molecular, entretanto, dados sobre transportadores de glicose são ainda limitados.

De acordo com Scarborough (1970 a, b), a captação de glicose em *N. crassa*, em condições repressoras, é mediada por um componente de baixa afinidade ($K_m \approx 8 \text{ mmol l}^{-1}$), operando por difusão facilitada. Em condições desrepressoras, por outro lado, observa-se a presença de um sistema ativo, de alta afinidade ($K_m \approx 10 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$).

Em Schneider & Wiley (1971), o transporte é descrito mais detalhadamente. Neste caso, o autor descreve dois sistemas de transporte, denominados de I e II. O sistema I, expresso de forma constitutiva, corresponde ao transporte de baixa afinidade, com valor de K_m igual a 23 mmol l^{-1} , em condições repressoras. Em condições desrepressoras, o valor de K_m , igual a 29 mmol l^{-1} , não é significativamente diferente. O sistema II, relacionado ao transporte de alta afinidade, é reprimido por glicose e apresenta valores de K_m em torno de $40 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.

Embora os resultados possam não parecer muito consistentes entre os dois autores, observamos que, nos dois casos, o transporte de glicose em *N. crassa* é mediado por um componente de alta afinidade, com K_m abaixo de $50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, dependente de energia; e por um componente de baixa afinidade, atuando por difusão facilitada, com uma afinidade muito menor pelo substrato.

Recentemente, a análise de um mutante de *N. crassa* com o processo de esporulação alterado permitiu a clonagem do gene *rco3*, codificador de uma proteína similar aos transportadores de hexoses de *S. cerevisiae*. Nestes mutantes, a esporulação ocorre de forma prematura, tanto em culturas líquidas quanto em meio sólido (Madi *et al.*, 1997).

A indução do processo de esporulação em mutantes $\Delta rco3$ poderia estar associada a um decréscimo na captação de glicose, resultante do nocaute do gene. Outras observações, no entanto, parecem sugerir que a proteína RCO3 seja um sensor de glicose, similar aos sensores Snf3p e Rgt2p, de *S. cerevisiae*, e Rag4p, de *K. lactis*.

Em primeiro lugar, a expressão de *rco3* é muito pequena, assim como ocorre com *SNF3* e *RGT2*. Em segundo, a deleção de *rco3* afeta o transporte tanto em alta quanto em baixa concentração de glicose, sugerindo um papel regulador de RCO3 na captação de glicose em *N. crassa*. Além disso, nos mutantes $\Delta rco3$ ocorre um alívio parcial da repressão por glicose.

Interessantemente, o transportador/sensor RCO3 apresenta uma longa cauda C-terminal, assim como Snf3 e Rgt2, mas sem a presença do elemento conservado de 25 resíduos de aminoácidos, que aparece em Snf3p, Rgt2p e Rag4p.

Em *A. nidulans*, a captação de glicose ocorre por um sistema de transporte ativo e constitutivo, cuja atividade independe da fonte de carbono. Estudos de competição mostram que a captação de glicose e frutose ocorre por 2 sistemas de transporte distintos,

com valores de K_m em torno de, respectivamente, 60 e 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Mark & Romano, 1971).

No fungo *T. harzianum*, que tem sido muito investigado pelo seu potencial de uso como agente de controle biológico, foi descrita a caracterização de um transportador de alta afinidade por glicose, denominado de GTT1 (Delgado-Jarana *et al.*, submetido).

A análise funcional de *gtt1* foi feita através da sobreexpressão do gene em células de *T. harzianum*. Os autores observaram um aumento de, aproximadamente, 2,5 vezes na captação de glicose em uma cepa contendo o gene *gtt1* sob o controle de um promotor constitutivo. A expressão de *gtt1* é induzida em baixos níveis de glicose, e parece ocorrer de forma constitutiva na presença de glicerol. Em alta concentração de glicose, a expressão do gene é reprimida.

A análise cinética da captação de glicose em *T. harzianum* revelou a presença de um transporte de alta afinidade por glicose, com valor de K_m em torno de 12 $\mu\text{mol l}^{-1}$, semelhante aos valores observados em *N. crassa* e *A. nidulans*.

No fungo micorriza *Amanita muscaria* – micorrizas são associações simbióticas estabelecidas entre determinados fungos de solo e raízes de plantas -, foi descrita a caracterização de um transportador de monossacarídeos, AmMST1, visando à melhor compreensão, ao nível molecular, do suprimento de carboidratos derivados da planta para o fungo (Nehls *et al.*, 1998).

A caracterização funcional do gene *Ammst1* foi feita através da complementação de mutantes de *S. pombe* (Mildbradt & Hofer, 1994), deficientes no transporte de glicose

A análise da expressão de *Ammst1* em diferentes concentrações de glicose indica que o gene é expresso de forma relativamente constitutiva em baixos níveis de glicose, e é induzido por concentrações acima de 5 mmol l^{-1} .

No fungo fitopatogênico *Uromyces fabae*, um parasita biotrófico obrigatório, um transportador de glicose, HXT1, foi recentemente identificado (Voegelé *et al.*, 2001). Este gene foi clonado em um trabalho de pesquisa por genes preferencialmente expressos em estruturas denominadas *haustoria*, que se originam da hifa do parasita e penetram as células do hospedeiro para a captação de nutrientes.

A caracterização funcional do gene foi feita por complementação de mutantes de *S. cerevisiae* (Reifenberger *et al.*, 1995). A análise do transporte neste sistema heterólogo forneceu um valor de K_m de 360 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Dados de *northern blot* e imunofluorescência indicam que o transportador é expresso exclusivamente em *haustoria*, o que fornece

evidências concretas de que estas estruturas estão envolvidas com a captação de açúcares nestas espécies de fungos parasitas.

Em *A. parasiticus*, foi feita a identificação de um suposto transportador de glicose, *hxtA* (Yu *et al.*, 2000), com base na análise da seqüência nucleotídica do gene. Nenhum estudo funcional foi realizado, no entanto.

2.2 Estímulo do transporte de glicose por hipoxia

À exceção dos organismos estritamente anaeróbicos, todos os demais organismos dependem de oxigênio molecular. Mecanismos adequados para detectar a disponibilidade de oxigênio e capacitar as células a sobreviver a baixas concentrações (hipoxia) ou à ausência de oxigênio (anoxia) foram desenvolvidos nos mais diversos organismos, de bactérias a humanos.

A adaptação à hipoxia envolve tanto alterações imediatas no metabolismo, através do controle da atividade enzimática, quanto alterações no perfil de expressão gênica (Bunn & Poyton, 1996). Ao nível molecular, o estudo da adaptação das células à hipoxia e do oxigênio como um importante regulador da expressão gênica iniciou-se com o estudo do controle da eritropoiese – produção de eritrócitos – pelo hormônio eritropoetina (EPO) (Jelkmann, 1992). A produção de eritropoetina é estimulada por hipoxia, em células específicas do fígado e rins.

Culturas de células humanas de hepatomas, Hep3B e HepG2, forneceram um sistema adequado ao estudo dos mecanismos moleculares de regulação do gene de eritropoetina (Goldberg *et al.*, 1988). Neste sistema, uma seqüência reguladora responsável pelo controle da expressão por oxigênio foi localizada a 3' do gene de EPO, e recebeu a denominação de *erythropoietin 3' enhancer* (Beck *et al.*, 1991; Semenza *et al.*, 1991).

Posteriormente, o fator de transcrição nuclear HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*) foi identificado pelas suas propriedades de ligação ao *enhancer* de EPO, através do reconhecimento da seqüência 5'-TACGTGCT-3' (Semenza & Wang, 1992; Wang, *et al.*, 1995).

Além do gene de EPO, vários outros genes induzidos por hipoxia, denominados de genes hipóxicos, foram identificados em células de mamíferos. Alguns destes genes são expressos em tecidos específicos, enquanto outros fazem parte de processos celulares

básicos. Entre estes se destacam os genes de transportadores de glicose e de enzimas da via glicolítica (Semenza *et al.*, 1994; Ebert *et al.*, 1995; Behrooz & Ismail-Beigi, 1999).

Interessantemente, foi demonstrado que o *enhancer* de EPO é capaz de conferir a genes repórteres um padrão de expressão semelhante ao de eritropoetina, em tecidos (pele, pulmões, ovário) que não expressam o hormônio (Maxwell *et al.*, 1993). Estas e outras evidências experimentais sugeriram a existência de um mecanismo de regulação comum por oxigênio, semelhante em diferentes tipos de células (Semenza *et al.*, 1994; Forsythe *et al.*, 1996).

Em células de mamíferos, durante períodos de hipoxia, a expressão de genes de enzimas da via glicolítica é estimulada, enquanto a expressão de enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos é reprimida, visando à manutenção da produção de ATP através do metabolismo anaeróbico (Webster, 1987). O suprimento de energia através da via glicolítica, com a redução de piruvato a lactato, depende de uma maior demanda de glicose.

Por sua vez, o transporte de glicose na maior das células é um dos fatores limitantes na utilização do açúcar. Portanto, a eficiência da ativação da via glicolítica como forma de geração de energia depende de um estímulo simultâneo do transporte de glicose. A ativação do transporte de glicose em células de mamíferos por hipoxia é um fenômeno bem caracterizado (Ismail-Beigi, 1993) e se dá, principalmente, pela indução do transportador de glicose GLUT1. O estímulo de GLUT 1 se dá por meio de modificações pós-traducionais - deslocamento de GLUT1 localizado em vesículas intracelulares para a superfície celular e ativação de moléculas já localizadas na membrana plasmática – e pelo aumento na expressão de seu gene (Behrooz & Ismail-Beigi, 1999).

Inibidores da fosforilação oxidativa, tais como azida, cianeto e rotenona, não estimulam a produção de EPO, o que sugere que o sistema responde primariamente à concentração de oxigênio, e não a conseqüências secundárias da inibição da respiração (Necas & Neuwirt, 1972; Tan & Ratcliffe, 1991). A captação de glicose por GLUT1, no entanto, é estimulada por inibidores da cadeia respiratória (Shetty *et al.*, 1993), o que sugeriu, inicialmente, que os mecanismos de indução de GLUT1 e de EPO fossem fundamentalmente diferentes, estando o estímulo da atividade de GLUT1 determinado pelo comprometimento da atividade mitocondrial.

Ebert *et al.* (1995) demonstraram, em células humanas de hepatomas, que, na verdade, a regulação de GLUT1 é similar a de EPO. A análise da região promotora de

GLUT1 mostrou que dois elementos de controle distintos operam na regulação do transportador: um elemento sensível aos inibidores da atividade mitocondrial, cuja mutação suprime a resposta à azida, mas não à hipoxia; e um elemento semelhante ao sítio de HIF-1, responsável pelo controle do oxigênio.

Em *S. cerevisiae*, estudos globais do perfil de expressão gênica revelaram que, no rearranjo metabólico provocado pela falta de oxigênio, os genes envolvidos com o metabolismo de reserva de carboidratos e a via glicolítica são induzidos, enquanto genes dos complexos respiratórios III, IV e V e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos encontram-se reprimidos (Kwast *et al.* 2002).

O principal, e mais bem caracterizado, regulador da expressão dos genes controlados por oxigênio em *S. cerevisiae* é o repressor Rox1p (Lowry & Zitomer, 1988; Balasubramanian *et al.*, 1993), responsável pela repressão, em condições normais de oxigênio, de grande parte dos genes hipóxicos.

Recentemente, foi demonstrado que o gene *OLE1*, codificador da proteína Δ -9 ácido graxo dessaturase, envolvida na biossíntese de ácidos graxos insaturados, e *CYC7*, da proteína iso-2-citocromo c, de *S. cerevisiae*, são regulados de forma semelhante aos genes induzidos por hipoxia em células de mamíferos (Kwast *et al.*, 1999).

A expressão regulada por oxigênio de *OLE1* foi posteriormente investigada por Vasconcelles *et al.* (2001). Um elemento de controle em *cis* responsável pela indução do gene por hipoxia, denominado de LORE (*low oxygen response element*) foi identificado por meio de genes repórteres e experimentos de gel de retardamento. A seqüência de LORE é 5'-ACTCAACAA-3'. Esta seqüência foi vasculhada no genoma de *S. cerevisiae* por métodos computacionais, tendo sido identificada nos promotores de outros genes regulados por oxigênio.

LORE e o sítio de HIF-1 em células de mamíferos, discutido anteriormente, parecem estar relacionados funcionalmente, apesar da falta de similaridade entre suas seqüências. Homólogos de HIF-1 não foram identificados em *S. cerevisiae*, apesar de terem sido identificados em outros organismos, tais como rato, camundongo e *Drosophila melanogaster* (Vasconcelles *et al.*, 2001).

A regulação dos membros da família *HXT* de *S. cerevisiae* tem sido intensamente investigada em relação à natureza e à disponibilidade da fonte de carbono no meio. A influência do oxigênio na expressão destes genes tem recebido, de certa forma, menos atenção.

Em Diderich *et al.* (1999), no entanto, o transporte de glicose e a expressão dos genes *HXT* de *S. cerevisiae* foram estudados em diferentes condições de cultivo, na presença e na ausência de oxigênio. Neste trabalho, não se observaram alterações significativas no padrão de expressão dos principais transportadores de glicose durante o crescimento da levedura em condições anaeróbicas.

Do mesmo modo, trabalhos de análise do perfil global de expressão gênica em *S. cerevisiae* (Ter Linde *et al.*, 1999; Kwast *et al.*, 2002) não mencionam os membros da família *HXT* entre os grupos de genes que se encontram induzidos ou reprimidos na ausência de oxigênio.

A regulação do transporte de glicose em *S. cerevisiae*, portanto, parece ser diferente do que se observa em células de mamíferos, pelo menos ao nível transcricional. Em relação a isso, é importante notar que, ao contrário de células de mamíferos, a levedura *S. cerevisiae* é um microorganismo anaeróbico facultativo, capaz de se desenvolver na ausência de oxigênio.

2.3 O fungo filamentososo *T. reesei*

O gênero *Trichoderma* compreende fungos saprófitos que habitam o solo de maneira generalizada. As espécies de fungo pertencentes a este gênero são tradicionalmente reconhecidas pela produção de uma série de enzimas hidrolíticas, que incluem celulasas, hemicelulasas e quitinases (Eveleigh & Klein, 1998).

Diversas espécies deste gênero, com destaque a *T. reesei*, têm sido utilizadas na produção comercial de várias enzimas, em especial celulasas e hemicelulasas, cuja aplicação tem sido aproveitada nas indústrias têxtil e de alimentos. Outras espécies, tais como *T. harzianum*, têm sido muito investigadas pelo seu potencial de uso como agentes de controle biológico, conforme dito anteriormente.

Além de sua importância econômica, o gênero *Trichoderma* tem sido utilizado no estudo de diferentes fenômenos biológicos.

T. reesei

O fungo *T. reesei* é derivado de uma única cepa selvagem conhecida, QM6a (Lieckfeldt *et al.*, 1998). O fungo se reproduz de forma assexuada pela produção de conídios, de cor

verde e elipsóides (3,5-4,5 x 2,3-3,0µm). As hifas são septadas e polinucleadas, com diâmetro de 5 a 10 µm. Em cultura, formam-se colônias brancas ou amarelas, de rápido crescimento - 5,5-7 cm de diâmetro, a partir do ponto de inóculo dos conídios, após 4 dias, a 20° C, em extrato de malte 2 % (m/v) (Gams & Bisset, 1998).

A cariotipagem na linhagem selvagem QM6a e em cepas hipercelulolíticas, tais como a cepa QM 9414 (Montenecourt & Eveleigh, 1979), revelou a presença de 7 cromossomos, através da eletroforese de campo pulsado. As 7 bandas têm de 2,8 a 6,9 Mb. Estima-se que todo o genoma de *T. reesei* tenha de 31 a 39 Mb (Mantyla *et al.*, 1992; Herrera-Estrella *et al.*, 1993).

Através de métodos moleculares, Kuhls *et al.* (1996) estabeleceram que o fungo *T. reesei* corresponde à forma anamórfica do fungo ascomiceto *Hypocrea jecorina*. (O estágio de vida sexuada dos fungos é denominado de teleomórfico, e o de vida assexuada, de anamórfico.)

A classificação taxonômica de *T. reesei*, de acordo com o *National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy database* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/tax.html>), é:

Número de Identificação (*Taxonomy ID number*): 51453;

Super-reino: Eukaryota;

Reino: Fungi;

Filo: Ascomycota;

Ordem: Hypocreales;

Família: Hypocreaceae;

Gênero: *Hypocrea*;

Espécie: *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*).

O fungo *T. reesei* tem se destacado, particularmente, em estudos sobre a degradação da celulose - um polímero linear, não ramificado, constituído de unidades de glicose unidas por ligações β -1, 4 -, e outros polissacarídeos.

O sistema de celulasas de *T. reesei* (Montenecourt, 1983) é, provavelmente, um dos mais extensivamente estudados em seus diversos aspectos, tais como o mecanismo de ação das celulasas (Irwin *et al.*, 1993; Henrissat, 1994) 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).

Há 3 classes principais de celulases no sistema celulolítico de *T. reesei*: endoglucanases (EGs), responsáveis pela clivagem de ligações glicosídicas internas; celobiohidrolases (CBHs), com a função de liberar resíduos de celobiose, um dímero de glicose em ligação β -1,4, das extremidades das cadeias de celulose ; e β -glicosidases, que atuam na etapa final de hidrólise, produzindo glicose a partir de celobiose e outros oligossacarídeos (para uma revisão, consulte Béguin, 1990).

O sistema de celulases de *T. reesei* é induzido, ao nível transcricional, em pelo menos 1000 vezes por celulose (Carle-Urioste *et al.*, 1997). A expressão do sistema é feita de forma coordenada, ou seja, o nível relativo das diferentes celulases mantém-se constante em diferentes condições de cultivo (Torigoi *et al.*, 1996).

Os mecanismos de regulação dos genes das celulases de *T. reesei* têm sido intensamente investigados. No atual modelo, o sistema de celulases é expresso continuamente, e esta expressão basal do sistema é necessária para a formação de um indutor solúvel, a partir de celulose (Mandels e Reesc, 1960; Sternberg e Mandels, 1979).

O dissacarídeo sofrorose, constituído de dois resíduos de glicose em ligação β -1, 2, é um dos mais potentes indutores das celulases de *T. reesei* (Sternberg e Mandels, 1979) e acredita-se que seja o indutor natural do sistema. A sofrorose seria produzida a partir de celobiose pela atividade de transglicosilação de β -glicosidases. Esta hipótese é sustentada pela demonstração de que sofrorose e outros dissacarídeos são produzidos pelo sistema de celulases de *T. reesei in vitro*, a partir de celulose e celobiose (Vaheiri *et al.* 1979).

Inúmeros trabalhos realizados em *T. reesei* têm abordado diversos outros aspectos celulares, além da degradação de celulose. Destacamos trabalhos recentes sobre os mecanismos de repressão por glicose (Cziferszky *et al.*, 2002) e o padrão de expressão dos genes envolvidos no metabolismo da glicose (Chambergo *et al.*, 2002).

Estes trabalhos têm fornecido informações importantes sobre as similaridades e diferenças de tais processos entre microorganismos multicelulares e unicelulares.

3. Objetivos

A fim de permitir o estudo mais amplo de *T. reesei*, nas áreas de biologia molecular e celular, um banco de dados de ETSs foi desenvolvido por nosso laboratório, e encontra-se disponível no endereço <http://trichoderma.iq.usp.br>.

Neste banco, foram identificados dois genes de prováveis transportadores de glicose, denominados de *Trhxt1* e *Trhxt2* (de *Trichoderma reesei* hexose transporter). Os objetivos do presente trabalho consistem, primariamente, no estudo do transporte de glicose em *T. reesei* e na caracterização, estrutural e funcional, dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2*

Três aspectos gerais serão abordados no estudo da função destes genes:

- i. a determinação e análise computacional da estrutura primária de cada gene, em um estudo comparativo com transportadores de glicose de outros organismos;
- ii. o estudo de sua expressão em diferentes concentrações de glicose, em diferentes fontes de carbono e em função da disponibilidade de oxigênio;
- iii. e a determinação de seus parâmetros cinéticos, em cepas mutantes nas quais os genes foram nocauteados.

Em última análise, nosso objetivo consiste em determinar a função de cada gene, considerando-se e relacionando suas propriedades às condições do habitat natural de *T. reesei*.

4. Materiais e Métodos

4.1 Microorganismos

A cepa QM 9414 de *T. reesei*, obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, 26921), foi utilizada em todo o trabalho.

As cepas de *S. cerevisiae* e de *S. pombe* utilizadas nos experimentos de expressão heteróloga estão relacionadas na Tabela 1.

Células de *Escherichia coli* XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene) e DH5αF⁺ (Invitrogen) foram utilizadas rotineiramente na propagação de plasmídeos.

Tabela 1 Cepas de leveduras utilizadas neste trabalho

Levedura	Cepa	Genótipo	Referência
<i>S. cerevisiae</i>	KY73	<i>MATa hxt1Δ::HIS3Δhxt4 hxt5::LEU2 hxt2Δ::HIS3 hxt3Δ::LEU2::hxt6 hxt7::HIS3 gal2Δ::DR^o ura3-52 his3-11,15 leu2-3,112 MAL2 SUC2 GAL MEL</i>	Kruckeberg <i>et al.</i> (1999)
<i>S. pombe</i>	YGS-5	<i>h⁻ leu1-32 ght1 ght5 ght6</i>	Mildbradt & Hofer (1994)

^a Direct Repeat

Tabela 2 Cepas da bactéria *E. coli* utilizadas neste trabalho

Cepa	Genótipo
XL1-Blue MRF ⁺	<i>F⁺::Tn10 proA⁺B⁺ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 relA1 lac</i>
DH5αF ⁺	<i>F⁺/endA1 hsdR17(r_k⁻m_k⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA(Nal^r) relA1 Δ(lacIZYA-argF) U169 deoR (φ80alacΔ(lacZ)M15)</i>

4.2 Condições de crescimento

A preparação e manutenção de culturas de *T. reesei* foram feitas conforme descrito anteriormente (El-Gogary *et al.*, 1989). Em meio sólido, o fungo foi mantido em placas de *potato dextrose agar* (PDA) (DIFCO), a 28°C. Culturas líquidas foram realizadas pelo inóculo de esporos de *T. reesei* em meio mínimo ou em meio rico, a 28°C, sob agitação constante de 200 rpm.

Esporos de *T. reesei* foram recolhidos em NaCl 0,9 % (m/v), a partir de placas de PDA de 7 a 10 dias de cultivo.

A composição do meio mínimo, em g l⁻¹, é: (NH₄)₂SO₄ 2,1; MgSO₄•7 H₂O 0,3; CaCl₂•2 H₂O 0,3; FeSO₄•7 H₂O 5 x 10⁻³; MnSO₄•H₂O 1,6 x 10⁻³; CoCl₂•6H₂O 2 x 10⁻³; e

ZnSO₄•7 H₂O 1,4 x 10⁻³. O cloreto de cálcio e os metais de transição foram adicionados após a autoclavagem do meio, a partir de soluções concentradas estéreis.

O meio rico corresponde ao meio mínimo suplementado com uréia 0,3 g l⁻¹, proteose peptona 2 g l⁻¹ e tween (80) 2 ml l⁻¹.

A preparação e manutenção de culturas de levedura foram realizadas segundo Sambrook *et al.* (1989) e/ou Ausubel *et al.* (1992).

Culturas de *S. cerevisiae* foram realizadas em meio mínimo, *yeast nitrogen base* (YNB) 0,7 % (m/v) (Amresco), ou em meio rico, constituído de extrato de levedura 1 % (m/v) (Amresco) e peptona 2 % (m/v) (Sigma), com uma fonte de carbono apropriada.

Em meio mínimo, as culturas foram suplementadas com os aminoácidos apropriados, de acordo com as exigências nutricionais de cada cepa.

Na preparação de meio sólido, acrescentou-se ágar 2 % (m/v) (Calbiochem).

As culturas de *S. pombe* foram realizadas no meio mínimo de Edinburgh (EMM) (Moreno *et al.*, 1991), ou em meio rico, conforme descrito para *S. cerevisiae*.

4.3 Cultura contínua de *T. reesei*

Culturas contínuas de *T. reesei* foram realizadas no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP-SP, em um trabalho de colaboração com os professores Andreas K. Gombert e Aldo Tonso.

Os experimentos foram realizados em um reator New Brunswick – Bioflo, equipado com dois eletrodos de O₂ e acoplado a um analisador de gases (CO₂ e O₂). As culturas foram realizadas em um volume de 2 l, a 28°C, sob agitação constante de 900 rpm, a uma taxa de diluição de 0,1 h⁻¹. O pH foi mantido entre 6,1 e 6,4, através da adição automática de NaOH 1 mol l⁻¹.

O meio de cultura utilizado foi o mesmo descrito anteriormente, suplementado com extrato de levedura 0,1 % (m/v). A glicose foi utilizada como substrato limitante, e sua concentração no meio de abastecimento foi de 100 mmol l⁻¹. As culturas foram monitoradas continuamente, através de alíquotas retiradas para a determinação da concentração de glicose, peso seco e preparação de amostras de RNA.

Uma vez estabelecido o estado estacionário do cultivo contínuo, o efeito do oxigênio na expressão gênica de *T. reesei* foi investigado através da redução gradual da concentração de oxigênio, em intervalos de 1 h. Ou seja, após cada redução na

concentração de oxigênio, o fungo foi deixado na nova condição por 1 h; uma amostra foi, então, recolhida para análise, e a concentração de oxigênio reduzida novamente.

4.4 Técnicas Gerais de Biologia Molecular

Os procedimentos de manipulação de ácidos nucleicos foram efetuados, em geral, segundo Sambrook *et al.* (1989) e/ou Ausubel *et al.* (1992), ou de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes dos produtos utilizados.

Oligonucleotídeos foram adquiridos das empresas Operon e Invitrogen.

Os radionuclídeos, [γ - 32 P] ATP, [α - 32 P] dATP e D-[U- 14 C] glicose foram adquiridos das empresas Amersham Biosciences e REM Indústria e Comércio.

A preparação de amostras de DNA genômico de *T. reesei* foi feita pela maceração do micélio do fungo, em nitrogênio líquido, seguida de extrações com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Amresco), de acordo com El-Gogary *et al.*, (1989).

A preparação de RNA foi feita com TRIzol[®] Reagent (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante.

4.5 Plasmídeos

Gene Trhxt1

Fragmentos de DNA genômico contendo toda a seqüência codificadora do gene *Trhxt1* foram isolados na triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*, construída no fago Lambda DashTM II (Matheucci, 1993). Um dos fagos obtidos na triagem desta biblioteca, denominado de fago λ HXT1a, foi utilizado na identificação e clonagem de 2 fragmentos *Bam*HI, de 2,2 e 4 kb, que originaram, respectivamente, os plasmídeos pTH2 e pTH4 (veja a Fig. 6, pág. 37). Os fragmentos foram clonados no vetor pBluescript KS(-) (Stratagene).

O plasmídeo pYH41 foi utilizado no teste de complementação de *S. cerevisiae*. Na construção de pYH41, toda a seqüência codificadora de *Trhxt1* foi amplificada, por PCR, a partir do plasmídeo p27, isolado de uma biblioteca de cDNA (veja a Fig. 6, pág. 37). Sítios de restrição adequados foram inseridos nos *primers* para a clonagem do produto de PCR no vetor pJN40 – trata-se de um vetor de expressão em *S. cerevisiae*, de múltiplas cópias,

contendo um promotor induzível por cobre e tendo uracila como sua marca de seleção (Gietz & Sugino, 1988).

O gene *HXT2*, de *S. cerevisiae*, utilizado como controle positivo no teste de complementação, foi clonado no mesmo vetor (pJN40). A seqüência codificadora de *HXT2* foi obtida, por PCR, do DNA genômico de *S. cerevisiae*.

O teste de complementação de *S. pombe* foi realizado com o plasmídeo pPREP-TrHXT1. A construção deste plasmídeo foi análoga à de pYH41. Neste caso, o gene *Trhxt1* e o gene *GHT1*, de *S. pombe*, utilizado como controle positivo, foram clonados no vetor pPREP1 – um vetor de expressão em *S. pombe*, de múltiplas cópias, contendo um promotor reprimido por tiamina e tendo leucina como sua marca de seleção (Maundrell, 1993). A seqüência codificadora de *GHT1* foi amplificada, por PCR, do DNA genômico de *S. pombe*.

O plasmídeo pH2 foi construído para o nocaute do gene *Trhxt1* em células de *T. reesei*. A seqüência codificadora de *Trhxt1* foi interrompida pelo gene *hph*, de higromicina fosfotransferase (Gritz & Davies, 1983), em um sítio conveniente da enzima *SalI*. Primeiramente, um fragmento *BamHI-SalI* (de 1,7 kb), isolado de pTH2 (descrito anteriormente), foi ligado a um fragmento de, aproximadamente, 2,2 kb, contendo o gene *hph* sob o controle do promotor do gene de triptofano C de *A. nidulans* (Staben *et al.*, 1989), no vetor pBluescript KS (-) (Stratagene) - o fragmento *BamHI-SalI* contém o promotor e parte da região codificadora de *Trhxt1*. O plasmídeo obtido foi denominado de pH1. Em seguida, o plasmídeo pH1 foi ligado a um produto de PCR de 3 kb - este produto de PCR foi obtido a partir do plasmídeo pTH4 (descrito anteriormente) -, da região 3' de *Trhxt1*, originando o plasmídeo pH2.. Finalmente, o inserto de pH2 foi utilizado como um cassete de integração para o nocaute de *Trhxt1* em esporos de *T. reesei* (veja a Fig. 19A, pág. 64).

Gene *Trhxt2*

Um plasmídeo contendo parte da seqüência codificadora de *Trhxt2*, denominado de p26, foi isolado da biblioteca B de *T. reesei* (veja a Fig. 8, pág. 41). Posteriormente, o inserto deste plasmídeo foi utilizado como sonda na triagem da biblioteca A. Um plasmídeo foi obtido e denominado de p28 (veja a Fig. 8, pág. 41).

4.6 Banco de dados de ESTs de *T. reesei*

O banco de dados de ESTs de *T. reesei* foi desenvolvido a partir do seqüenciamento aleatório e em larga escala de duas bibliotecas de cDNA, designadas de A e B.

A construção e seqüenciamento da biblioteca A estão descritos em Chamberg *et al.* (2002). Amostras de RNA total, preparadas a partir do micélio do fungo cultivado na presença de glicerol, foram utilizadas para a preparação de mRNA poly(A)⁺, a partir de oligo(dT) *primers*, utilizando-se o *Poly (A)⁺ Quick[®] mRNA isolation kit* (Stratagene).

A construção da biblioteca foi feita no vetor *Uni-ZAP[®] XR vector* (Stratagene). Neste sistema, os plasmídeos obtidos contêm insertos de cDNA clonados de forma direcionada, entre os sítios de restrição *EcoRI* e *XhoI* do vetor.

O seqüenciamento da biblioteca foi feito a partir da extremidade 5' dos insertos de cDNA, utilizando-se o método de didesoxinucleotídeos trifosfatos (ddNTPs) (Sanger *et al.*, 1977), em um seqüenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer).

Biblioteca normalizada

A biblioteca B, ao contrário de A, é normalizada. A síntese de cDNA a partir de oligo(dT) *primers* foi feita com o *SMART PCR cDNA Synthesis Kit* (Clontech). A normalização foi feita com bases nas metodologias de representação diferencial de genes e PCR supressivo (*Clontech PCR-Select cDNA Substraction Kit*, Clontech). Sucintamente, a biblioteca foi construída do seguinte modo. Após a síntese, o cDNA foi clivado com a enzima de restrição *RsaI*, uma enzima cujo sítio de restrição é constituído de 4 pb. Obtêm-se, desse modo, fragmentos menores de cDNA, os quais podem ser, posteriormente, mais facilmente recuperados por PCR. No passo seguinte, o cDNA é ligado, separadamente, a dois adaptadores diferentes (1 e 2). Seguem-se, então, duas etapas de hibridização: a primeira envolve a hibridização entre si das moléculas de cDNA ligadas a um mesmo adaptador; na segunda etapa, realizada imediatamente após a primeira, as 2 populações são misturadas e a hibridização deixada prosseguir por mais tempo.

Na primeira etapa de hibridização, as moléculas presentes em maior abundância irão se reassociar mais rapidamente que as demais, formando fragmentos em dupla fita que contêm o mesmo adaptador em ambas as extremidades. O tempo de hibridização é fundamental, uma vez que as moléculas presentes em menor abundância devem permanecer

na forma de fita simples. Na segunda etapa, quando as 2 populações são misturadas, as moléculas que permaneceram em fita simples durante a primeira etapa irão se reassociar, originando híbridos com um adaptador de cada tipo em cada extremidade.

Finalmente, faz-se uma reação de PCR na qual apenas os híbridos, que contêm ambos os adaptadores, 1 e 2, são amplificados, obtendo-se a biblioteca normalizada. As moléculas de cDNA em dupla fita que contêm o mesmo adaptador, obtidas na primeira etapa de hibridização, não são amplificadas devido à estrutura secundária que se forma pelo pareamento entre os adaptadores. Este é o denominado PCR supressivo.

O seqüenciamento da biblioteca B foi realizado pelo mesmo método utilizado no seqüenciamento da biblioteca A, utilizando-se neste caso, porém, um seqüenciador automático *MegaBACE 1000* (Amersham Bioscience).

Análise computacional dos dados

A análise computacional dos dados obtidos no seqüenciamento das bibliotecas A e B foi feita de forma semelhante. As seqüências foram analisadas pelo programas *phred/phrap/crossmatch* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Apenas os ESTs contendo, pelo menos, 150 pb de comprimento com qualidade (Q) ≥ 20 , de acordo com o programa *phred*, foram aceitos. As que não se encaixaram neste critério foram rejeitas e descartadas da base de dados.

Em seguida, arquivos em formato *fasta*, contendo seqüências simples (*singlets*) ou agrupadas (*contigs*), foram enviados, utilizando-se o programa *BlastCl3* (NCBI), para comparação com a base de dados, não redundante (NR), de proteínas do GenBank (NCBI). O programa *BLASTX* foi utilizado nesta análise comparativa (Altschul *et al.*, 1990) (NCBI), com os seguintes parâmetros: filtro de baixa complexidade, matrix de comparação *BLOSUM 62*, base de dados não redundante e código genético padrão.

Os alinhamentos produzidos pelo programa *BLASTX* e os respectivos valores de *score* e *e-value*, que indicam a significância dos resultados obtidos, foram utilizados na atribuição de função aos ESTs. Seqüências que apresentaram valores de *score* ≥ 80 foram consideradas identificadas, e aquelas com *score* < 80 , não identificadas.

Posteriormente, os genes foram classificados de acordo com a sua função, com base em critérios semelhantes aos do banco *Expressed Genome Anatomy Database* (EGAD) do

instituto de pesquisa TIGR (*The Institute For Genomic Research*)
(http://tigr.org/docs/tiger-scripts/egad_scripts/role_report.spl) (White *et al.*, 1996).

4.7 Sequenciamento dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2*

O sequenciamento completo dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2* foi feito por *primer walking* e por *shotgun*, utilizando-se um seqüenciador automático *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (Perkin Elmer) ou um seqüenciador *MegaBACE 1000* (Amersham Bioscience).

Os oligonucleotídeos utilizados no sequenciamento por *primer walking* estão relacionados nas Tabelas 3 e 4. As 2 fitas de DNA foram seqüenciadas com estes conjuntos de oligonucleotídeos. O espaçamento médio entre os *primers* é de 500 pb.

Tabela 3 Oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento do gene *Trhxt1*

Oligonucleotídeo	Seqüência
HXT1-F1	5` - CTGCAAGAGTATCAAAGAGT - 3`
HXT1-F2	5` - TTGGCATGCTCATTGTGCGCC - 3`
HXT1-F3	5` - CTTTCATGATGATGCCCGCTTC - 3`
HXT1-F4	5` - TCATCAACGTGCTGATGACC - 3`
HXT1-F5	5` - CGTACCTCATCTTTGCCATC - 3`
HXT1-F6	5` - GCAGTCTATCAGTCTGTGCC - 3`
HXT1-R1	5` - AGACGACTATTAAGCGCTGC - 3`
HXT1-R2	5` - AACATGGCCTCCGTCTCCTC - 3`
HXT1-R3	5` - GACGACTTCACCGTAGGTGG - 3`
HXT1-R4	5` - CTTGAACAGGTCGAGGTAGG - 3`
HXT1-R5	5` - GCTTGGAGGGAGGCGAAAATC - 3`
HXT1-R6	5` - TCGAAGCCGAACAACGCGCC - 3`

F e R, na identificação dos oligonucleotídeos, referem-se a *forward* e *reverse*

Tabela 4 Oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento do gene *Trhxt2*

Oligonucleotídeo	Seqüência
HXT2-F1	5´ - TGCTTCAAGGGCTCTCTGTG - 3´
HXT2-F2	5´ - GGTCAACGTCTGCTCTACTC - 3´
HXT2-F3	5´ - ACCTTTGCCGCTCAGATGGG - 3´
HXT2-R1	5´ - CCATCCGGAAGCAGGAGAGTCCT - 3´
HXT2-R2	5´ - AGGTGGAGGCCGAAGAAGAAG - 3´
HXT2-R3	5´ - GGCTGATGCAGAACTGGTAG - 3´

F e R, na identificação dos oligonucleotídeos, referem-se a *forward* e *reverse*

O método de *shotgun* foi utilizado, particularmente, na obtenção da seqüência da região promotora de *Trhxt1* e para se obter a seqüência completa de *Trhxt2*. As bibliotecas foram construídas a partir do DNA de fagos contendo os genes *Trhxt1* ou *Trhxt2*. Primeiramente, o DNA dos fagos foi submetido à sonicação e, em seguida, tratado com as enzimas *klenow* (USB) e *T4 polynucleotide kinase* (Invitrogen), para a geração de *blunt ends* e fosforilação das extremidades 5´. Finalmente, fragmentos localizados na faixa entre 0,5 e 2 kb foram isolados de gel de agarose e ligados no vetor pUC18/SmaI/BAP (Amersham Biosciences). Os insertos dos plasmídeos obtidos foram seqüenciados a partir de ambas as extremidades, com *primers* do próprio vetor.

4.8 Preparação de soluções de glicose radioativa

Nos ensaios de transporte, utilizou-se glicose marcada uniformemente com o isótopo ^{14}C , D-[U- ^{14}C] glicose, adquirida em solução aquosa contendo etanol 3 % (310 mCi mmol $^{-1}$) (Amersham Biosciences). A partir desta solução estoque, foram preparadas soluções de glicose radioativa de diferentes concentrações (100 $\mu\text{mol l}^{-1}$, 1 mmol $^{-1}$, 10 mmol $^{-1}$, 100 mmol $^{-1}$ e 1 mol $^{-1}$), contendo de 25.000 a 75.000 dpm μl^{-1} .

Na preparação destas soluções, volumes adequados da solução estoque foram submetidos, primeiramente, à liofilização. A seguir, a glicose cristalina radioativa foi dissolvida em solução aquosa de glicose fria (não marcada), na concentração desejada.

4.9 Ensaios de transporte de glicose

O método utilizado para a determinação da taxa de captação de glicose foi baseado nos procedimentos descritos por Stambuk *et al.* (1998) e Coons *et al.* (1995). O transporte de glicose em células de *S. cerevisiae* foi realizado conforme descrito em Coons *et al.* (1995).

Esporos de *T. reesei* (10^6 esporos ml^{-1}) foram inoculados em meio rico, contendo glicose 2 % (m/v), por 10-12h, a 28°C, sob agitação constante de 200 rpm. O micélio do fungo foi, então, recolhido por centrifugação (16000 x g, por 15 min, a 4°C) e suspenso no mesmo meio de cultura, suplementado com glicose 0,05 % (m/v), por 2h.

Após esse tempo, o micélio foi recolhido por filtração e suspenso em fosfato de potássio 100 mmol l^{-1} , pH = 5,0, a 4°C, a uma concentração de, aproximadamente, 8 mg ml^{-1} . Na filtração, foram utilizadas membranas Millipore, constituídas de ésteres mistos de celulose, com poros de 0,45 μm de diâmetro.

Alternativamente, os esporos foram inoculados em baixa concentração de glicose (0,8-1 mmol l^{-1}), por 6-8h, em condições semelhantes.

A partir deste ponto, as células foram mantidas em gelo durante todo o restante do experimento. Em cada ensaio, 80 μl da suspensão de células foram misturados com 20 μl de solução de glicose radioativa, a 28°C. Após o tempo de incubação apropriado, 80 μl da suspensão de células foram imediatamente filtrados e lavados com 2,5 ml de água gelada. Em seguida, os filtros foram transferidos para 5 ml de líquido de cintilação (*ACS Scintillation Cocktail*, Amersham Biosciences), e a radioatividade medida após 24 h, em um cintilador *Rackbeta liquid scintillation counter* (LKB).

Antes de cada ensaio, as células foram deixadas a 28 °C, por 2 min, para atingir a temperatura do experimento.

Células previamente fervidas por 5 min foram utilizadas como controle da radioatividade não específica, aderida à superfície da membrana plasmática ou aos filtros.

4.10 Transformação de *T. reesei*

A transformação de *T. reesei* foi feita pela técnica de bombardeamento de partículas, de acordo com Herrera-Estrella *et al.* (1990). Em termos gerais, esta técnica consiste no bombardeio das células alvo com micropartículas de ouro, ou tungstênio, recobertas com o

DNA exógeno. No interior das células, o DNA é dissociado das micropartículas e integrado ao DNA genômico.

Na transformação de *T. reesei*, foram utilizadas micropartículas de tungstênio M5, com diâmetro médio de 0,2 μm . Esporos de 7 a 10 dias de cultivo foram espalhados em placas de PDA, $\approx 10^7$ esporos por placa (82 mm de diâmetro), e deixados em um ambiente estéril com as placas abertas por 4 h. Em seguida, as placas foram bombardeadas sob pressões de 1400 e 1600 psi. ($9,65 \times 10^6$ e $1,10 \times 10^7$ Pa). Após o bombardeio, as placas foram incubadas a 28 °C, por 7h. Adicionou-se, então, uma camada de PDB-agarose 1 % (*potato dextrose* com agarose 1 %), suplementada com o antibiótico higromicina B (Hyg) para uma concentração final de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

O cassete de integração utilizado na transformação de *T. reesei* contém o gene *hph*, de higromicina fosfotransferase. Esta enzima inativa o antibiótico Hyg por fosforilação. Dessa forma, a seleção das células transformadas de *T. reesei* foi feita pelo plaqueamento em PDA, suplementado Hyg (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

Colônias dos primeiros transformantes surgiram entre 3 e 4 dias após a transformação. Na etapa de seleção, os transformantes foram transferidos, individualmente, para uma nova placa de PDA suplementada com Hyg, na mesma concentração. Após a repetição deste procedimento por 3 vezes, os transformantes foram transferidos para uma placa contendo apenas PDA e incubados por 7 dias para que ocorresse a esporulação.

Os esporos foram recolhidos e plaqueados novamente em meio seletivo. Nesta etapa, uma grande porcentagem dos transformantes não é capaz de germinar na presença do antibiótico. Os que se desenvolveram foram submetidos a uma nova passagem no meio seletivo e considerados, a partir daí, como transformantes estáveis.

5. Resultados

5.1 Identificação de transportadores de glicose em *T. reesei*

O banco de dados de ESTs de *T. reesei*, desenvolvido por nosso laboratório, contém 5934 seqüências expressas de DNA (ESTs), que compreendem 1713 genes unigenes, representados por seqüências parciais simples (*singlets*) ou agrupadas (*contigs*). Este banco foi obtido a partir do seqüenciamento aleatório, em larga escala, de duas bibliotecas de cDNA, A e B, preparadas a partir do micélio do fungo cultivado na presença de, respectivamente, glicerol e glicose.

Os dados obtidos do seqüenciamento da biblioteca A foram analisados e estão disponíveis em <http://trichoderma.iq.usp.br>. Em relação à biblioteca B, os trabalhos de análise encontram-se em andamento.

Os genes obtidos da biblioteca A, 1151 no total, foram classificados, de acordo com programa BLASTX (Altschul *et al.*, 1990) (NCBI), conforme discutido em Materiais e Métodos, em identificados (39%), com valores de *score* ≥ 80 , e não identificados (61 %), com *score* < 80 . Posteriormente, os genes foram classificados de acordo com a sua função, com base em critérios semelhantes aos do banco EGAD (*Expressed Genome Anatomy Database*), do instituto de pesquisa TIGR (*The Institute For Genomic Research*) (http://tigr.org/docs/tiger-scripts/egad_scripts/role_report.spl) (White *et al.*, 1996), nas seguintes categorias: divisão celular (1%); sinalização celular (2%); estrutura celular (1%); defesa celular (2%); síntese de proteínas (9%); síntese de RNA (2%); metabolismo (14%); não classificados, que compreendem os genes identificados não incluídos em nenhuma das categorias anteriores (5%); e desconhecidos, que apresentam similaridade com genes de função não determinada (3%) (Chambergo *et al.*, 2002) (Fig. 1).

Os genes identificados se distribuem em uma grande variedade de funções estruturais e metabólicas, compondo um quadro relativamente geral da biologia celular de *T. reesei*.

Trinta e sete genes, o correspondente a, aproximadamente, 2 % do número total de genes obtidos, estão envolvidos potencialmente em alguma função de transporte. Alguns exemplos são dados na Tabela 5, com a descrição do melhor alinhamento obtido pelo programa BLASTX, e os respectivos valores de *score* e *e-value* fornecidos pelo programa. Os genes apresentados estão envolvidos com o transporte de um número variado de substratos.

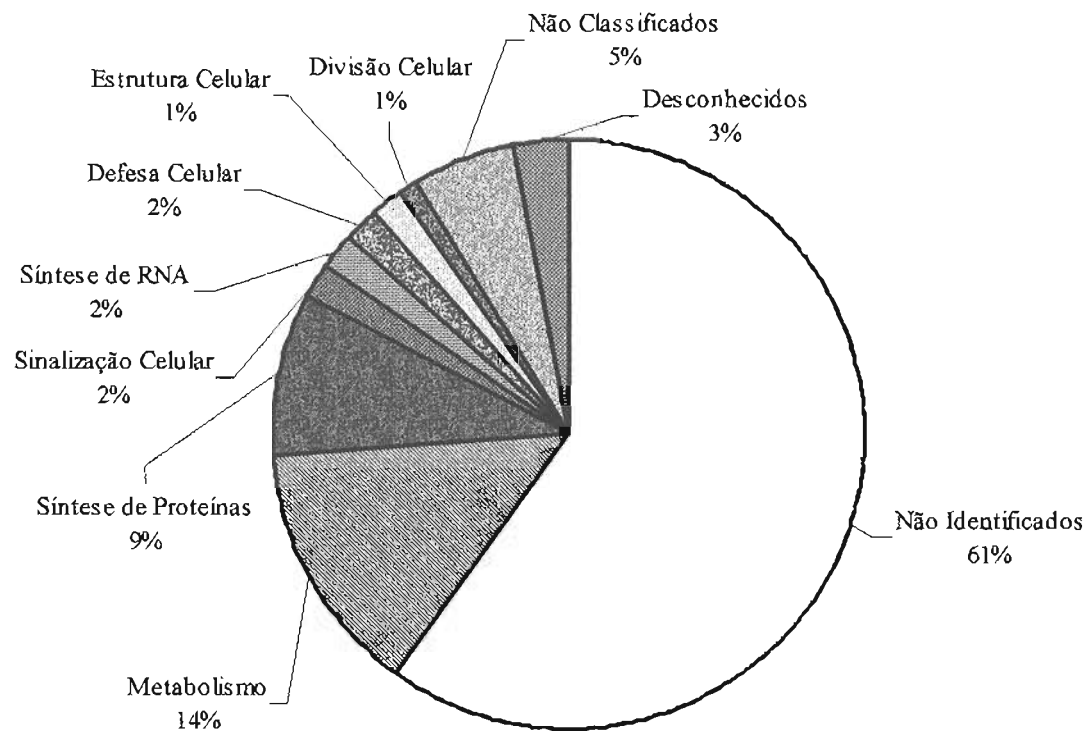


Fig. 1. Classificação de 1151 unigenes de *T. reesei*. ESTs com scores ≥ 80 , de acordo com o programa BLASTX, foram classificados, com base em critérios semelhantes aos desenvolvidos pelo Instituto de Pesquisa TIGR (*The Institute For Genomic Research*) (http://tigr.org/docs/tiger-scripts/egad_scripts/role_report.sp1), nas categorias indicadas. Não Classificados referem-se aos genes identificados não incluídos em nenhuma das categorias; Desconhecidos, aos genes que apresentam similaridade com genes de função não determinada; e Não Identificados compreendem os ESTs que não apresentaram similaridade significativa com o banco de dados *GenBank* (NCBI) (Chambergo *et al.*, 2002).

Tabela 5 Genes de *T. reesei* potencialmente envolvidos no transporte através de membranas

Gene de <i>T. reesei</i> ^b	Descrição	Melhor Alinhamento ^a			
		Organismo	AC # (gi) ^c	Score	E-value
TrEST-A0205	<i>Nuclear transport factor 2</i>	<i>A. nidulans</i>	14700035	101	7e-21
TrEST-A0798	<i>Putative carnitine/acylcarnitine translocase</i>	<i>A. thaliana</i>	17529160	95,9	3e-19
TrEST-A1178	<i>Protein transport protein SEC13</i>	<i>P. pastoris</i>	18266896	143	2e-33
TrEST-A2463	<i>Outer mitochondrial membrane protein porin</i>	<i>N. crassa</i>	130684	169	3e-41
TrEST-A3437	<i>Purine nucleoside permease</i>	<i>C. albicans</i>	3764057	173	2e-42
TrEST-A3696	<i>Putative tricarboxylate transport protein</i>	<i>S. pombe</i>	19115332	199	2e-50
TrEST-A3723	<i>Putative calcium P-type ATPase</i>	<i>N. crassa</i>	6688829	168	4e-41
TrEST-A3772	<i>High-affinity iron permease CaFTR2</i>	<i>C. albicans</i>	7770293	138	3e-32
TrEST-A3961	<i>Amino-acid permease</i>	<i>S. pombe</i>	19115921	226	2e-58
TrEST-A1178	<i>Probable phosphate transport protein MIR1</i>	<i>N. crassa</i>	11595705	164	1e-39

^a Conforme discutido no texto, a identificação dos genes de *T. reesei* foi feita pelo programa BLASTX. Os dados apresentados na tabela correspondem aos genes com os quais os ESTs de *T. reesei*, *singlets* ou *contigs*, identificados na primeira coluna, apresentaram os melhores alinhamentos

^b Identificação dos genes de *T. reesei* no banco de dados de ESTs

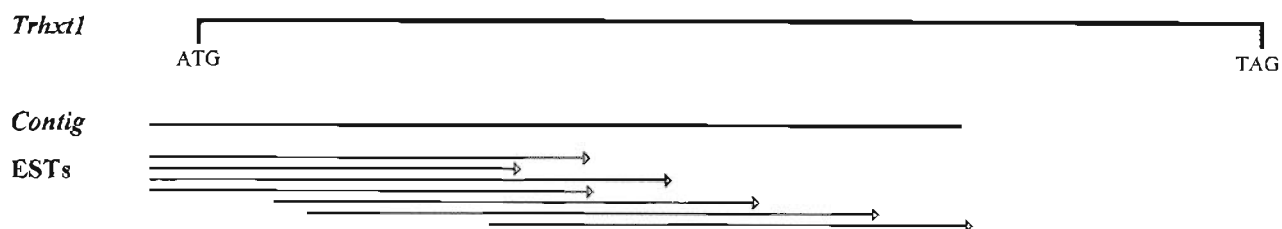
^c *Accession number*, de acordo com o *GenBank*^e

Dois genes supostamente envolvidos com o transporte de carboidratos, *Trhxt1* e *Trhxt2*, foram identificados e constituem o objeto de estudo deste trabalho. Devido ao fato de *Trhxt2* ter sido identificado mais recentemente, os dados disponíveis sobre este gene são, conforme se poderá notar, ainda preliminares.

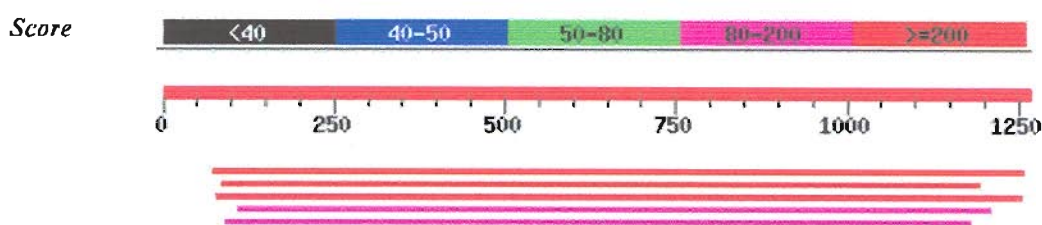
O gene *Trhxt1*, identificado no seqüenciamento da biblioteca A, está representado no banco de dados por um *contig*, constituído de 7 ESTs. Na Fig. 2a, temos uma representação esquemática destes ESTs e do *contig* correspondente. A seqüência codificadora de *Trhxt1*, cujo seqüenciamento está descrito posteriormente, também está representada. Podemos observar que o *contig* obtido inicialmente compreende uma grande parte de *Trhxt1*.

Os cinco melhores alinhamentos produzidos pelo programa BLASTX para a seqüência consenso deste *contig* - gerada pelos programas *phred/phrap/crossmatch* (Ewing *et al.*, 1998; Ewing & Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998) – estão apresentados na Fig. 2b. Observamos que a seqüência parcial de *Trhxt1* apresenta similaridade com transportadores de glicose de diferentes microorganismos.

A



B



Descrição	Organismo	AC # (gi) ^a	Score	E-Value
putative glucose transporter, Gtt1	<i>T. harzianum</i>	20135735	744	0.0
high affinity glucose transporter, Hgt1p	<i>K. lactis</i>	1346290	342	6E-93
high affinity glucose transporter, Hgt1p	<i>C. albicans</i>	6016201	303	4E-81
monosaccharide transporter, AmMST-1	<i>A. muscaria</i>	2258125	188	1E-46
galactose-proton symport, GalP	<i>Salmonella enterica</i>	16761866	178	1E-43

^aAccession number de acordo com o GenBank (NCBI)

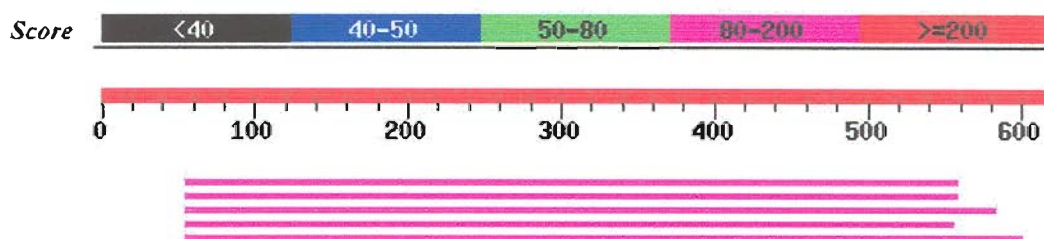
Fig. 2. Identificação do gene *Trhxt1* de *T. reesei*. A) Representação esquemática dos 7 ESTs de *Trhxt1* identificados no banco de dados de ESTs de *T. reesei*. O *contig* indicado na figura foi gerado pelos programas phred/phrap/crossmatch, conforme discutido no texto. Toda a seqüência codificadora de *Trhxt1* está representada sobre o *contig* (em escala). B) Os cinco melhores alinhamentos obtidos na análise do *contig* indicado em A pelo programa BLASTX. [Adaptação de resultados fornecidos pelo programa BLASTX (NCBI).]

O gene *Trhxt2*, por sua vez, foi identificado no seqüenciamento da biblioteca B por apenas um EST. O desenho esquemático deste EST e os resultados do BLASTX estão apresentados na Fig. 3. Conforme os resultados indicam, o EST de *Trhxt2* também mostra similaridade com transportadores de glicose de vários outros microorganismos. O EST de *Trhxt2* corresponde à porção final do gene, ao contrário do que se observa no caso de *Trhxt1*.

A



B



Descrição	Organismo	AC # (gi) ^a	Score	E-value
monosaccharide transporter, AmMST-1	<i>A. muscaria</i>	2258125	157	9E-38
high-affinity glucose transporter, HXT1	<i>U. fabae</i>	14348970	112	3E-24
low-affinity glucose transporter, Rag1p	<i>K. lactis</i>	131828	102	3E-21
glucose permease, Rgt2p	<i>S. cerevisiae</i>	6320063	102	4E-21
high-affinity hexose transporter, Hxt11p	<i>S. cerevisiae</i>	6324417	101	6E-21

^a Accession number de acordo com o GeneBank (NCBI)

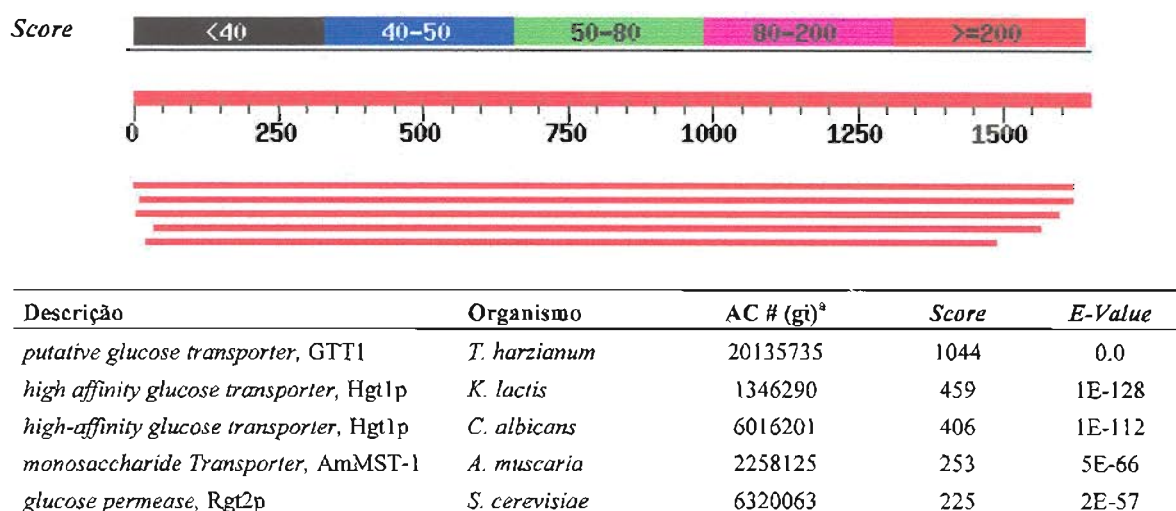
Fig. 3. Identificação do gene *Trhx2* de *T. reesei*. A) Representação esquemática do único EST de *Trhx2* identificado no banco de dados de ESTs de *T. reesei*. Toda a seqüência codificadora de *Trhx2* está representada acima do EST (em escala). B) Os cinco melhores alinhamentos obtidos na análise do EST indicado em A pelo programa BLASTX. [Adaptação de resultados fornecidos pelo programa BLASTX (NCBI).]

Na atribuição de função a uma determinada seqüência nucleotídica, através do programa BLASTX, é preciso analisar os resultados obtidos com certa cautela, dada à possibilidade de que o alinhamento produzido pelo programa esteja restrito a uma pequena região da seqüência analisada. Pode ocorrer, por exemplo, que 2 proteínas com funções diferentes apresentem um pequeno domínio conservado, não havendo similaridade significativa entre elas além desta região.

Após o seqüenciamento completo dos genes *Trhx1* e *Trhx2*, a análise de suas seqüências nucleotídicas pelo BLASTX forneceu resultados semelhantes aos obtidos inicialmente com os ESTs. Nos dois casos, observamos alinhamentos significativos de TrHXT1 (Fig. 4) e TrHXT2 (Fig. 5) com transportadores de glicose de vários

microorganismos e, em especial, com transportadores de outras espécies de fungos filamentosos.

Além disso, cabe ressaltar que os alinhamentos apresentam uma boa cobertura, isto é, a similaridade de TrHXT1 e TrHXT2 com diferentes transportadores de glicose se estende por praticamente todo o comprimento de suas seqüências.



^a Accession number, de acordo com o GenBank

Fig. 4. Análise da seqüência nucleotídica do gene *Trhxt1* de *T. reesei*. Apenas a seqüência nucleotídica do gene, do códon de iniciação ao códon de terminação, sem a presença de *introns*, foi submetida à análise pelo programa BLASTX (NCBI). Os 5 melhores alinhamentos obtidos pelo programa estão indicados, com os respectivos valores de *score* e *e-value*. [Adaptação de resultados fornecidos pelo programa BLASTX.]

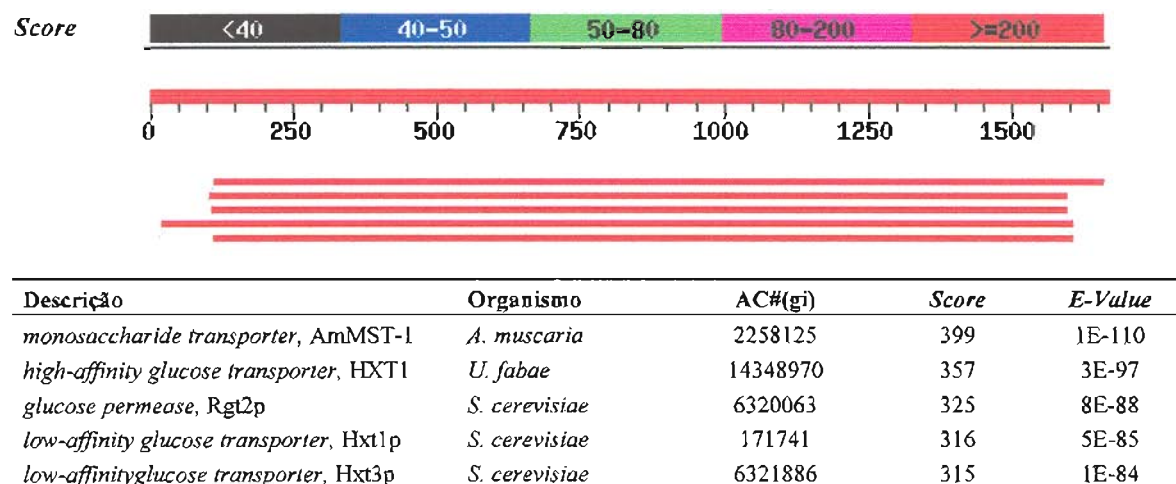


Fig. 5. Análise da seqüência nucleotídica do gene *Trhxt2* de *T. reesei*. Apenas a seqüência nucleotídica do gene, do códon de iniciação ao códon de terminação, sem a presença de *introns*, foi submetida à análise pelo programa BLASTX (NCBI). Os 5 melhores alinhamentos obtidos pelo programa estão indicados, com os respectivos valores de *score* e *e-value*. [Adaptação dos resultados fornecidos pelo programa BLASTX.]

5.2 Clonagem e seqüenciamento

Em relação ao gene *Trhxt1*, o plasmídeo p27 (Fig. 6), correspondente ao EST com a extremidade 5' de maior comprimento, foi utilizado nos trabalhos de seqüenciamento. O inserto de p27 ($\approx 1,8$ kb) foi seqüenciado por *primer walking*, utilizando-se um conjunto de 12 oligonucleotídeos (veja a Tabela 3, em Materiais e métodos).

Paralelamente, o inserto de p27 foi utilizado como sonda na triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*, construída no fago Lambda DashTM II (Stratagene) (Matheucci, 1993). Dois fagos, denominados de λ HXT1a e λ HXT1b, foram obtidos na triagem desta biblioteca e analisados por *southern blot*. Fragmentos de mesmo tamanho foram obtidos na clivagem do DNA de ambos os fagos com várias enzimas de restrição. Na clivagem com a enzima *Bam*HI, foram obtidos dois fragmentos, de 2,2 e 4 kb. Estes fragmentos foram clonados no vetor pBluecript KS (-) (Stratagene) e os plasmídeos correspondentes denominados de pTH2 e pTH4 (Fig. 6).

O plasmídeo pTH2 abrange a maior parte da seqüência codificadora de *Trhxt1*; a extremidade 3' do gene está contida em pTH4. O inserto do plasmídeo pTH2 e parte do inserto de pTH4 foram seqüenciados com o mesmo conjunto de oligonucleotídeos utilizado no seqüenciamento do plasmídeo p27, isolado de uma biblioteca de cDNA.

O seqüenciamento da região promotora do gene *Trhxt1* foi feito por uma abordagem diferente. Neste caso, fizemos o seqüenciamento por *shotgun* de uma biblioteca construída com o DNA do fago λ HXT1a, no vetor pUC18/SmaI/BAP (Amersham Biosciences), conforme descrito em Materiais e métodos. A fim de facilitar o trabalho de seqüenciamento, identificamos e isolamos, primeiramente, um fragmento de, aproximadamente, 5 kb, contendo a região promotora de *Trhxt1*. Em seguida, fizemos uma triagem da biblioteca do fago com este fragmento, e apenas aqueles clones que hibridizaram com a sonda foram utilizados no seqüenciamento.

A comparação entre as seqüências de cDNA e do DNA genômico revelou a presença de uma ORF de 1644 nucleotídeos, interrompida por dois introns, de 55 e 57 pb. A seqüência de aminoácidos prevista codifica uma proteína de 60,4 kD (Fig. 7).

Doze segmentos transmembrânicos previstos computacionalmente (veja discussão posterior) estão indicados na seqüência nucleotídica de *Trhxt1*.

Na análise da região promotora de *Trhxt1*, identificamos uma provável seqüência TATA, localizada na posição -148, em relação ao primeiro nucleotídeo do códon de iniciação.

Um sítio de ligação da proteína Cre1, envolvida na repressão por glicose em *T. reesei* (Strauss *et al.*, 1995; Takashima *et al.*, 1996) foi localizado na posição -1361. Este sítio está sublinhado na Fig. 7.

Sítios de ligação semelhantes aos de HIF-1, de células de mamíferos, ou ao sítio LORE, identificado em *S. cerevisiae*, não foram identificados no promotor de *Trhxt1*. Estes elementos em *cis* estão envolvidos com a indução de genes hipóxicos na carência ou na ausência de oxigênio.

O gene *Trhxt2*, conforme dito anteriormente, foi identificado no seqüenciamento da biblioteca B. Apenas um EST foi obtido. O inserto do plasmídeo correspondente, denominado de p26 (Fig. 8), é de, aproximadamente, 600 pb.

A biblioteca B, ao contrário da biblioteca A, é normalizada, conforme discutido em Materiais e Métodos. Em uma das etapas de sua construção, o cDNA foi clivado com a enzima de restrição *RsaI*, tendo-se obtido uma população de moléculas cDNA fragmentada. Por esta razão, a fim de obtermos um clone de cDNA completo do gene *Trhxt2*, fizemos a triagem da biblioteca A, utilizando-se o inserto do plasmídeo 26 como sonda. Os clones obtidos foram analisados por *southern blot* e seqüenciamento. Apenas um deles, no entanto, correspondia ao gene *Trhxt2*. O cDNA correspondente de, aproximadamente, 1,8 kb de comprimento (p28), continha mais de 80% da seqüência codificadora de *Trhxt2* (Fig. 8).

A seqüência completa do gene *Trhxt2* e de parte de sua região promotora foi obtida de forma análoga ao que foi feito para a região promotora do gene *Trhxt1*. Primeiramente, fizemos a triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*. Os fagos obtidos foram analisados por *southern blot*. A seguir, construímos uma biblioteca com o DNA isolado de um dos fagos. Esta biblioteca foi, então, seqüenciada por *shotgun*.

Uma ORF de 1662 nucleotídeos, interrompida por apenas um intron de 71 pb, foi identificada. A proteína prevista pela seqüência de nucleotídeos é de 60,5 kD (Fig. 9).

Doze segmentos transmembrânicos também foram previstos na análise computacional da seqüência de aminoácidos da proteína TrHXT2 (veja discussão posterior).

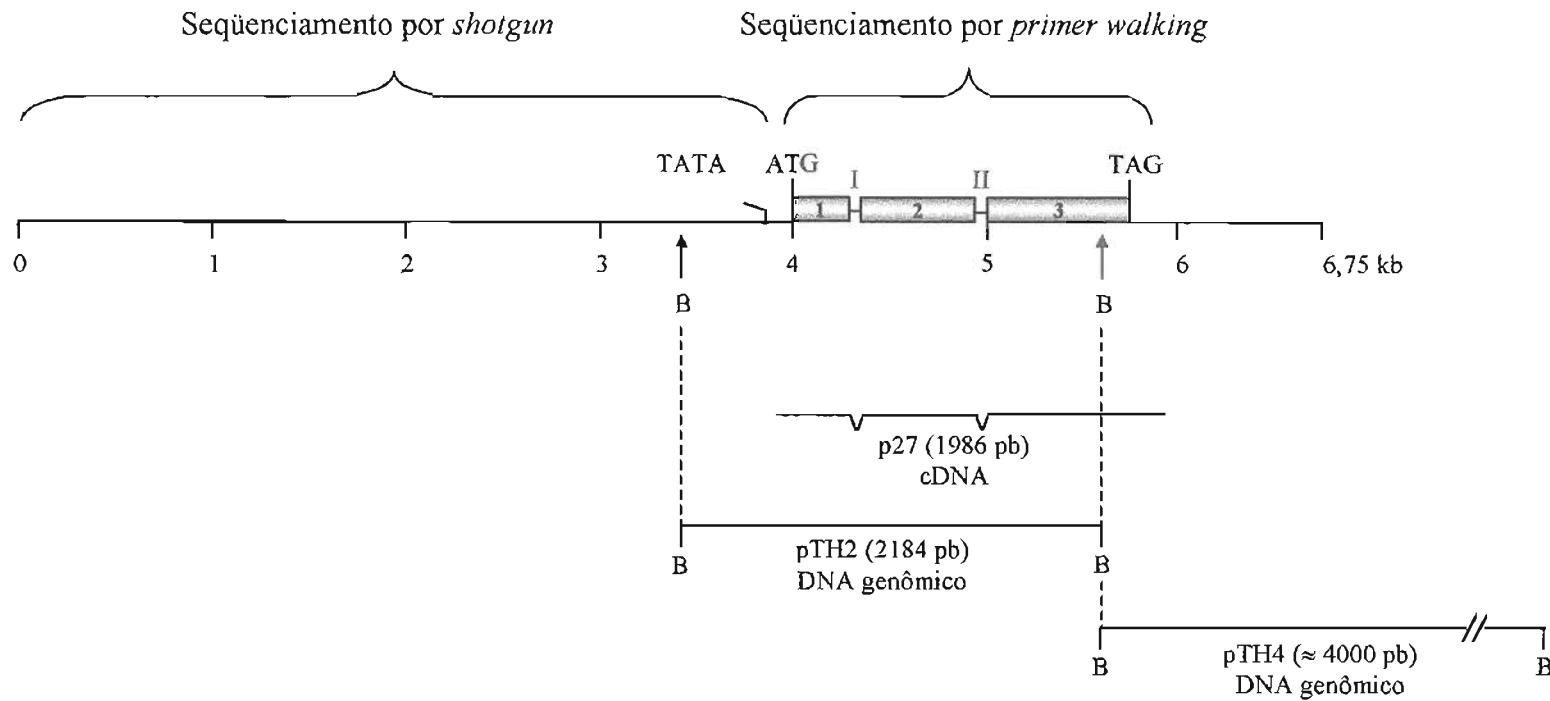


Fig. 6. Representação esquemática do locus *Trhxt1*. A seqüência codificadora do gene *Trhxt1* foi seqüenciada por *primer walking*, a partir do plasmídeo p27, isolado de uma biblioteca de cDNA, e dos plasmídeos pTH2 e pTH4, contendo fragmentos de, respectivamente, 2,2 e 4 kb, do DNA genômico de *T. reesei*. Os sítios de *Bam*HI, indicados por setas, foram utilizados na construção de pTH2 e pTH4. A região promotora de *Trhxt1* foi seqüenciada por *shotgun*, neste caso, fizemos o seqüenciamento de uma biblioteca construída com o DNA de um fago isolado na triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*. O seqüenciamento da região 3' do gene *Trhxt1* também foi obtido por *shotgun*. As caixas e linhas representam, respectivamente exons e introns de *Trhxt1*.

-4008 CCGCGGAGGTATAACTCTATAGAGAAGCGACAG
-3975 AGCTGCCTCGGGAGTTGATTGGCCGCTCGGCAACATGCTGCTTGCCGTGAAGGGATTCTAGGCCAGGCCAGGCAG
-3900 TGGTTGATTGCCGTGCGCTGGTGGCCTTGGGGTCTCTGGTAGAACTAGCAAGCCGGTCGGACGAGGCTGGTGTG
-3825 GCGACGTCATATAGTCCGAAGAGCGAGGAGTTGTCAGTATGTTGAAGTTGGGTGAATATGTCATGTGATGGGCTG
-3750 GTGTTGGATTGGAGTCGTAGATGTATTAGAGAGGCGTCTGTTATGGATCGGTGGTTAGCACAGGTGACAAAGAC
-3675 GATGGGCGATTGGCGAAGCAGAAGCATTCCTAGGCCCTGGGGAAAGCTGCAGGGCTTTGGCCGCCGCTGGCACCCTG
-3600 TCAACCACACCGTCCCTAGATGCAAGCATCGCATCCAGGCCATGTGCGACGTCTCCAACCATGACATTGACGTGT
-3525 CAGAAGTCGTGCGATACTGTGCAATCTTGTGTGTCATCGGATCATCGCGGTGGAGAGAGAGAGAGCTGAATTGGA
-3450 GAGAGGGATCCAAAGGGGAGCTTGGATTGTGCTCCCCTGACGACTGGCCCTGGTGAAGGTGAGAGAGAGCGTGAG
-3375 AGCGGGAGCGGATCGGCAAGGCTTGAGCAAGGACAGGCGGAGCGGAGGAGAGAAGGTGGTTCGAATCAGCAATGC
-3300 GGAGCTGGAGCCAGTGGTGTGACAAACAAACGGCCAAGAGTGAGGCTATCTGAACTGAATAGTGTGTATTATGG
-3225 ATTTGTAATAATATAGTAGTACAAAACAGAGCAGGACCAGGCAAGGGGGACAAGAACAGCAAGGCCATGGCTGGA
-3150 TGATTGGTGGTGGTACTGTAGACGGCTGATGCGTGAAGGAGGAGAAAAGATTCATGCTGGATGTTCAATTTTGGCT
-3075 GGAGTGAGTCTGTCTATGCCGTGTCATGTGTCATGTACGAGTATTGCTTGTGCCTGCCGTTTGGAGTGGGTTACTGT
-3000 GCAGATGGCATCAGCTTGATACTGTGTGGCTCCTTCGCAACAGGCGATCACTGCCGTTCTGAGTGGTGTATGGA
-2925 CAGAGGAAAGAGCGTTCGCCGTATTTGCTGCGGGGACAGCAGCTGGGGTTTGGAGTCAATTTGACGAATAACGC
-2850 CGATTGTTTAGATGGGGTTTTCTGTTCCCTGTTCTTGCCCTCTTTTTTTTTGGGTACCTGTATGTAGTACCTGGGGT
-2775 TTCCTGGGGCTGAGATGAGATGCCATCATCCCCTTTCACCAGGAACACGGCGGTAAAGACGACTTATCTTACG
-2700 CTTTACACTCATACTGACGAAAGCGACCAGACTCTCTACTACAGCTCTCATAGACCAGCTGCTACCACTACCGAC
-2625 TGCCGCTCGTCTGCATTGCCGTGCCAAAGCCGGCGGAGGATAATCTGAGCCAGGGCGACGTCATTTGGCCAAAGC
-2550 CGGGGAAAGTGGAGAGCCCACTAGCCAACCGCCAGGCGCTTCTTCAGTGGCGCCGAGGCCAACAGGCCCTGGG
-2475 CGTCGGGAGCTAGGCCGCGAGCGGACAAGGCCGGGCTTGGGCGAGCTTGAACCTCCATCTTTGGACAGGCCATG
-2400 ATGACAATACACGTACCTATCTACGAGCAATATGGAGGAGCCAGGTCTATGTTTCGGCTGCTCTTGGGCGTGTAT
-2325 GTTCACGGATTACCCATATGTGCAGACTACCTACGTAGGTGCTATTAGTAGGCGTTAATATGCTACAATAATCT
-2250 TACTCGTACTACCAGGAAAAAGGCCCTGCTGGTAGCTGTAGAGACGGATTGAGTATTGAAACGCCGGTACATACC
-2175 TCTATGGAGGACAGACAAGGATGGAGCGAAAGCGCCCCAAAACAGCCAGAGAGAACATAGCACACACACCAC
-2100 ACCGCAGCAATATGCATGCACGTCAATGGGTGCTTGCTCCTCAAGTAATAAGTCTCGAACGAAACAGAGATGCTG
-2025 CTGATAAATATCCTCGACAACACCGGCAACTTGCTGCCGAGCGCCAGCGCAACACTCGTACTCTCACAAACAGC
-1950 CAGTCTTCTTGGCAGACCACATCCTCGCTGAACTACCTACATCTGTATTATCGCCTTCAGGCGACCAGCTTCTAG
-1875 TGGCCATCTAGACGAACCGAGTCCAGTCCCCCTCCCCCAATTCTCACGCCCTCTCCCCAACGGCCAGAC
-1800 TCTCGGCGACATGCAACCCCCAGATGACCCCGGGGGGACGCTTGCAATGACCCAAATGGAACCGGCCGGCGATC
-1725 CTCCAGCATGGGGCTTAGTTCCGGGCGGGGTGGCACGAGCTTTTCCAACCTCTCGCGCCGTGGAAACAGACGTTG
-1650 AACCGCGATTCTACGTGTAACAGTGATCCGTACCATTGTCTTTCGCGTCTCATATTGGCAGGACCAGCAATGGA
-1575 AGAAGCATGCGTAAAACACTAGTACATAATACATACACGTGAGGAGTCAGAGCTGGAAAGCTCAACAACCGGGGC
-1500 CCCAAGGATTACAGAAATGGCAAGACTTCGGCCTGTGTGACGGCGGGTGGTGTACCAGGCTTGTATGCCATGTATG
-1425 GAAGTACATGTAGGGGCTGTGTTCGTGCTCGTACAAGGACTGCTCGTAATGGCACCACGAATGGCGGAGCTGAT
-1350 GCTTTTTTGGTGTGTTAGTCGAAAGGATCATGAGCGGTGATGCTGCCGTACGTGACACGGCCTGTTGCTGCATC
-1275 GATTGGGTTTGCAGGATCGTATCATGTGCAGAAATGCGACTTGATGTTGGGCACTTGGATGATCCTGAAAGCTGA
-1200 GGCACAAGCGAGAAGATCACCTCAACTGTTGGGAGGTACCTACAGAACAGAACAGTCAGTACACTGTTGGCACA
-1125 ATCATTCACCACACTTCTTGTGAGGTGTGCGTCATCGATCCAGATTGTACTCATCTCGCACCTCGTACCCCA
-1050 GACAGCCACACTACCTGAGTATTGAACCAATACTATCCAAGTCCATCCCCAGTCCCAATAATCTTGGGGACACAG
-975 ACATTGAACCAGAAAATACCAGGTAAAAGTTGGAGGGGAGGCGGGGAGCAACTGGCAAGCTTTTAGGCCCTTT
-900 TTGGGGAAATGCGATTCGAGGTTCAAGGGGGTGTGAGGCCCTTGTCCAAGGTACACAACGCCGGATGGGGCAGT
-825 ACTCGAAGCGGCGCTACAGGTACTTGCAGGCGGGCCATGCAAGGCGAGACAAGGCTTGCCAGCTTTGCTCCA

-750 TCATCACCTTGCTTTGCCCATCCCGCATGCGACTTACACGCGCTCACCTCCCGACAGACCCCTGCGCGTGCCTGT
 -675 ACCGTTGCAGCAGGGCATCCCGCAAGCGTCAGTACCTGCTACCGGCAGCCATGTA CTGATACACCGTACCCC
 -600 GGATCCTGCAGACGCAAGTGGCTTCAATGCTCCGAGCATCTCTCCTGATGGGACTCCATGGGGAAATCTCCAGGC
 -525 CTGGGGCCAACAGCCTACAGGTAGTACTGCCTAGTACTACCTATGGACCTAGAGTTGGGCGAGCGTGCAGCAGCA
 -450 GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGATGACAAGGGACAGGGGTC
 -375 GGGGCAAGTGAATCCGGTCTCGTGTGCTCTGCCACCTCACTTCATGTTCCACATGCCTGTCTGGCAGCAGC
 -300 TTGCCCTGCTCTGCCCTGCTCTGCTCTGCCCTGCTCGAGCCAACCAGCCAGCTGCCCGCCATCACTCACTACCTA
 -225 CCTACCTACCTACCTACCTGCCTGTCGATTGGCAGCTGCTCGCAGCAGCTTCCGGCGTAACAACCACCCGAGCACA
 -150 CATATATAGCCCATCTCCCTTCTCTCTCCCCCCCAATCCCACTCTTCTCTCTTGAACGCCCCCTTCTCTCT
 -75 TGTCCTCCCGCTACCAAACCGCTCATGGTCACGGCCCTCTCTGCAAGAGTATCAAAGAGTGACAGCCTCAGCC
 1 ATGCCCATGGCAACATCTACGTGATCGCCGGCGTGTCCGTGCTCGGCGGCGGTTGTTCCGGCTTCGACATCTCG
 M P T G N I Y V I A G V S V V G G A L F G F D I S 25
 76 TCTGTGTCGGCCAGCTGGCCGAGCAGTCGTACCTCTGCTACTTCAACCAAGATGAGAATCCGCCACCACCGTCT
 S V S A Q L A E Q S Y L C Y F N Q D E N P P T T V 50
 151 GATGGCACCTGTGGTGGCCCGGGTCCCTCGTCCAGGGCGGCATCACGGCCTCCATGGCTGCTGGGTCTGGCTG
 D G T C G G P R S L V Q G G I T A S M A A G S W L 75
 226 GGCGCCTGATCTCGGGTCCCTGCTGATCGCCTGGGCGCAAGTACTCCATCATGGTCCGATGTATCATTTGg
 G A L I S G P L S D R L G R K Y S I M V G C T I W 100
 301 tgagttgaagaagaaccaagaggggaagagcatcacgattgctaacagatgtcagGGTTATTGGCTCCACCCTCTC
 V I G S T L S 107
 376 GTGCGCTTCTCAAAACATTGGCATGCTCATTGTGCGCCGATATCAACGGTCTCTCCGTCGGTATCGAATCTGC
 C A S Q N I G M L I V A R I I N G L S V G I E S A 132
 451 TCAGGTCCCGTCTACATTGCCGAGATTTCCGCTCCCTCCAAGCGCGGCGCTTCATCGGCATGCAGCAGTGGGC
 Q V P V Y I A E I S P P S K R G R F I G M Q Q W A 157
 526 CATCACCTGGGGCATCCTCATCATGTACTACATCTCCTACGGCTGCTCCTTCATCGGCAAGCAGAACCCTCTCGA
 I T W G I L I M Y Y I S Y G C S F I G K Q N P L E 182
 601 GTACAACACTGCCTCGTGGCGTATTCCATGGGGTCTGCAGATGATTCGCGCTTCTTCTCTTCTTCATGATGAT
 Y N T A S W R I P W G L Q M I P A F F L F F M M M 207
 676 GCCGCTTCCCGAGTCTCCCCGTTGGCTCGCCCCGAAGGACCGTGGGAGGACTGCCGCGCGTCTCACCCCTCGT
 P L P E S P R W L A R K D R W E D C R A V L T L V 232
 751 CCACGGCAAGGGCGATCCCAACCACCCCTTTGTTGCCCTACGAAGTGCAGGACATCAAGGACATGTGCGAGTTGA
 H G K G D P N H P F V A Y E L Q D I K D M C E F E 257
 826 GCGTCGCCATGCTGATGTCACCTACCTCGACCTGTTCAGCCCAACATGCTCAACCGCACATTCATTGGTCTCTT
 R R H A D V T Y L D L F K P N M L N R T F I G L F 282
 901 TACCAGATCTGGTCCCAGCTGACGGGCATGAACGTCATGAgtgagtatcccagaaacaccctccttttgggctg
 T Q I W S Q L T G M N V M 295
 976 agcaaagctgacttggttctcagTGTACTACATTGCCAACATCTTCTCCATGGCTGGCTACAGCGGCAACGCCAA
 M Y Y I A N I F S M A G Y S G N A N 313
 1051 CCTGCTCGCCTCGTCCATCCAGTACATCAACGTGCTGATGACCATTCCCGCCTGCTTTGGGTCGACAAATG
 L L A S S I Q Y I I N V L M T I P A L L W V D K W 338
 1126 GGGTCGCGTCCACAGCTGCTCGTGGTTCGGTCTCATGGCCCTGTGGATGTACGCCAACCGGGTATCCTCGC
 G R R P T L L V G S V L M A L W M Y A N A G I L A 363
 1201 CACCTACGGTGAAGTCGTCCCCGGCGCATTGATCACGTGCTGCCAGTCGATGCGTGTCTCGGGCGCCCTGC
 T Y G E V V P G G I D H V A A Q S M R V S G A P A 388
 1276 CAAGGGTCTCATTGCCTGCACGTACCTGTTTGTGGCCTCGTTCGCGCCACCTGGGGTCCCGTCTCGTGGACCTA
 K G L I A C T Y L F V A S F A P T W G P V S W T Y 413
 1351 CCCTCCGGAGCTGTTCCCCCTCCGCTCCGAGGCAAGGGCGTGGCTCTGGCGACTCCGGAAACTGGGCCTTCAA
 P P E L F P L R L R G K G V A L A T S G N W A F N 438
 1426 CACGGCGTGGGTCTCTTACCCCGGTGGCCTTTGCCAACATCAAGTGAAGTCTACCTCATCTTTGCCATCTT
 T A L G L F T P V A F A N I K W K S Y L I F A I F 463
 1501 CAACACTGTGCTCTTCTTCCACGTCTTCTCGTCTTCCCGAGACGGCCGGCAAGACGCTCGAGGAGACGGAGGC
 N T V A F F H V F F V F B E T A G K T L E E T E A 488

```

1576 CATGTTCGAGGATCCCAACGGCATCAAGTACCTGGGCACGCCCGCGTGGAAAGACGAGGGTGGCCACGAGCCTCAC
    M F E D P N G I K Y L G T P A W K T R V A T S L T 513
1651 GGAGCGTGCCGAGCACGGCGACATTGAGGCCAAGATTGGCCATGACACGGAGAAGCCTCCGGTCCACACTCACGA
    E R A E H G D I E A K I G H D T E K P P V R T H E 538
1726 GGAGGAGAAGGCCAGCACTCCCCCTCCCAGTAGATGGGGATGCGTGATGAGACATCTTGATTCCGATATGTAAAG
    E E K A S T P P P Q * 548
1801 GGGATGTGATTTGTTGATACCCGATGGGAGGTGCTAGCGTTGCCAGATGTGCAGCGCTTAATAGTCGTCTATACC
1876 AATACATTGCAATTGCAGTCTATCAGTCTGTGCCTTGACTCGTGATGAACCCCTGAACCAATTGCTACCAATACA
1951 TGTACGTGACGTGAAGATGAATGGCAGCGGAAAGTGTGTGCTAGGATGAAGTTCTGATATGACTAAGCTGGGACG
2026 TTGACATCTCATCGCCAAAGACTCGGCCTCATCCCCCTCAAACAAAACAGAGAGACTCGTCTCATTTTCAGACATC
2101 TTGCTCATCGGAGAGTATATGTTGAAGGTCTCATTTCTATGTATAGACGCTATGTACTATCTATCCAAGTATTCT
2176 CACAGTCTCTGTATCTGTATCTGTATCTCTGTATCCAGTAATCCTTCATCATTGAAAAGCAAACGCCGTGCCATG
2251 CCATCCCACGCTCATATCAGCATTCTATAACCCGACATCTCGCACATCATCAAATGCTCATCGCTTCTCTATCCCA
2326 CCAAATCCGCGCTTTCGTTACAAAAGAGAAAAGATACACTCTCATCGTCCATCATCCCAGCCAACCCACCTCCG
2401 AATAATATCATCCACAGTCCGCACCGCGTCCCTCGAAGCCTCCACCTCGAACCCTCCTTGTGCTCCCGCCACAC
2476 CGTCTCGCACGCGCCAGATCGGCGCGCAGCCCATGCCCGTGAGCTCAATGTGAATCAGCCGTTCCACCTTTTT
2551 GACGTGCGGCGTGGGATGGGGCGAGGCGGCGCTCGCCGGAGACGGGGATCGACCGGCGCCCTTGGTTGCTGCTGC
2626 TGAATGCGCGGACGTGGCGTCGAACGAGGCCGGGTGGAGGACGAGGACATGTATGGGTAGAAGCGGAGGAGCTG
2701 GATCGAGTGGCCGCACTGGCGGGACCATTGGTTCATGCGGCG

```

Fig. 7 Sequência nucleotídica e de aminoácidos prevista para o gene *Trhx1*. Os códons de iniciação e terminação estão indicados em negrito. Os dois introns identificados na sequência codificadora de *Trhx1* estão representados por letras minúsculas. A numeração à esquerda corresponde à posição dos nucleotídeos em relação à adenina do códon de iniciação; os aminoácidos estão numerados à direita. A análise computacional de *Trhx1* revelou a presença de 12 segmentos transmembrânicos, indicados pela área sombreada. Uma provável sequência TATA, localizada a -148, e um suposto sítio de ligação de CRE1 na região promotora do gene, na posição -1361, encontram-se sublinhados.

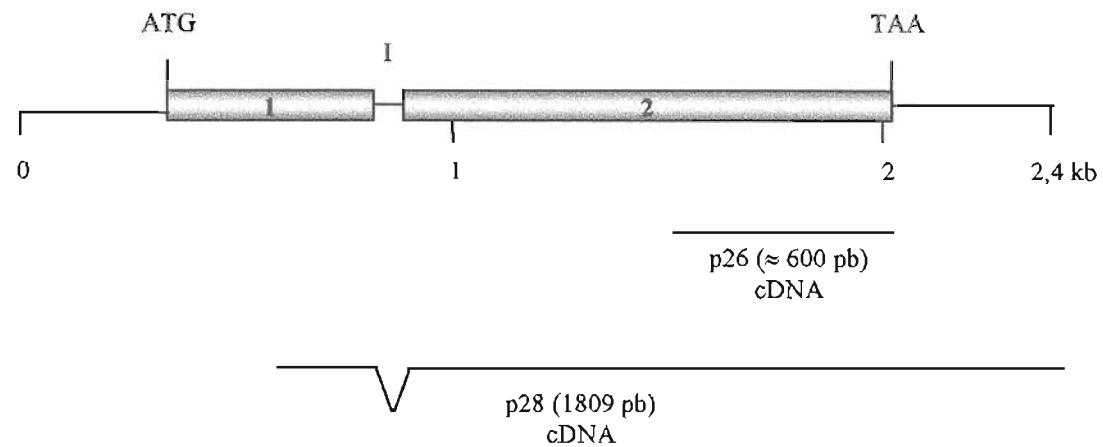


Fig. 8. Representação esquemática do locus *Trhxt2*. O fragmento de 2,4 kb apresentado na figura foi seqüenciado por *primer walking* e por *shotgun*. O plasmídeo p26, isolado da biblioteca de cDNA B, e o plasmídeo p28, isolado da biblioteca de cDNA A, foram utilizados no seqüenciamento por *primer walking*. A seqüência completa do gene foi obtida através do seqüenciamento por *shotgun* de uma biblioteca construída com o DNA de um fago obtido na triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*. As caixas e linhas representam, respectivamente exons e introns de *Trhxt2*.

-351 TGGTCTGATCTGGGCTTGGTCGATGGGCGACGCTCCAATGGCTCGACGCTC
 -300 GCTCCTCCGGCTGACTCTGGCTCCTCCTGCTCTGCGCTTCGCTGGACGGACGGACTCGCTCGCTGGTCCC
 -225 GCGTCACGACAATAAAAAGGCCGGCCTGCCTCCCGCCCCCTCTGCTCCTTCTCCTGTCTCGCCTCGTGGTCT
 -150 CTGTCTCACGCAACAAGAGTCGTTCCGTTCACTCGGCCGGGTCTCGTCTTCTTCTGCCATCCCCAGCCAGC
 - 75 ATCTTCACTCCCACGCGTCAAGTCAACAAGAGTCCCCCTGAACAAAAAAGACAAGCCCAGCGTCGACCGCAGCC
 1 ATGGCCGACGTCCACGTGCGAGACGCCCCAGAGGGCCGCAAGCAGTCCATCGGCATCCATAACCACCCAGGATGTC 25
 M A D V H V A D A P E G R K Q S I G I H T T Q D V
 76 GAGCACATCGAGGCTCCCATCACCTGGAAGGCCTACCTGATGTGTGCCTTGCCTCGTTGGTGGTATCTTCTTC 50
 E H I E A P I T W K A Y L M C A F A S F G G I F E
 151 GGCTACGACTCCGGTTACATCAACGGCGTCAACGGCTCTGCCATCTTCTACAAGGCCGTTGAGGGCATCAACGCC 75
 G Y D S G Y I N G V N G S A I F Y K A V E G I N A
 226 ACCAAGCTCAGCGACAGCCACACCTCCCTCATCACCTCCATTCTCTCCTGCGGTACCTTCTTCCGGTGCCTCATC 100
 T K L S D S H T S L I T S I L S C G T F F G A L I
 301 GCCGGTGACGTTTCCGACTGGATTGGCCGCAAGTGGACCGTCATCATTGGCTGTGTCTACATGCTCGGTGTC 125
 A G D V S D W I G R K W T V I I G C V I Y M L G V
 376 GTTGTCCAGATGATCACTGCTCCAAACCACGCTCTGGGTCCCATCGTTGCCGGTCTGATGCCGGTCTCGGT 150
 V V Q M I T A P N H A L G P I V A G R L I A G L G
 451 GTCGGCTCGAGTCCGCCATTGTCATTCTGTACATGTCTGAGATTgtaagttgacgagcaatgacctcccacca 165
 V G F E S A I V I L Y M S E I
 526 tcactggcatttccctcgttaaacacgctgttccotcaaacagTGCCCCGCAAGGTTTCGTGGTGCCTCGTCGCCG 176
 C P R K V R G A L V A
 601 GCTACCAGTTCTGCATCACCATCGGTATCCTGCTCGCCTCCTGCGTCTACGGCACCAAGGACTTCACCAACA 201
 G Y Q F C I T I G I L L A S C V V Y G T K D F T N
 676 CCGGTGCCTACCGCATCCCATTGCCCTCCAGTTCCCCTGGGCCCTGATCCTCGGTGGCGGTCTGCTTCTCCTCC 226
 T G A Y R I P I A L Q F P W A L I L G G G L L F L
 751 CCGACTCCCCCGTTACTTCGTCAAGAAGGGCGAGATCCAGAAGGCTATCAACTCTCTGTCTCGCGTCCGTGGCC 251
 P D S P R Y F V K K G E I Q K A I N S L S R V R G
 826 AGCCTGAGGACTCCGAGTATGTCCAGAACGAGCTTGCTGAGATTATCGCCAACGAGGAGTACGAGCGTGTCTGA 276
 Q P E D S E Y V Q N E L A E I I A N E E Y E R A L
 901 TCCCCTCCACCACCTGGTTCGGCTCTTGGGCCAACTGCTTCAAGGGCTCTCTGTGGACCGGCAAGTCCAACCTGC 301
 I P S T T W F G S W A N C F K G S L W T G K S N L
 976 GACGAACCATCCTCGGTACCTCTCTCCAGATGATGCAGCAGTGGACCGGTGTCAACTTCATCTTCTACTACTCCA 326
 R R T I L G T S L Q M M Q Q W T G V N F I F Y Y S
 1051 CTCCCTTCTCCAGTCCACCGGCCCATCAAGAACTCGTTCCTCATCTCCCTCATCTTCTCCCTGGTCAACGTCT 351
 T P F L Q S T G A I K N S F L I S L I F S L V N V
 1126 GCTCTACTCCCTGTCTTCTGGACCGTTGAGCGATTGGCCGTCGTACCATCCTCATCGCGGGTGCCTTCGGTA 376
 C S T P L S F W T V E R F G R R T I L I A G A F G
 1200 TGCTCATCTGCCAGTTCCTCGTAGCCATCATTTGGTGTACCCGTCGGCTTCAACAAGACCCACCCGACCCAGCA 401
 M L I C Q E L V A I I G V T V G F N K T H P D P S
 1276 ACCCCGACGCTGCTCTGGCCGACAACATCCCCGCTGTCAACGCCAGATCGCCTTCATCGCCATCTTTCATCTTCT 426
 N P D A A L A D N I P A V N A Q I A F I A I F I F
 1351 TCTTCGCCTCCACCTGGGGTCCCGGTGCCTGGATCGTCATTGGTGAATCTTCCCTCTGCCATCCGATCTCGTG 451
 F F A S T W G P G A W I V I G E I F P L P I R S R
 1426 GTGTGCTCTGTCCACCGCTCCAACCTGGCTGTGAACACCATCATCTCCGTCATCACCCCTACATGGTCCGCA 476
 G V A L S T A S N W L W N T I I S V I T P Y M V G
 1501 CTGACAAGGGCAACCTGAAGTCGTCCTTCTCATCTGGGGCGGCCTCTGCACCTGCGCCTTCGTCTACTCTT 501
 T D K G N L K S S V F F I W G G L C T C A F V Y S
 1576 ACTTCTCATCCCCGAGACCAAGGGCCTGTCTCTCGAGCAGGTCGACAAGATGATGGAGGAGTCCAGCCCCGCA 526
 Y F L I P E T K G L S L E Q V D K M M E E S S P R
 1651 CCTCCTCCAAGTGAAGCCCACCACCACCTTTGCCGCTCAGATGGGCACTGGTGGTACATTGAGAAGCCTACCG 551
 T S S K W K P T T T F A A Q M G T G E Y I E K P T
 1726 CCGAGGTCTAAAGGACTCTCCTGCTTCCGGATGGATGCTTGGATGTTTCTTCTGCCTTTTTTGTCTCTCCTT 554
 A E V *

```

1801 TTGTTTATCAAAGCTTTTCCTTTATAACGCGGTGGGGTGGGCGGCTGCAGGTAATGGCTAGCTTCTGCAGCTT
1876 TTGACGAAATCATACCCAGGGCCACTACGGAGTGIGTCCGTCGAGATGTATCTGACGACGTGAAGACGTTTTTG
1951 TAATGCGGTAGATGTGGACATACACTAGCTACAAATGCGAACAACCTTCCAAAGAAAAAGAACTGCTCTTCTT
2026 TTGCGCTTCCAAGGTGTTCTTCCGAACCCTTGATAGCTGCACCTTTTCTATCTATACTTTTAATAAGATCACTT
2101 GTTTGATC

```

Fig. 9. Seqüência nucleotídica e de aminoácidos prevista para o gene *Trhx12*. Os códons de iniciação e terminação estão indicados em negrito. A seqüência codificadora de *Trhx12* é interrompida por apenas um intron, representado por letras minúsculas. A numeração à esquerda corresponde à posição dos nucleotídeos em relação à adenina do códon de iniciação; os aminoácidos estão enumerados à direita. A análise computacional de *Trhx12* revelou a presença de 12 segmentos transmembrânicos, indicados pela área sombreada.

5.3 Análise computacional de *Trhxt1* e *Trhxt2*

No programa BLAST, o alinhamento de duas seqüências nucleotídicas, ou de aminoácidos, é feito apenas na região de maior similaridade entre elas. A fim de se avaliar a similaridade das proteínas TrHXT1 e TrHXT2 com transportadores de glicose de diferentes organismos, através de alinhamentos completos, utilizamos o programa Gap, com a matriz de comparação BLOSUM 62

(http://www.accelrys.com/products/gcg_wisconsin_package/program_list.html#Gap)

(Tabela 6).

Tabela 6 Comparação entre as seqüências de aminoácidos de TrHXT1 e TrHXT2 e transportadores de glicose de vários organismos^a

Organismo	Transportador	TrHXT1		TrHXT2	
		Similaridade (%)	Identidade (%)	Similaridade (%)	Identidade (%)
<i>T. reesei</i>	TrHXT2	43,1	31,3	-	-
<i>T. harzianum</i>	GTT1	96,5	94,8	42,5	30,3
<i>K. lactis</i>	Hgt1p	55,7	46,2	40,6	29,4
<i>C. albicans</i>	Hgt1p	53,7	42,9	41,9	29,3
<i>A. muscaria</i>	AmMST1	45,8	35,5	56,3	45,7
<i>U. fabae</i>	HXT1	43,1	32,8	49,9	41,7
<i>P. stipitis</i>	Sut1p	41,0	30,9	47,3	36,3
<i>S. cerevisiae</i>	Hxt1p	40,6	31,4	47,7	36,6
<i>S. cerevisiae</i>	Hxt2p	40,6	31,1	45,8	33,5
<i>S. cerevisiae</i>	Snf3p	40,7	31,0	46,1	36,6
<i>N. crassa</i>	RCO3	39,4	29,4	49,8	39,5
<i>S. pombe</i>	Ght1p	38,5	28,9	43,5	33,1
<i>H. sapiens</i>	Glut1	36,1	27,0	38,3	26,9

^a De acordo com programa Gap, conforme discutido no texto

Valores significativos de similaridade e identidade de TrHXT1 e TrHXT2 com transportadores de glicose de leveduras e fungos filamentosos, já caracterizados funcionalmente, foram obtidos. TrHXT1 é especialmente similar (96,5 %) ao transportador de glicose GTT1, de *T. harzianum*, enquanto a similaridade de TrHXT2 é maior (56,3 %) com o transportador de glicose AmMST1, do fungo micorriza *A. muscaria*.

A similaridade de TrHXT1 e TrHXT2 entre si (43,1 %) é semelhante à observada entre os transportadores de alta, Hgt1p, e baixa, Rag1p, afinidade por glicose de *K. lactis* (38,5 %).

Podemos destacar, ainda, que os valores de similaridade de TrHXT1 e TrHXT2 com o transportador humano de glicose GLUT1 (36,1 % e 38,3 %, respectivamente) são semelhantes aos valores observados entre GLUT1 e os transportadores de glicose da família *HXT* de *S. cerevisiae* (42 % - 48 %).

Segmentos de proteínas situados no interior de membranas apresentam caracteristicamente maior hidrofobicidade que as regiões localizadas no interior de proteínas globulares. A partir disso, é possível prever, ao longo da sequência de aminoácidos de uma dada proteína, a existência de segmentos potencialmente transmembrânicos.

Os perfis de hidrofobicidade de TrHXT1 (Fig. 10) e TrHXT2 (Fig. 11) foram construídos de acordo com o método de Kyte & Doolittle (1982), utilizando-se uma janela de 15 resíduos. Os picos de maior hidrofobicidade observados nos gráficos correspondem a regiões potencialmente localizadas na membrana plasmática.

Além disso, 12 segmentos transmembrânicos foram previstos pelos programas THMM (Krogh *et al.*, 2001) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) e SOSUI (<http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html>). Com base nos resultados fornecidos por estes programas, desenhos esquemáticos de TrHXT1 e TrHXT2 foram representados sobre os seus respectivos perfis de hidrofobicidade. Observamos, em cada gráfico, que os picos de maior hidrofobicidade correspondem aos segmentos transmembrânicos previstos pelos programas THMM e SOSUI.

É possível ver claramente nos gráficos apresentados a presença de uma longa e hidrofílica alça citoplasmática conectando TM6 e TM7, que, conforme vimos, é uma característica comum entre os membros da MFS. O comprimento desta alça, mas não a sua sequência, parece ser vital para a correta inserção dos transportadores da MFS na membrana plasmática. O encurtamento ou a substituição de resíduos hidrofílicos presentes nesta região por resíduos de maior hidrofobicidade levam à perda de atividade e estabilidade e podem, ainda, impedir a inserção do transportador na membrana (Weinglass & Kaback, 2000).

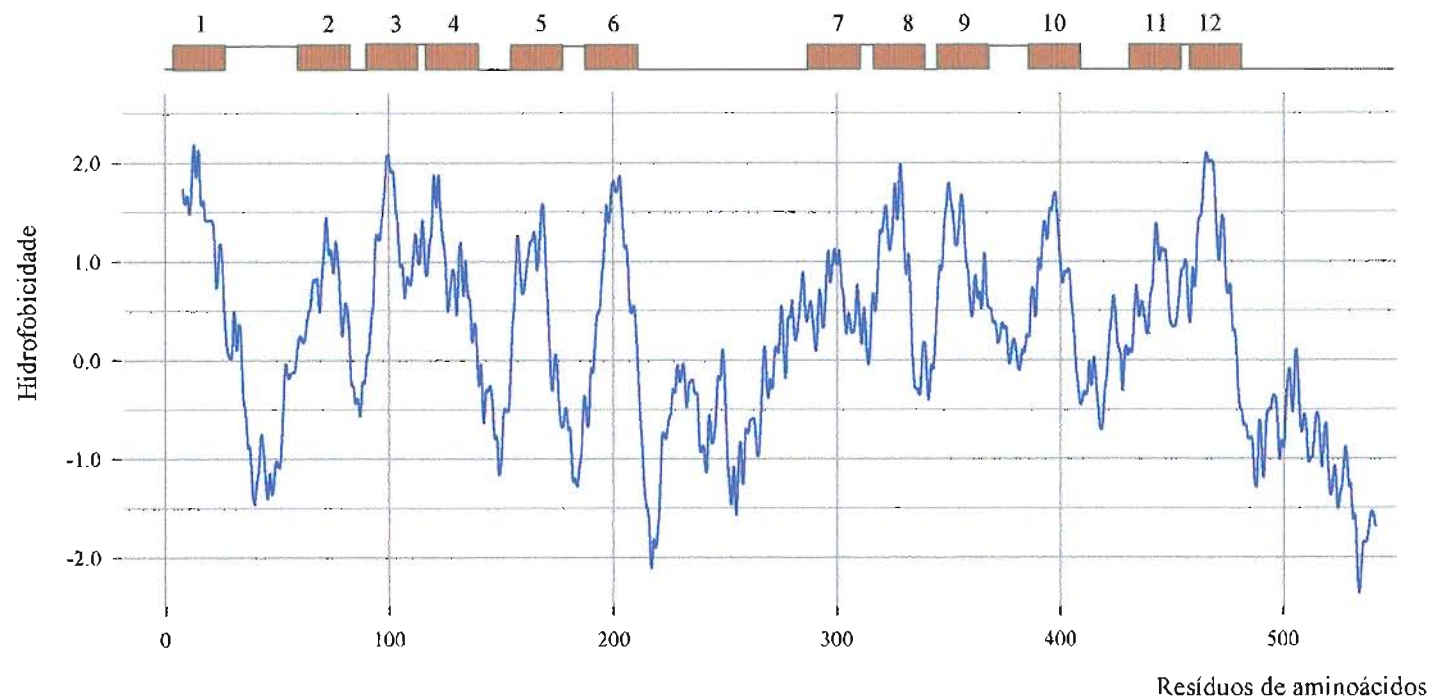


Fig. 10. Perfil de hidrofobicidade de TrHXT1. Os picos de maior hidrofobicidade correspondem a regiões potencialmente localizadas na membrana plasmática. O gráfico foi construído a partir dos valores de hidrofobicidade calculados pelo método de Kyte & Doolittle (1982), utilizando-se uma janela de 15 resíduos. O desenho esquemático de doze segmentos transmembrânicos em TrHXT1 (1-12), representados por caixas, foram previstos pelos programas THMM e SOSUI, conforme discutido no texto.

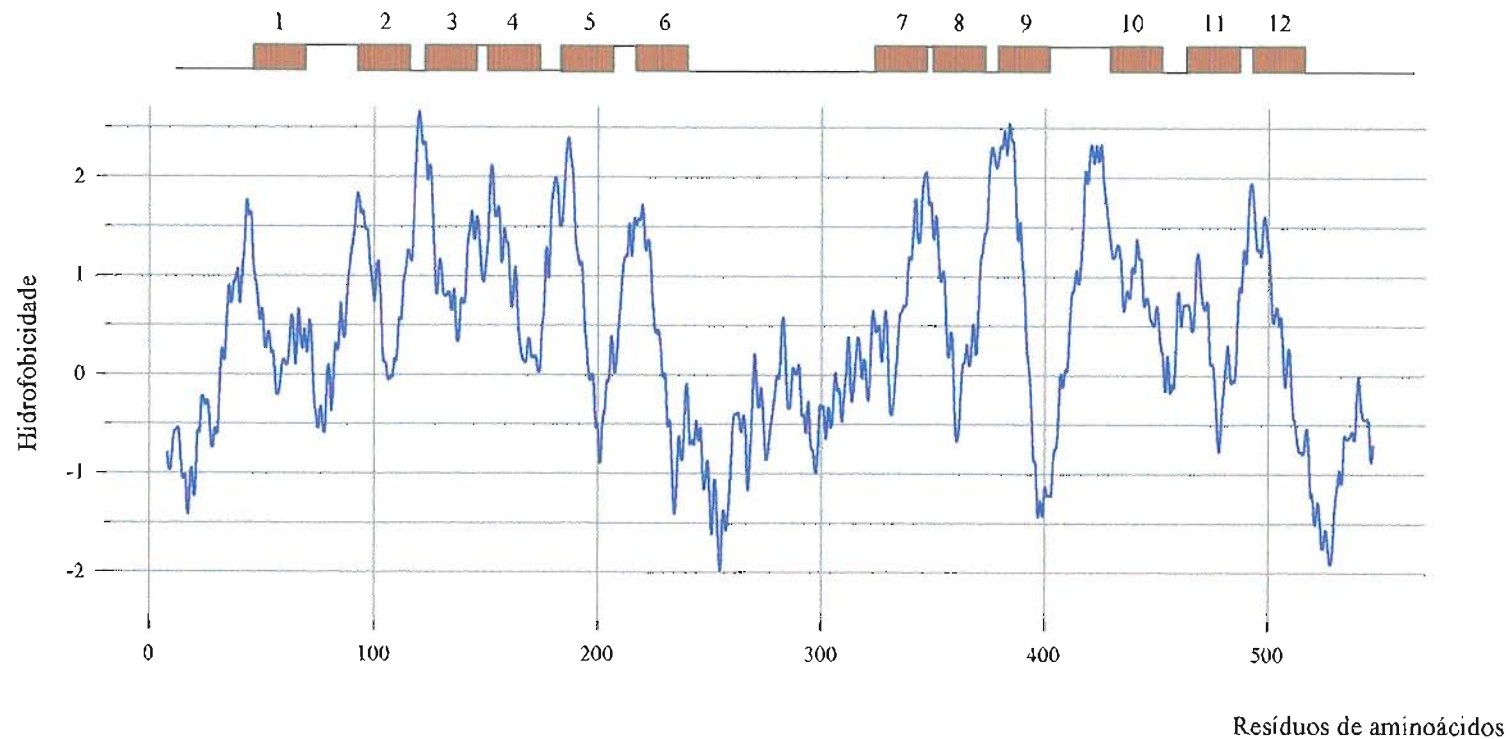


Fig. 11 Perfil de hidrofobicidade de TrHXT2. Os picos de maior hidrofobicidade correspondem a regiões potencialmente localizadas na membrana plasmática. O gráfico foi construído a partir dos valores de hidrofobicidade calculados pelo método de Kyte & Doolittle (1982), utilizando-se uma janela de 15 resíduos. O desenho esquemático de doze segmentos transmembrânicos em TrHXT2 (1-12), representados por caixas, foram previstos pelos programas THMM e SOSU1, conforme discutido no texto.

A similaridade das seqüências de TrHXT1 e TrHXT2 foi investigada, ainda, por um alinhamento múltiplo das duas proteínas entre si e com membros representativos de transportadores de glicose de outros microorganismos. No alinhamento apresentado na Fig. 12, estão alinhadas as seqüências das proteínas Hxt2p (*S. cerevisiae*), GLUT1 (humana), Hgt1p (*K. lactis*), GTT1 (*T. harzianum*) e AmMST1 (*A. muscaria*), além de TrHXT1 e TrHXT2. O alinhamento foi feito com o programa ClustalX (Thompson *et al.*, 1994), utilizando-se matrizes da série BLOSUM, e editado pelo programa GeneDoc (Nicholas *et al.*, 1997).

Motivos* conservados entre diversos transportadores de glicose da MFS foram encontrados em TrHXT1 e TrHXT2. Estes motivos estão sublinhados no alinhamento e enumerados de I a V.

A seqüência consenso R-X-G-R-R (I), em que X representa qualquer aminoácido, localizada entre TM1 e TM2, foi primeiramente reconhecida por Henderson & Maiden (1990) e parece estar presente, em uma forma mais expandida, em todas as 17 subfamílias da MFS (Pao *et al.*, 1998). Uma segunda cópia deste motivo (IV) ocorre, com menor grau de conservação, entre TM8 e TM 9, o que sugeriu que estes transportadores tenham surgido da duplicação de uma proteína ancestral, contendo 6 segmentos transmembrânicos (Maiden *et al.*, 1987). De acordo com Bairoch (1993), a seqüência consenso deste motivo é: [LIVMSTAG]-[LIVMFSAG]-X(2)-[LIVMSA]-[DE]-X-[LIVMFYWA]-G-R-[RK]-X(4,6)-[GSTA]. A importância deste motivo, entre TM1 e TM2, foi demonstrada experimentalmente na bactéria *E. coli*, em trabalhos envolvendo o transporte de lactose (Jessen-Marshall *et al.*, 1995) e o contra-transporte de íons H⁺ e um complexo de metal e tetraciclina (Yamaguchi *et al.*, 1992).

O motivo II ocorre no final de TM4 e na alça entre TM4 e TM5, com a seqüência consenso: [LIVMF]-X-G-[LIVMFA]-X(2)-G-X(8)-[LIFY]-X(2)-[EQ]-X(6)-[RK], de acordo com Bairoch (1993). O motivo III se estende a partir do final de TM6, e está representado pela seqüência consenso [P-E-S-P] (Bairoch, 1993; Kruckeberg, 1996), enquanto o de número V ocorre no final de TM 12, com a seqüência consenso [V-P-E-T-K] (Han *et al.*, 1995).

* O termo *motivo* está sendo usado aqui em referência a um padrão de seqüência de aminoácidos, designado em inglês pelo termo *motif*.

Classificação de TrHXT1 e TrHXT2

Os transportadores de membrana são classificados de acordo com critérios estabelecidos pelo *Transport Commission* (TC) system (<http://tcdb.ucsd.edu/tcdb/background.php>). Cada transportador recebe um número de identificação (TC number), de acordo com informações filogenéticas e dados sobre a especificidade e os mecanismos envolvidos no transporte.

Os resultados obtidos através da análise computacional de *Trhxt1* e *Trhxt2* indicam que os dois genes fazem parte da superfamília de transportadores MFS, e que se encontram inseridos na família de transportadores de açúcares (*Sugar Porter*, SP). Os membros desta família são identificados pelo número TC.2.A.1.1, onde o primeiro dígito e a letra A referem-se ao mecanismo de transporte; o segundo dígito identifica a superfamília MFS; e o terceiro dígito designa a família de transportadores de açúcares SP.

```

Sc_Hxt2p : MSEFATSRVESGSQQTSIHSTPIVQKLETDESPIQTKSEYTNAELPAKPI : 50
Hs_Glut1 : -----MEPSSKKLT-- : 9
Kl_Hgt1p : -----MSLKNWLLLRDIQY-----EGTFYKFFPHV-- : 25
Th_GTT1 : -----MAI-- : 3
Am_MST1 : -----MPPAA-----TGNGGIDPKNK-- : 16
Tr_TrHXT1 : -----MPI-- : 3
Tr_TrHXT2 : -----MADVHVADAPEGRKQSIG---IHTTQDVEHIEAPIT-- : 33

```

```

Sc_Hxt2p : AAYWTVICLCLMIAFGGFVFGWDTGTISG--FVNDTDFKRREGOMKSDGT : 98
Hs_Glut1 : ---GRIMLAVGGAVLGSIQFGYNTGVINAPQKVIIEEFYNQTTWVHRYGESI : 56
Kl_Hgt1p : ---YNIYVIGFTIACISGLMFGFDIASMSS--MIGTDVYKDYFS---NP-- : 65
Th_GTT1 : ---GNLYVIAGVSVVGGALFGFDISSVSA--QLAEQSYLCYFNQDENPPT : 48
Am_MST1 : ---FTGIAMTAFSAFGGILYGYDTGIIISG--ILAMDDFKRTFGQQASDGT : 61
Tr_TrHXT1 : ---GNLYVIAGVSVVGGALFGFDISSVSA--QLAEQSYLCYFNQDENPPT : 48
Tr_TrHXT2 : ---WKAYLMCAFASFGGIFFGYDSGYING--VNGSAIEYKAVEG-INATK : 77

```

```

Sc_Hxt2p : YYLS-----DVRTGLIVGIFNIGCAFEGGLTLGRLGDMYGRRIGLMCVVL : 142
Hs_Glut1 : LPTT-----LITLWLSVAIFSVGGMIGSFSVGLFVNRFGRNRSMMLMNL : 101
Kl_Hgt1p : --D-----SLTYGGITASMAGGSFLGSLISPNFSDAFGRKVSLSHICAA : 106
Th_GTT1 : TADGKCGGPRSLVQCGITASMAAGSWLGGALISGPLSDRLGRKYSIMVGCI : 98
Am_MST1 : CSLP-----LSSQSLFVLSLSAGTFVGFALFGAPMGDIIGRKGWIVIAAA : 105
Tr_TrHXT1 : TVDGTCCGPRSLVQCGITASMAAGSWLGGALISGPLSDRLGRKYSIMVGCI : 98
Tr_TrHXT2 : LSD-----SHTSLITLSILSCGTFEGALISGPLSDRLGRKWTVIIGCV : 119

```

I

```

Sc_Hxt2p : VYIVGIVIQIASSDK--WYQYFIGRIISGMGVGGIAVLSPTLISETAPKH : 190
Hs_Glut1 : LAFVSAVLMGFSKLGKSFEMLILCRFTIGVYCGLTTGFVPMYVGEVSEPTA : 151
Kl_Hgt1p : LWTIGAILQCAAQD---QAMLIVGRVTSGMGTGFGSSAAPVYCSELSPPK : 153
Th_GTT1 : IWVIGSTLSCASQ---IGMLIVARIINGLSVGTESAQVPVYIAEISPPS : 145
Am_MST1 : IFSIGIALQASVT---AAPFVVRVFAAGLVGLVSCLVPMYQSECSPKW : 152
Tr_TrHXT1 : IWVIGSTLSCASQ---IGMLIVARIINGLSVGTESAQVPVYIAEISPPS : 145
Tr_TrHXT2 : IYMLGVVOMITAPNHAGPIVAGRLIAGLVGFESAVILYMSEICPRK : 169

```

II

```

Sc_Hxt2p : IRGTCVSYFQLMITLGIPLGYCTNYGTDYSN-----SVQWRVPLGLN : 233
Hs_Glut1 : FRGALGTLHQLGIVVGIILIAQVFLGDSIMGNK-----DLWPLLSLII : 193
Kl_Hgt1p : IRGTISGLFOFSVTVGIMVLEFYIGYCHFIDG-----AAAFRIITWGLO : 196
Th_GTT1 : KRGRFIGMQQWAITWGILIMYYISYGCSEFIGEDNPVSYNTAAWRIPWGLO : 195
Am_MST1 : IRGAVVSLYQWAITIGILLAAVINNAIQGRSN-----HSAYQIPISIQ : 195
Tr_TrHXT1 : KRGRFIGMQQWAITWGILIMYYISYGCSEFIGKQNPLEYNTASWRIPWGLO : 195
Tr_TrHXT2 : VRGALVAGYQFCITIGILLASCVVYGTKDFTN-----TGAYRIPIALQ : 212

```

Sc_Hxt2p : FAFALFMIAGMIMVPEsprflVEKGRYEDAKRSIAKSNKVT-IEDPSIVA : 282
Hs_Glut1 : FIPALHQCIVLPFCPEsprfLLINRNEENRAKSVLKLRGT----ADVTH : 239
Kl_Hgt1p : MVPGLILMVGVFFIPESPRWLANHDRWEETSLIVANTVANGDVNNEQVRF : 246
Th_GTT1 : MIPAFFLFFMMMPLESPRWLARKDRWEDCRAVLTLVHGKGDPNHPFVAY : 245
Am_MST1 : FVWAFILGFGMMLPEsprflVRQGRDEDAALSLSRLTRLS-PEDPVVRN : 244
Tr_TrHXT1 : MIPAFFLFFMMMPLESPRWLARKDRWEDCRAVLTLVHGKGDPNHPFVAY : 245
Tr_TrHXT2 : FPWALILGGGLLFLFEDSPRYFVKKGEIQKAINSLSRVRGQP-ELSEYVQN : 261

III

Sc_Hxt2p : EMDTIANVETERLAGNA-----SWGELEFSNKG----AIIPRVIMGIMIQ : 323
Hs_Glut1 : DLQEMKEESRQMMREKKV-----IIIELEFRSP-----AYRQPILIAVVLQ : 279
Kl_Hgt1p : QLEEKKEQVIIDSAAKNF-----GYKDLFRK-----KTLPKTIVGVSAQ : 285
Th_GTT1 : ELQDIKDMCEFERQHADV-----TYLDLFRK-----RMINRIFIGLFTQ : 284
Am_MST1 : ELAEIRTNFEAELALGES-----SYLDCFRPSHN---KILLRRTITGIFIQ : 286
Tr_TrHXT1 : ELQDIKDMCEFERRHADV-----TYLDLFRK-----NMLNRIFIGLFTQ : 284
Tr_TrHXT2 : ELAEIIANEYERALI PSTTWFGSWANCFKGS LWTGKSNLRRTITIGTSLQ : 311

Sc_Hxt2p : SLQQLTGNNYFFYYGTTIFNAVG--MKDSFQTSIVLGI VNFASFVALYT : 371
Hs_Glut1 : LSQQLSGINAVFYYSSTIFEKAG--VQQPVYATIGSGIVNTAFTVVSLEFV : 327
Kl_Hgt1p : MWQQLCGMNVMMYYIVYIFNMAGYTGNTNLVASSIQYVLNVVMTIPALFL : 335
Th_GTT1 : IWSQLTGMNVMMYYIANIFSMAGYSGNANLLASSIQYIINVLMTIPALLW : 334
Am_MST1 : ANQQLTGINFIFYYGTQYFQNA--INQAFIITATGIVNVFMTLPGLYG : 334
Tr_TrHXT1 : IWSQLTGMNVMMYYIANIFSMAGYSGNANLLASSIQYIINVLMTIPALLW : 334
Tr_TrHXT2 : MMQQWTGVNFIFYYSTPFLQSTG-AIKNSFLISLIFS LVNV CSTPLSFWT : 360

Sc_Hxt2p : VDKFGRRKCLLGGASMAICFV----IFSTVGVTSLYP-----NGKDQP : 411
Hs_Glut1 : VERAGRRTLHLI GLAGMAGCAI-----L-MT-----IALALL : 358
Kl_Hgt1p : IDKFGRRPVLIIIGGIFMFTWLE SVAGILATYSVPAPGGVNGDDTVTIQIP : 385
Th_GTT1 : VDKWGRRPPTLLIGSVLMALWMYANAGILATYGEVVPGGI---DHVAAQSM : 381
Am_MST1 : VERYGRRSLLLIGALGMTICEF----IVA-----IVGVTIP : 366
Tr_TrHXT1 : VDKWGRRPPTLLIGSVLMALWMYANAGILATYGEVVPGG---IDHVAAQSM : 381
Tr_TrHXT2 : VERFGRRTILIAGAFGLICQLVAIIIGVTVGFNKTHP---DPSNPDAAL : 407

IV

Sc_Hxt2p : SSK-AAGNVMIVFTCLFIFFFAISWAPIAYVIVAESYPLRVKNRAMAIAV : 460
Hs_Glut1 : EQLPWMSYLSIVAI FGFVAFFEVGPPIPFIVAELEFSQGPRPAAI AVAG : 408
Kl_Hgt1p : SENTSAANGVIASSYLFVCFEAPTWGIGIWIYCSEIFNNMERAKGSALSA : 435
Th_GTT1 : RVTGAPAKGLIACYRFVASFAPTWGPVSWTYPPPELFLRLRGKGVAMAT : 431
Am_MST1 : ASNLAGQRVLIAFVCIYIAFFASTWGPMLWVIVGEIFPLQVRAKGISLSV : 416
Tr_TrHXT1 : RVSGAPAKGLIACYLFVASFAPTWGPVSWTYPPPELFLRLRGKGV ALAT : 431
Tr_TrHXT2 : ADNIPAVNAQIAFIALFIFFFASTWGP GAWIVIGEIFPLPIRSRGVALST : 457

```

Sc_Hxt2p : GANWIWGFLIGFFTPFITSALGFSYG-----YVFMGCLVFSFFYVFFV : 504
Hs_Glut1 : FSNWTSNFIVGMCFOYVEQLCGPYV-----FIIFTVLLVLFPIFYFKV : 452
Kl_Hgt1p : ATNWAFFNFALAMFVPSAFKNISWKT-----YIIFGVFSVALTIQTFMF : 479
Th_GTT1 : SGNWAFNTALGLFTPFAFANIKWKS-----YLIFAVFNVAFFHVFFV : 475
Am_MST1 : ASNWLWNEGIAFATPYLVNTQAGSAGLGSKVFFIWTTCACCLVFTYECV : 466
Tr_TrHXT1 : SGNWAFNTALGLFTPFAFANIKWKS-----YLIFAVFNVAFFHVFFV : 475
Tr_TrHXT2 : ASNWLWNTIISVITPYMVGTDKGNLKS--VFFIWGGLCTCAEVYSYFLI : 505

```

```

Sc_Hxt2p : CETKGLTLEEVNEMYVEG-----VKPWKSGSWISKEKRVSEE----- : 541
Hs_Glut1 : PETKGRIFDEIASGFRQG-----GASQSDKTPPEELFHPLGADSQV : 492
Kl_Hgt1p : PETKGTLEEIDQMWVDN-----TPAWRTANYIPQLPIVKDEEGNKLK : 522
Th_GTT1 : PETAGKLEETEAMFEDPNGIPYMGTPAWKTK--VATSLTVRAEQDLEA : 523
Am_MST1 : PETKGLSLEQIDEMYQEVMP-----LKSQYRRRIAIEGGFRTEKADIIH : 511
Tr_TrHXT1 : PETAGKLEETEAMFEDPNGIKYLGTPAWKTR--VATSLTERAEHGDIEA : 523
Tr_TrHXT2 : PETKGLSLEQVDKMMES-----SPRTSSKWKPTTTFAAQMGTEYIE : 548

```

```

Sc_Hxt2p : ----- : -
Hs_Glut1 : ----- : -
Kl_Hgt1p : LLGNPQHLEDVHSNEKGLLDRSDSASNSN : 551
Th_GTT1 : KIAHDTEKPPPIHTHEEETQ----- : 543
Am_MST1 : EETAEKESG----- : 520
Tr_TrHXT1 : KIGHDTEKPPVHTHEEEKASTPPPQ---- : 548
Tr_TrHXT2 : KPTAEV----- : 554

```

Fig. 12. Alinhamento múltiplo de TrHXT1 e TrHXT2 entre si e com membros representativos de transportadores de glicose de vários organismos. Motivos conservados entre os transportadores da MFS foram identificados em TrHXT1 e TrHXT2, conforme discutido no texto. Estes motivos estão sublinhados e enumerados de Ia V. As cores utilizadas no sombreado refletem a similaridade entre as diversas seqüências apresentadas no alinhamento. A similaridade entre as seqüências, por sua vez, é definida por grupos de similaridade, constituídos por substituições conservativas entre os resíduos de aminoácidos. Os organismos utilizados neste alinhamento são: *A. muscaria* (Am), *H. sapiens* (Hs), *K. lactis* (Kl), *S. cerevisiae* (Sc), *T. harzianum* (Th) e *T. reesei* (Tr).

5.4 Análise da expressão de *Trhxt1* e *Trhxt2*

Em *S. cerevisiae*, o transporte de glicose exerce um grande controle no fluxo através da via glicolítica (Cortassa *et al.*, 1995) e a expressão de seus diversos transportadores é regulada pela concentração extracelular de glicose, sobretudo ao nível transcricional (Ozcan & Johnston, 1999).

A influência da glicose na expressão dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2* foi investigada por *northern blot*. Esporos de *T. reesei* foram inoculados em meio rico (10^6 esporos ml^{-1}), em diferentes concentrações de glicose, e o crescimento do fungo acompanhado através de alíquotas utilizadas para a preparação de RNA e determinação da concentração de glicose. As culturas foram mantidas a 28 °C, sob agitação de 200 rpm.

Em alta concentração de glicose (52 mmol l^{-1} ou $\approx 1\%$ em m/v), a expressão de *Trhxt1* não foi observada (Fig. 13a), o que indica que a expressão do gene é reprimida por glicose.

Na Fig. 13b, observamos a expressão do gene em concentrações de glicose inferiores a 10 mmol l^{-1} ; neste caso, a cultura foi monitorada até que a glicose do meio se esgotasse. A expressão de *Trhxt1* foi observada apenas em baixos níveis de glicose (em torno de 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$, coluna 4). Em concentrações mais altas (colunas 2 e 3), ou na ausência de glicose (coluna 5), o mRNA do gene não foi detectado.

A expressão de *Trhxt1* também foi analisada em culturas de *T. reesei* realizadas em glicerol. Esporos de *T. reesei* foram inoculados em glicerol 0,8 % (m/v) por 20h. Após esse tempo, as células foram transferidas para meio de cultura fresco contendo glicerol na mesma concentração. Alíquotas foram retiradas após 1 e 2 h (Fig. 14). A expressão de *Trhxt1* não foi observada.

De acordo com os resultados obtidos, a expressão de *Trhxt1* não ocorre na presença de alta concentração de glicose ou na sua ausência. Também não observamos a expressão de *Trhxt1* em glicerol, o que indica que a expressão do gene depende da presença de baixos níveis de glicose.

O padrão de expressão de *Trhxt2* é muito diferenciado. Ao contrário de *Trhxt1*, a sua expressão não é reprimida por glicose (Fig. 13a) e parece ser relativamente independente de sua concentração (Fig. 13b, colunas 2-5). Na presença de glicerol, o gene é expresso, ao contrário do que ocorre com *Trhxt1* (Fig. 14).

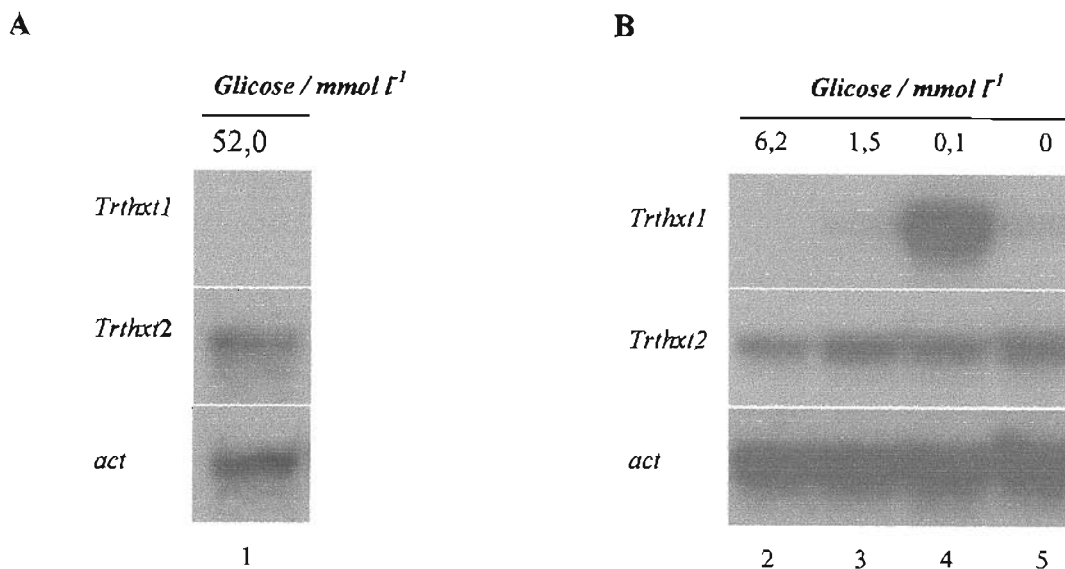


Fig. 13. Efeito da concentração de glicose na expressão dos genes *Trthxt1* e *Trthxt2*. A) Esporos de *T. reesei* foram inoculados em glicose 80 mmol l⁻¹, e a cultura monitorada através de alíquotas utilizadas para a preparação de RNA. B) Neste caso, o fungo foi pré-cultivado em glicerol, e depois transferido para glicose 20 mmol l⁻¹. O gene de actina foi utilizado como controle interno.

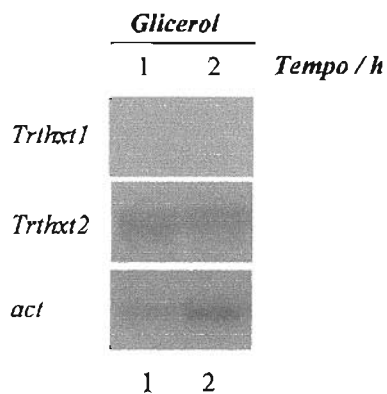


Fig. 14. Análise da expressão dos genes *Trthxt1* e *Trthxt2* em glicerol. Esporos de *T. reesei* foram pré-cultivados em glicerol por 24 h. Após esse tempo, o micélio do fungo foi transferido para o mesmo volume de meio fresco, contendo glicerol 0,8 %. Alíquotas foram recolhidas para a preparação de RNA nos tempos indicados. O gene de actina foi utilizado como controle interno.

De acordo com estes resultados, podemos sugerir que o gene *Trhxt1* esteja envolvido com o transporte em baixas concentrações de glicose ($\approx 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) e que, portanto, a proteína TrHXT1 tenha uma alta afinidade pelo substrato.

A expressão de *Trhxt2* na presença de alta concentração de glicose, por outro lado, indica que a expressão do gene não é reprimida por glicose, e sugere que o transportador TrHXT2 seja importante para o crescimento do fungo nestas condições. É razoável supor, por esta razão, que a afinidade de TrHXT2 por glicose seja relativamente menor que a de TrHXT1.

Apesar da expressão de *Trhxt1* ter sido observada apenas em baixos níveis de glicose, a concentração de glicose em que o mRNA do gene foi detectado sofreu pequenas oscilações entre diferentes experimentos. Isto se deve, em parte, pelas variações constantes que ocorrem durante o cultivo de microorganismos em agitadores mecânicos (*shake flask cultures*). Mesmo em fermentadores, nos quais é possível manter sob controle importantes fatores de crescimento, tais como o pH e a concentração de oxigênio dissolvido, ocorrem alterações constantes e bruscas na composição do meio.

O uso de culturas contínuas, por outro lado, permite o cultivo de microorganismos em condições controladas, e oferece a oportunidade de se avaliar o efeito de diferentes fatores de crescimento na cultura, uma vez que estes fatores podem ser manipulados de forma independente (Weusthuis *et al.*, 1994). Neste tipo de cultura, o fermentador é alimentado continuamente com meio fresco, a uma determinada taxa de diluição (D). O volume se mantém constante, no entanto, pela remoção contínua da cultura, incluindo a biomassa presente no fermentador.

Outro aspecto importante a ser ressaltado é o fato de um dos nutrientes ser mantido em condições que limitam a taxa de crescimento do microorganismo. No estado estacionário, a velocidade específica de crescimento (μ) do microorganismo - definida como a taxa de crescimento por unidade de biomassa ou, de outra forma, como o aumento relativo de biomassa no tempo - se iguala à taxa de diluição do meio, e a concentração de todos os nutrientes se mantém constante.

Devido ao fato de as condições de cultivo permanecerem constantes, o estado fisiológico do microorganismo permanece o mesmo ao longo da cultura.

Experimentos de cultivo contínuo de *T. reesei* foram realizados no Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP-SP, em um trabalho de colaboração com os professores Andreas K. Gombert e Aldo Tonso.

Os experimentos foram realizados a uma taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$, a $28 \text{ }^\circ\text{C}$, sob agitação de 900 rpm, conforme descrito em Materiais e métodos. A glicose foi utilizada como substrato limitante. No abastecimento do meio, a sua concentração era de 100 mmol l^{-1} ; na cultura, no entanto, o consumo imediato da glicose reduzia sua concentração a, aproximadamente, $80 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.

Nestas condições, os genes *Trhxt1* e *Trhxt2* encontraram-se expressos (Fig. 15b). Este resultado é uma forte evidência do envolvimento do gene *Trhxt1* com o transporte em concentrações muito baixas de glicose, em torno de $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$.

Efeito do oxigênio na expressão de Trhxt1 e Trhxt2

O efeito do oxigênio na expressão gênica de *T. reesei* foi investigado a partir de uma cultura contínua do fungo, na presença de glicose como substrato limitante. Após o estabelecimento do estado estacionário, a concentração de O_2 foi reduzida, gradativamente, em intervalos de 1 h, conforme descrito em Materiais e métodos.

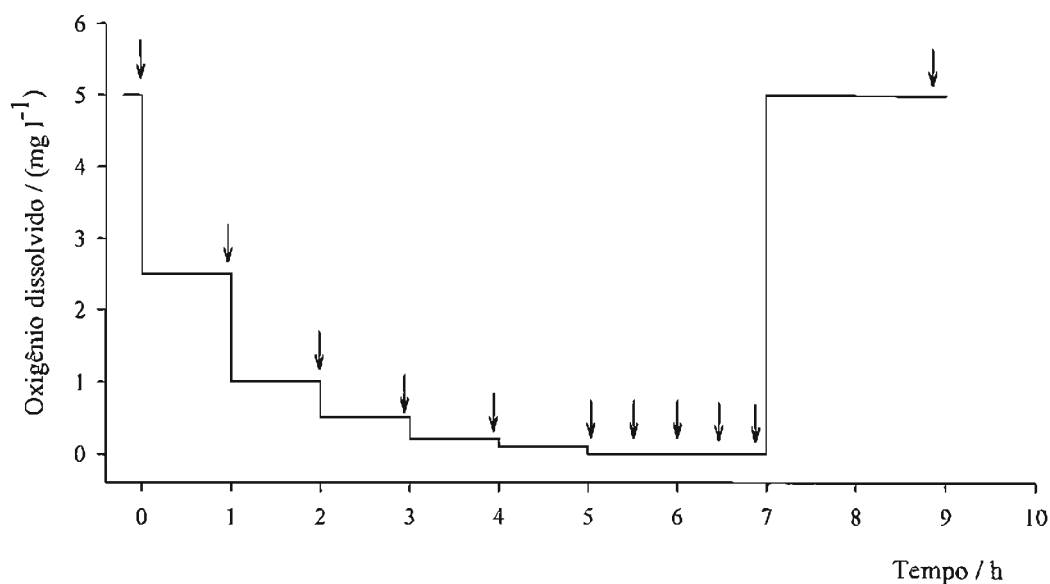
A concentração de O_2 foi reduzida de 5 mg l^{-1} , condições de plena de aeração, a 0 mg l^{-1} ; em seguida, a sua concentração foi restabelecida ao valor seu valor inicial. Um gráfico da concentração de oxigênio em função do tempo, ao longo do experimento, está indicado na Fig. 15a. Nos tempos indicados por setas, 1 h após cada redução na concentração de O_2 , amostras do micélio do fungo foram recolhidas para análise.

O efeito do oxigênio na expressão de *Trhxt1* e *Trhxt2* foi analisado nestas amostras por *northern blot* (Fig. 15b). Observamos que a expressão de *Trhxt1* é induzida pela carência de O_2 .

É importante notar que, à medida que a tensão de O_2 era reduzida, a concentração de glicose tornava-se progressivamente maior. Apesar da presença de glicose, no entanto, em baixos níveis de O_2 , a expressão de *Trhxt1* foi observada. A carência de O_2 , portanto, parece se sobrepôr ao efeito repressor da glicose, causando a indução do gene. Após o restabelecimento dos níveis normais de O_2 , a expressão de *Trhxt1* se reduziu, provavelmente como consequência do efeito repressor da glicose ($28,9 \text{ mmol l}^{-1}$).

No caso de *Trhxt2*, o oxigênio parece exercer o efeito contrário, causando a repressão do gene. Considerando-se que *Trhxt2* não é reprimido por glicose, a repressão observada em concentrações de oxigênio inferiores a 1 mg l^{-1} deve estar associada

A



0,08 0,08 0,1 0,1 0,1 3,5 7,5 11,0 16,9 20,5 28,9

Glicose / mmol l⁻¹

5 2,5 1 0,5 0,2 0,1 0,1 0 0 0 5

Oxigênio dissolvido / mg l⁻¹

Trhxt1

Trhxt2

cytb

0 1 2 3 4 5 5,5 6 6,5 7 9

Tempo / h

Fig. 15. Efeito do oxigênio na expressão dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2*. A) O gráfico mostra a remoção gradual na concentração de oxigênio durante uma cultura contínua de *T. reesei*. No tempo $t = 0$, a cultura encontrava-se no estado estacionário. A partir deste momento, a tensão de O_2 foi reduzida em intervalos de 1h, conforme indica o gráfico. As setas correspondem aos tempos em que alíquotas foram recolhidas para análise. B) Análise por *northern blot* da expressão de *Trhxt1* e *Trhxt2* em diferentes concentrações de oxigênio, conforme indicado em A. O gene de citocromo *b*, cuja expressão em *A. nidulans* é independente da concentração de O_2 , foi utilizado como controle interno.

especificamente à carência de O₂. Quando o oxigênio é restabelecido, a repressão causada por O₂ é aliviada, e a expressão do gene volta a ocorrer.

Nestes experimentos, o gene de citocromo b, cuja expressão, em *A. nidulans*, é independente da concentração de oxigênio (Raitt *et al.*, 1994), foi utilizado como controle interno.

5.5 Expressão heteróloga em levedura

As propriedades dos diversos transportadores de glicose de *S. cerevisiae* têm sido eficazmente estudadas através da expressão individual de seus genes em cepas deficientes no transporte de glicose (Reifenberg *et al.*, 1997). Além disso, a complementação de *S. cerevisiae* tem sido muito utilizada na identificação e caracterização funcional de transportadores de glicose de outros microorganismos.

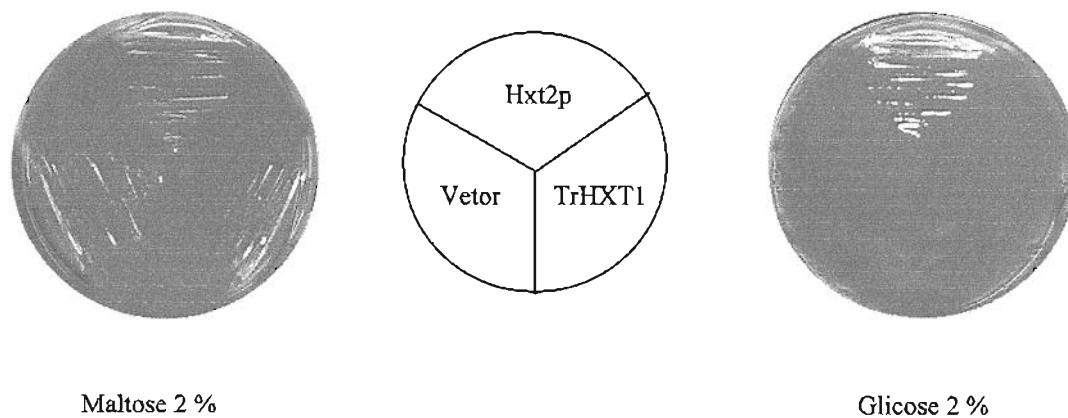
Transportadores de glicose das leveduras *C. albicans*, *S. pombe* e *P. stipitis* se mostraram capazes de complementar cepas mutantes de *S. cerevisiae*, e foram parcialmente caracterizados neste sistema heterólogo.

A caracterização funcional de *Trhxt1* foi investigada, primeiramente, através da expressão heteróloga em *S. cerevisiae*. A cepa mutante KY73 (Kruckeberg *et al.*, 1999), incapaz de crescer na presença de glicose como única fonte de carbono, foi utilizada nos experimentos. Nesta cepa, os genes dos principais transportadores de glicose de *S. cerevisiae* (*HXT1-HXT7* e *GAL2*) foram deletados.

O gene *Trhxt1*, obtido de um clone de cDNA e, portanto, sem a presença de introns, foi clonado no vetor de expressão pJN40, sob o controle de um promotor induzível por cobre (Gietz & Sugino, 1988), originando o plasmídeo pYH41. O gene *HXT2*, de *S. cerevisiae*, foi clonado no mesmo vetor (pHXT2) e utilizado como controle positivo.

Após a transformação, as células de *S. cerevisiae* foram plaqueadas em meio seletivo – meio mínimo YNB, sem uracila - contendo maltose (2 % m/v) como fonte de carbono. As colônias capazes de se desenvolver na ausência de uracila foram submetidas a uma outra passagem em meio seletivo e, em seguida, transferidas para placas contendo glicose 0,05 % ou 2 % (m/v), suplementadas com CuSO₄ 0,1 mmol l⁻¹ (Fig. 16a). Apenas as células transformadas com o plasmídeo pHXT2, contendo o gene *HXT2* de *S. cerevisiae*, foram capazes de crescer na presença de glicose.

A

S. cerevisiae

B

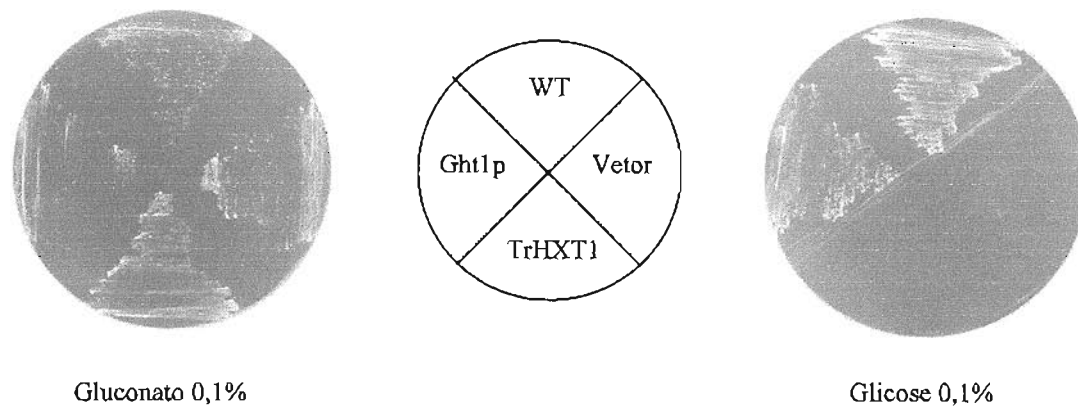
S. pombe

Fig. 16. Expressão heteróloga do gene *Trhxt1* em cepas de *S. cerevisiae* e *S. pombe* deficientes no transporte de glicose. A) Cepa KY73 de *S. cerevisiae* transformada com o gene *Trhxt1*, sob o controle de um promotor induzível por cobre, no vetor pJN40. As placas contêm YNB 0,7 % (m/v), suplementadas com CuSO_4 0,1 mmol l^{-1} . O gene *HXT2*, de *S. cerevisiae*, clonado no mesmo vetor, foi utilizado como controle. B) Cepa YGS-5 de *S. pombe* transformada com o gene *Trhxt1*, clonado no vetor pREP1. O gene *GHT1*, de *S. pombe*, foi utilizado como controle. A cepa selvagem de *S. pombe* 972h⁻ (WT) está incluída nas culturas, que consistem de meio mínimo EMM, com as fontes de carbono indicadas.

Após o resultado negativo no teste de complementação, fizemos um *northern blot* para detectar o mRNA de *Trhxt1* nas células de *S. cerevisiae* (Fig. 17). O transcrito de *Trhxt1* foi facilmente observado na cepa KY73, durante a fase exponencial de crescimento. As células foram cultivadas em meio mínimo YNB, na presença de CuSO_4 $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$. Os resultados do *northern blot* indicam que a transcrição de *Trhxt1* ocorre normalmente nas células da levedura.

A análise das células de *S. cerevisiae* transformadas com o gene *Trhxt1* foi feita, ainda, por ensaios de transporte de glicose *in vitro*, utilizando-se glicose radioativa, marcada com o isótopo ^{14}C .

Células de levedura crescidas em maltose 2 % (m/v), na presença de CuSO_4 $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$, a uma densidade ótica (DO) em torno de 1,0, foram utilizadas nos experimentos de captação de glicose. Os ensaios de transporte foram realizados durante 10, 20 e 60s, em glicose 5 mmol l^{-1} .

Nestes intervalos de tempo, não pudemos observar evidências de captação de glicose nas células transformadas com plasmídeo pYH41, contendo o gene *Trhxt1* (Fig. 18). Os resultados obtidos com estas células foram semelhantes aos obtidos com aquelas que foram transformadas apenas com o vetor. Conforme esperado, as células transformadas com o plasmídeo pHXT2, contendo o gene *HXT2*, foram capazes de captar a glicose radioativa disponível no meio.

De acordo com os resultados obtidos, o gene *Trhxt1* não é capaz de complementar cepas de *S. cerevisiae* deficientes no transporte de glicose.

Além de *S. cerevisiae*, cepas mutantes deficientes no transporte de glicose de *S. pombe* (Mildbradt & Hofer, 1994) têm sido utilizados na identificação de transportadores de glicose de outros organismos. Podemos destacar, através desta abordagem, a caracterização funcional do gene *Ammst1*, do fungo *A. muscaria* (Nehls *et al.*, 1998).

Devido aos resultados não conclusivos na complementação de *S. cerevisiae*, decidimos testar a complementação de *S. pombe* com o gene *Trhxt1*.

Para isso, o gene *Trhxt1* foi clonado no vetor de expressão pREP1 (Maundrell, 1993). O plasmídeo resultante, denominado de pREP1-TrHXT1, foi utilizado para a transformação da cepa mutante YGS5 de *S. pombe* (Mildbradt & Hofer, 1994). O gene do transportador de glicose Ght1p, de *S. pombe*, foi clonado no mesmo vetor e utilizado como controle positivo.

A complementação de *S. pombe* pelo gene *Trhxt1* não foi observada (Fig. 16b).

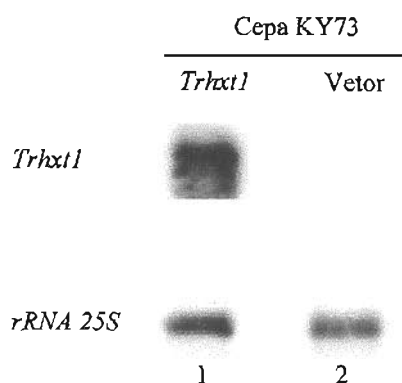


Fig. 17. Análise da expressão de *Trhxt1* em *S. cerevisiae*. Células da cepa KY73, transformadas com o plasmídeo pYH41, contendo o gene *Trhxt1* (coluna 1), ou com apenas o vetor (coluna 2), foram cultivadas em maltose 2%, na presença de CuSO_4 $0,1 \text{ mmol l}^{-1}$, até a fase exponencial de crescimento. O gene de rRNA 25s foi utilizado como controle interno.

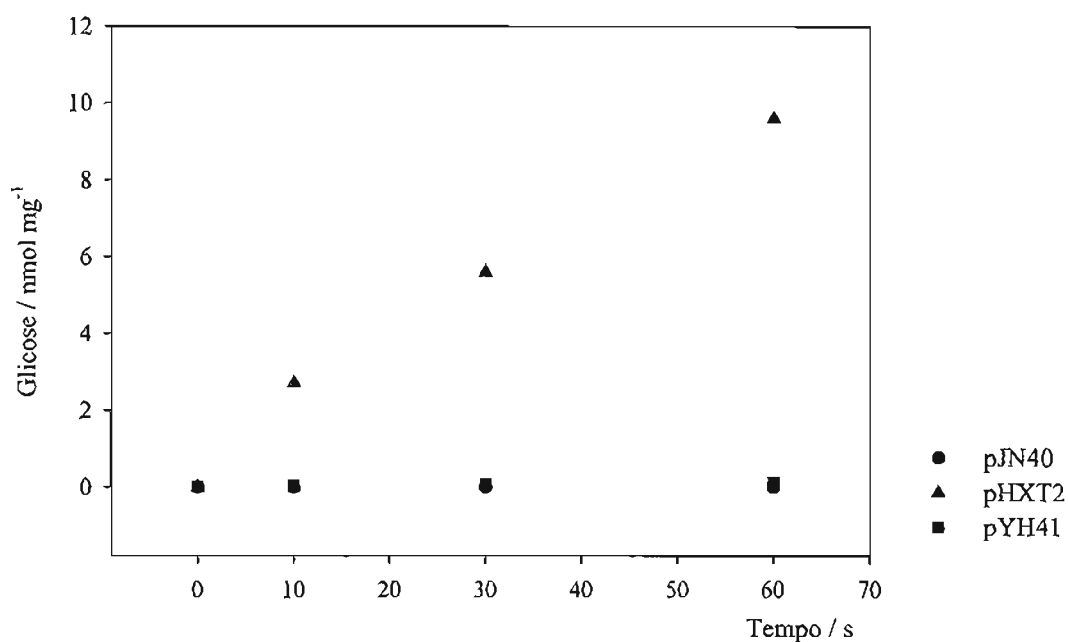


Fig. 18. Análise cinética do transporte de glicose em *S. cerevisiae*. O gráfico apresenta a captação de glicose em células da cepa KY73 de *S. cerevisiae* transformadas com os plasmídeos pYH41, pHXT2 ou com apenas o vetor (pJN40). pYH41 e pHXT2 contêm, respectivamente, o gene *Trhxt1*, de *T. reesei*, e o gene *HXT2*, de *S. cerevisiae*. O ensaio de transporte foi realizado conforme descrito em Coons *et al.* (1995). A concentração de glicose neste experimento foi de 5 mmol l^{-1} . Os pontos indicados no gráfico correspondem aos valores médios de leituras feitas em duplicata.

5.6 Nocaute de *Trhxt1* em *T. reesei*

A caracterização funcional do gene *Trhxt1* foi investigada através do nocaute do gene em *T. reesei*. Um cassete de integração (Fig. 19a) foi construído para substituir, por recombinação homóloga, o locus *Trhxt1*.

A construção do cassete de integração envolveu várias etapas, que se encontram descritas em Materiais e métodos.

A porção final do gene *Trhxt1*, compreendendo os 4 últimos segmentos transmembrânicos, foi substituída pelo gene de higromicina fosfotransferase (Hph) (Gritz & Davies, 1983). A interrupção da sequência de aminoácidos de TrHXT1 foi feita imediatamente antes de um motivo altamente conservado entre transportadores da MFS, localizado entre TM8 e TM9, conforme discutido anteriormente.

Em *N. crassa* (Madi *et al.*, 1997), um mutante nulo do gene *rco-3* foi construído de forma semelhante. Neste mutante, a sequência de aminoácidos da proteína foi interrompida no mesmo local. Cabe ressaltar que o fenótipo deste mutante é similar a de outros nos quais toda a sequência codificadora do gene foi deletada.

A enzima HPH inativa o antibiótico higromicina B (Hyg) por fosforilação. Dessa forma, a seleção das células transformadas foi feita pelo plaqueamento em PDA, suplementado com Hyg (100 µg ml⁻¹). O gene *hph* está sob o controle do promotor constitutivo (*P_{trpC}*) e do terminador (*T_{trpC}*) do gene de triptofano C de *A. nidulans* (Cullen *et al.*, 1987; Staben *et al.*, 1989).

A inserção de seqüências modificadas *in vitro* em localizações específicas no DNA genômico tem sido empregada em diversos estudos. Em fungos filamentosos, a freqüência de integração do DNA exógeno, por recombinação homóloga, depende da espécie ou, ainda, do locus de integração. Em geral, no entanto, a freqüência de substituição homóloga parece ser estimulada pelo comprimento das seqüências homólogas derivadas do locus alvo, e pela utilização de fragmentos lineares de DNA (Suominen *et al.*, 1993; Shiotani & Tsuge, 1995; Steiner *et al.*, 1995; Bird & Brshaw, 1997).

De acordo com Karhunen *et al.* (1993), a freqüência de substituição homóloga, no locus *cbh1* de *T. reesei*, utilizando-se um cassete de integração linear, com seqüências homólogas de 2 kb, atinge valores de até 63%.

A partir destes dados, construímos um cassete de integração no qual o gene *hph* está flanqueado por fragmentos de 1,7 e 3,0 kb, derivados do locus *Trhxt1* (Fig. 19a).

Esporos de *T. reesei* foram transformados com o cassete de integração pelo método de biobalística. Após a transformação e seleção dos transformantes, conforme descrito em Materiais e métodos, os transformantes obtidos foram analisados PCR e *southern blot*. De 24 transformantes analisados, apenas um teve o locus *Trhxt1* corretamente substituído pelo cassete de integração.

Na Fig. 19b, está indicada a análise de um transformante que teve o locus *Trhxt1* corretamente substituído pelo cassete de integração. Conforme se pode ver no esquema apresentado, a porção final do gene *Trhxt1* foi substituída pelo gene *hph*. Na análise do locus *Trhxt1* com a enzima de restrição *BamHI*, vemos que um fragmento de 2,2 kb, presente na cepa selvagem QM 9414 (coluna 1), foi substituído por um fragmento de, aproximadamente, 7 kb, no mutante $\Delta Trhxt1$ (coluna 2). Isto ocorre porque o fragmento removido da extremidade 3' do gene *Trhxt1* continha um sítio de *BamHI* (indicado por um asterisco).

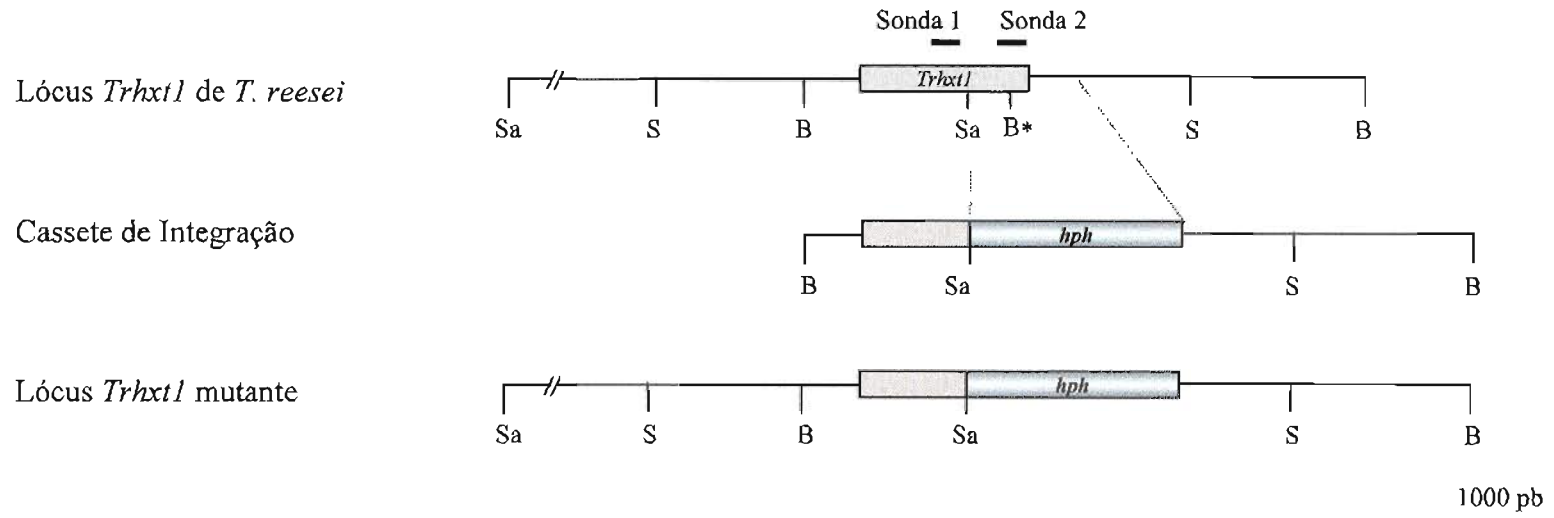
Análises semelhantes com várias enzimas de restrição indicaram a correta substituição do locus *Trhxt1* pelo cassete de integração.

A análise por *southern blot* da cepa mutante $\Delta Trhxt1$ foi feita, ainda, com uma sonda da região 3' do gene *Trhxt1* (sonda 2). Esta sonda corresponde a um fragmento de *Trhxt1* que foi removido durante a construção do cassete de integração. De acordo com o esperado, não houve hibridização desta sonda com o DNA genômico da cepa mutante $\Delta Trhxt1$.

O crescimento do mutante $\Delta Trhxt1$ foi testado em placas contendo meio mínimo suplementado com diferentes fontes de carbono. A taxa de crescimento da cepa mutante foi menor que a observada na cepa selvagem em diferentes concentrações de glicose, desde valores muito baixos, inferiores a $100 \mu\text{mol l}^{-1}$, a concentrações mais altas, de 50 a 100mmol l^{-1} (resultados não apresentados).

O mesmo comportamento foi observado em manose e frutose.

A



B

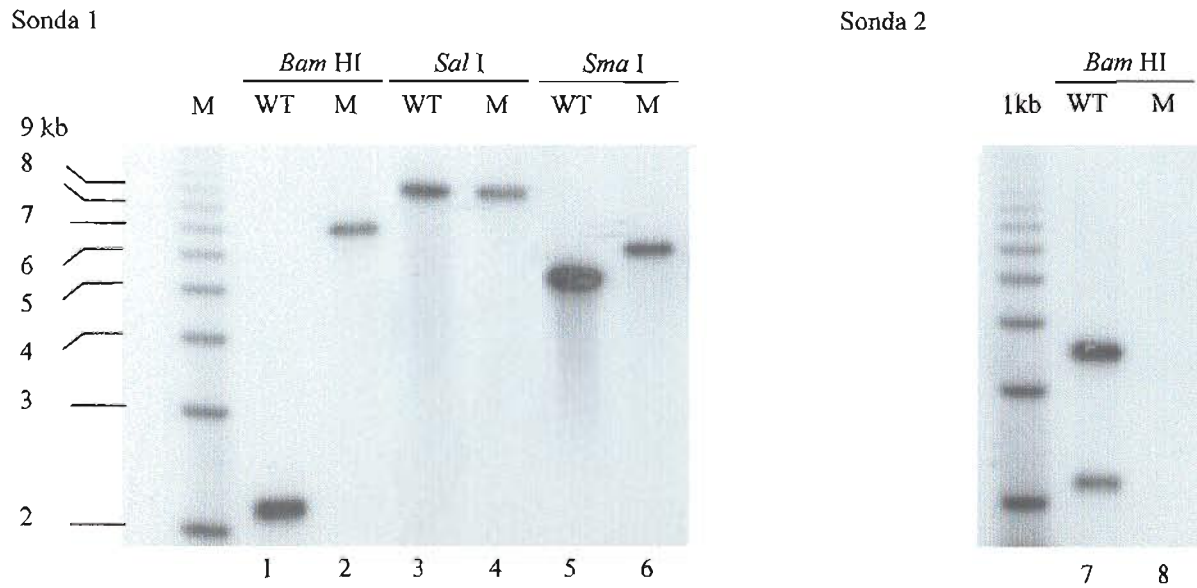


Fig. 19. Análise da cepa $\Delta Trhxt1$ de *T. reesei* por *southern blot*. A) Representação esquemática do locus *Trhxt1* da cepa QM 9414 de *T. reesei* e da cepa mutante $\Delta Trhxt1$. B) Amostras de DNA genômico da cepa selvagem (WT) e do mutante (M) foram clivadas com as enzimas de restrição indicadas e hibridizadas, separadamente, com as sondas 1 e 2. B, *Bam*HI; S, *Sma*I; Sa, *Sal*I.

5.7 Caracterização do transporte de glicose em *T. reesei*

A análise cinética do transporte de glicose em *T. reesei* foi feita em diferentes condições experimentais. As células utilizadas nos experimentos de transporte encontravam-se na fase inicial do processo de germinação ou se constituíam de esporos recém germinados. Em todos os casos, as células foram cultivadas em baixos níveis de glicose (<0,05% m/v).

Primeiramente, a captação de glicose na cepa selvagem QM 9414 foi determinada em função do tempo. Esporos de *T. reesei* foram inoculados em meio rico, na presença de glicose 2 % (m/v), por 10h. Após esse tempo, as células foram recolhidas por centrifugação (16 000 x g por 15 min, a 4°C) e transferidas para o mesmo volume de meio fresco contendo glicose 0,05 %, por 2 h. A seguir, as células foram recolhidas por filtração e suspensas em fosfato de potássio 100 mmol l⁻¹, pH = 5,0, a uma concentração em torno de 8 mg ml⁻¹.

Observamos, na Fig. 20, que a faixa de linearidade entre a captação de glicose, medida em nmol mg⁻¹ (peso seco), e o tempo se estende por, pelo menos, 45 s. A fim de se evitar possíveis efeitos do metabolismo da glicose nos dados de transporte, os experimentos subsequentes foram realizados com tempos de incubação entre 15 e 30 s, conforme indicado.

A análise do transporte de glicose em diferentes concentrações de glicose (0,2-160 mmol l⁻¹), nas mesmas condições descritas acima, está apresentada na Fig. 21, na forma de Michaelis-Menten e de Eadie-Hofstee. Tradicionalmente, gráficos de Eadie-Hofstee, nos quais a velocidade de transporte é dada em função da razão velocidade/concentração de substrato, têm sido utilizados para a apresentação de dados de transporte.

O gráfico de Eadie-Hofstee apresentado na Fig. 21b é típico de um sistema de transporte bifásico, devido a não linearidade dos dados. Isto indica que o transporte de glicose em *T. reesei* é realizado por um sistema constituído de dois componentes, um de alta e outro de baixa afinidade.

A. nidulans e *N. crassa* são fungos filamentosos que têm o solo, um ambiente pobre em nutrientes, como seu habitat natural. Nestes microorganismos, o transporte de alta afinidade apresenta valores de K_m inferiores a 100 $\mu\text{mol l}^{-1}$, conforme discutido anteriormente.

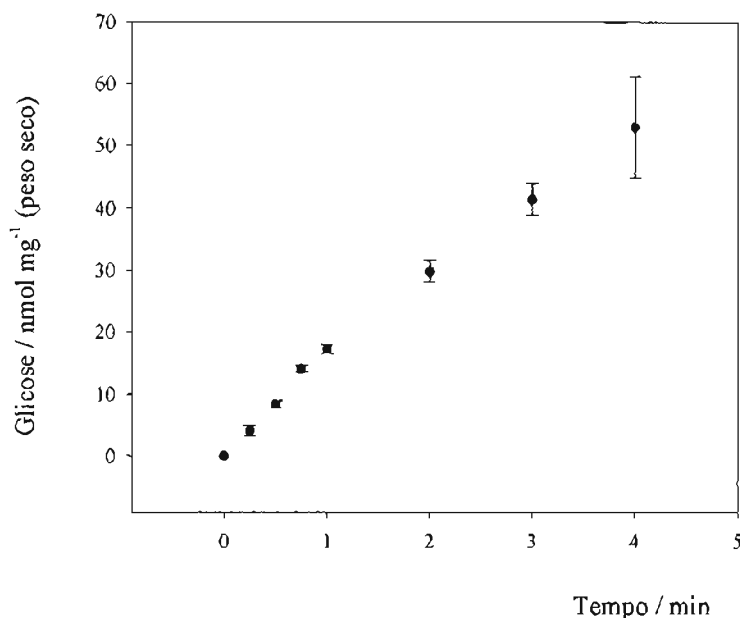


Fig. 20. Captação de glicose em função do tempo na cepa QM 9414 de *T. reesei*. Os ensaios de transporte foram realizados em células recém germinadas, conforme discutido no texto. A concentração de glicose utilizada neste experimento foi de 5 mmol l^{-1} . Os pontos apresentados correspondem ao valor médio de leituras em triplicata. As barras referem-se a 2 vezes o desvio padrão de cada ponto.

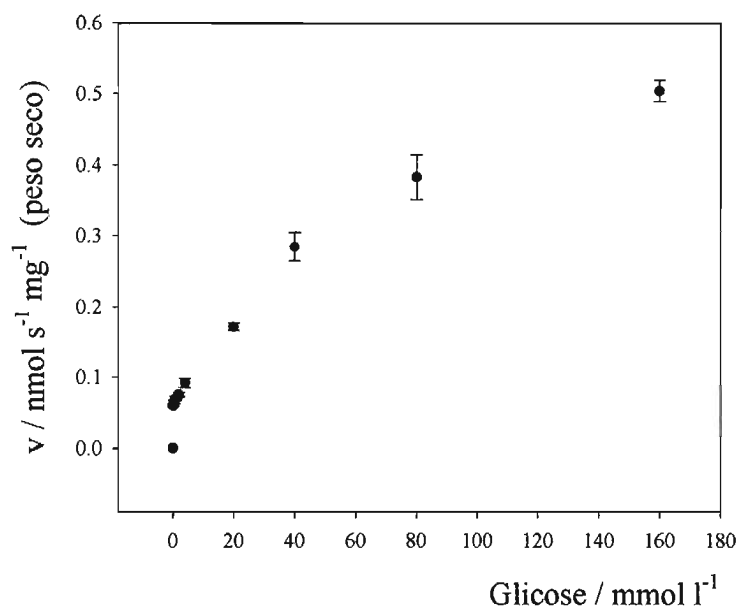
Considerando-se que o fungo *T. reesei* também é um habitante natural do solo, resolvemos investigar o transporte de glicose na faixa entre 5 e $100 \mu\text{mol l}^{-1}$.

Neste caso, os experimentos foram realizados com esporos em um estágio de germinação mais inicial que o dos experimentos descritos anteriormente. Esporos de *T. reesei* foram inoculados na presença de glicose $0,8 \text{ mmol l}^{-1}$, por 6h30. Ao microscópio, as células recolhidas neste estágio se apresentavam intumescidas, no início de formação dos tubos germinativos.

Devido às concentrações muito baixas de glicose, a concentração das células nos ensaios foi reduzida para valores em torno de $0,4 \text{ mg ml}^{-1}$. Em todos os casos, o consumo de glicose não excedeu 10% da quantidade total de glicose disponível.

Primeiramente, fizemos experimentos de captação de glicose em função do tempo, em intervalos de 10, 15 e 20 s, em diferentes concentrações de glicose (Fig. 22a). Os ensaios de transporte foram feitos em duplicata, cuja variação entre as 2 leituras foi, em geral, inferior a 5 %.

A



B

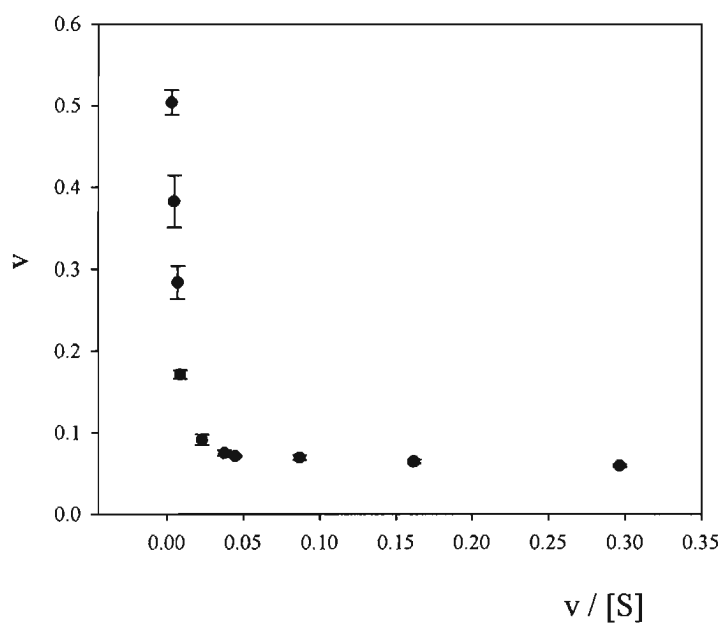


Fig. 21. Representação esquemática do transporte de glicose em *T. reesei*. A) Captação de glicose em função da concentração de substrato (0,2 – 160 mmol l⁻¹). Os ensaios de transporte foram realizados conforme discutido no texto, em tempos de incubação de 30 s. B) Gráfico de Eadie-Hofstee, indicando que a captação de glicose em *T. reesei* é mediada por um sistema constituído de, pelo menos, dois transportadores. Os pontos experimentais correspondem ao valor médio de leituras em triplicata. As barras correspondem ao desvio padrão de cada ponto.

Ao invés de valores médios, o gráfico da Fig. 22a apresenta os valores em duplicata obtidos durante o experimento. A partir destes dados, os valores de velocidade em cada concentração de glicose foram calculados por regressão linear.

Em seguida, estes valores de velocidade foram utilizados para a construção de um gráfico de velocidade em função da concentração de glicose (Fig. 22b). Os pontos experimentais neste gráfico puderam ser ajustados, adequadamente, a um sistema de transporte constituído de um único componente. Isto foi feito através da regressão não linear dos pontos à equação de Michaelis-Menten, utilizando-se o programa Sigma Plot.

Os valores obtidos de V_{max} e K_m , através deste ajuste, foram iguais a, respectivamente, $0,33 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (peso seco) e $18 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Os dados estatísticos referentes a este ajuste estão apresentados na Tabela 7.

Este valor de K_m é semelhante ao observado no sistema de transporte de outros microorganismos adaptados a ambientes relativamente pobres em nutrientes, tais como *N. crassa*, *A. nidulans* e *C. utilis*, conforme vimos anteriormente.

Em *T. harzianum*, o K_m do transporte de alta afinidade por glicose foi recentemente calculado em $12 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ (Delgado-Jarana, submetido), um valor muito próximo do que obtivemos para o fungo *T. reesei*.

Transporte de glicose na cepa mutante $\Delta Trhxt1$

De acordo com os dados de expressão vistos anteriormente, a expressão de *Trhxt1* parece ocorrer apenas em baixos níveis de glicose (em torno de $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$). Por esta razão, resolvemos analisar a captação de glicose no mutante $\Delta Trhxt1$ no intervalo entre 5 e $100 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ de glicose.

Os ensaios de transporte foram realizados em condições semelhantes às do experimento apresentado na Fig. 22. Neste caso, porém, a captação de glicose foi analisada em apenas um tempo de incubação (15 s).

Os dados obtidos estão apresentados na Fig. 23. Observamos uma discreta redução na taxa de captação de glicose no mutante $\Delta Trhxt1$.

Estes resultados sugerem que o gene *Trhxt1* esteja envolvido com transporte em baixas concentrações de glicose. É claro, no entanto, que outros transportadores, além de TrHXT1, atuam na captação de glicose em *T. reesei* nesta faixa de concentrações de glicose.

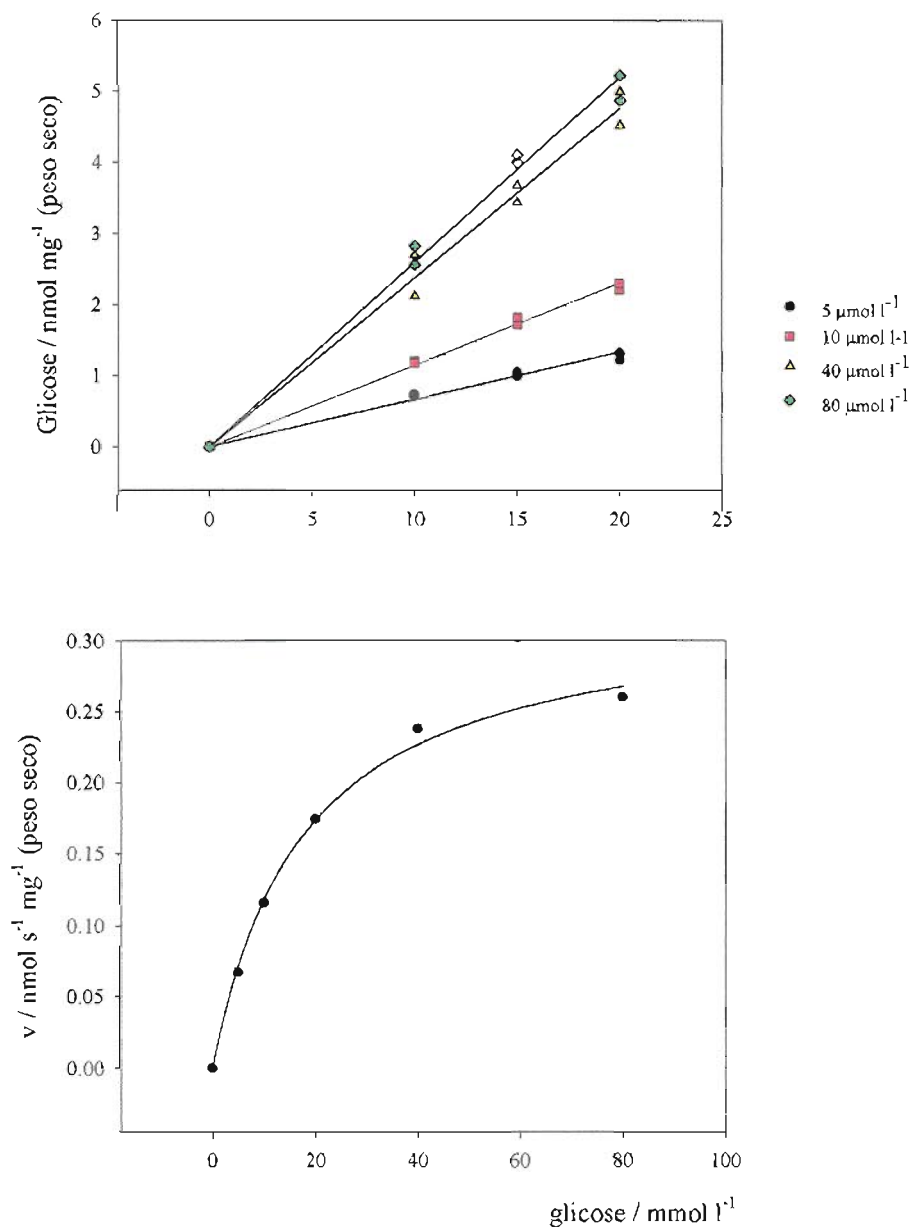


Fig. 22. Representação esquemática do transporte de glicose em *T. reesei*. A) Captação de glicose em função do tempo, em diferentes concentrações de glicose. Os valores obtidos de leituras em duplicata estão apresentados no gráfico. B) Velocidade de transporte em função da concentração de glicose. Os valores de velocidade apresentados neste gráfico foram calculados a partir da regressão linear dos pontos apresentados em A. A curva apresentada foi obtida por regressão não linear dos pontos, utilizando-se o programa SigmaPlot (Tabela 7).

Tabela 7 Parâmetros cinéticos do transporte de glicose em *T. reesei* em concentrações $\leq 100 \mu\text{mol l}^{-1}$.

$K_m / \mu\text{mol l}^{-1}$	$V_{max} / \text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$	Dados estatísticos		
		n*	R	F
17,7 (1,9)	0,33 (0,01)	6	0,998	927,4

Os valores de K_m e V_{max} foram obtidos pela regressão não linear dos dados apresentados no gráfico da Fig. 22b. Os valores em parênteses referem-se ao desvio padrão das estimativas. O cálculo foi feito com o programa Sigma Plot

* Número de pontos utilizados na regressão

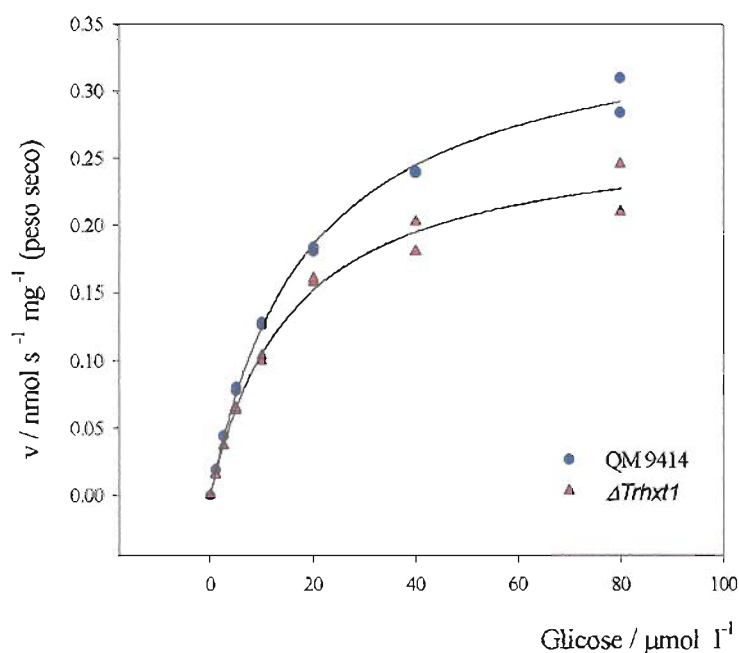


Fig. 23. Captação de glicose na cepa selvagem QM 9414 de *T. reesei* e na cepa mutante ΔTrhxt1 . Os ensaios de transporte foram realizados conforme descrito no texto. Os valores obtidos de leituras em duplicata estão apresentados no gráfico para cada concentração de glicose.

5.8 Expressão do sistema de celulases de *T. reesei*

Durante o crescimento de *T. reesei* em celulose, a ação coordenada de seu sistema celulolítico promove a hidrólise de celulose a glicose. Celobiohidrolases e endoglucanases atuam em sinergismo sobre a celulose, produzindo celobiose e outros oligossacarídeos, que são convertidos em glicose pela ação de β -glicosidases.

Em culturas de *T. reesei* realizadas na presença de celulose, observa-se que a concentração de açúcares redutores no meio de cultura torna-se progressivamente maior, enquanto a concentração de glicose se mantém relativamente constante, abaixo de $100 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Abrahão-Neto, 1991).

Conforme vimos, a expressão do gene *Trhxt1* foi observada nesta faixa de concentrações de glicose. Por esta razão, decidimos analisar a expressão de *Trhxt1* durante o cultivo de *T. reesei* em celulose.

Esporos de *T. reesei* foram inoculados (10^6 esporos ml^{-1}) em meio rico, contendo celulose microcristalina 0,8 % (Forlab), e a cultura acompanhada através de alíquotas retiradas ao longo do tempo. Observamos, na Fig. 24, que a expressão de *Trhxt1*, inicialmente não detectada, é induzida durante o crescimento do fungo em celulose.

Estes resultados sugerem que a proteína TrHXT1 esteja envolvida com a captação da glicose gerada a partir da hidrólise da celulose.

A expressão do gene *Trhxt2*, por outro lado, se manteve constante durante o crescimento o fungo em celulose. Este resultado, associado aos dados de expressão do gene em glicerol e em diferentes concentrações de glicose, sugere que a expressão de *Trhxt2* ocorra de forma relativamente constitutiva, independentemente da fonte de carbono ou da concentração de glicose.

Além de celulose, o sistema de celulases de *T. reesei* é intensamente induzido pelo dissacarídeo soforose; neste caso, porém, o tempo de indução, de 4 h, é significativamente menor que o observado na presença de celulose, de 14 h. A indução por celulose requer, inicialmente, a formação de um indutor solúvel pela expressão basal do sistema celulolítico, o que torna, provavelmente, o processo de indução mais lento (Henrique-Silva *et al.*, 1996; Carle-Urioste *et al.*, 1997).

A indução de *Trhxt1* durante o cultivo de *T. reesei* em celulose nos levou a investigar a possibilidade de que o gene também estivesse expresso na presença de soforose.

Esporos de *T. reesei* foram inoculados (10^6 esporos ml^{-1}) em glicerol 0,8 % por 24 h. Após esse tempo, o micélio do fungo foi lavado e incubado em fosfato de potássio 100 mmol l^{-1} por 2h. Em seguida, as células foram transferidas para meio fresco contendo sofrorose $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$. A cultura foi monitorada por 4 h.

De acordo com os resultados apresentados na Fig. 25, o mRNA de *Trhxt1* é induzido em sofrorose.

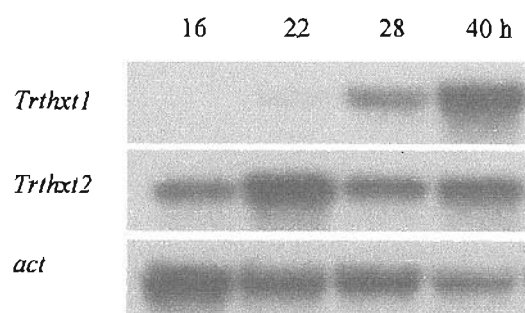


Fig. 24. Análise da expressão dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2* durante o cultivo de *T. reesei* em celulose. Esporos do fungo foram inoculados (10^6 esporos ml^{-1}) em meio rico contendo celulose microcristalina 0,6 % (m/v). Aliquotas foram removidas para a preparação de RNA nos tempos indicados.

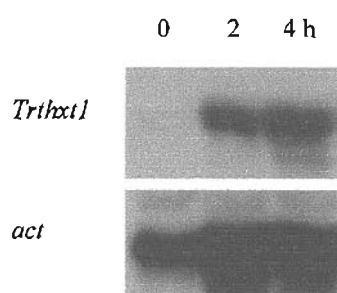


Fig. 25. Análise da expressão de *Trhxt1* em sofrorose. Esporos de *T. reesei* foram inoculados (10^6 esporos ml^{-1}) em glicerol 0,8 % por 24 h. Após esse tempo, o micélio do fungo foi lavado e incubado em fosfato de potássio 100 mmol l^{-1} por 2h. Em seguida, as células foram transferidas para meio fresco contendo sofrorose $2,5 \text{ mmol l}^{-1}$. Nos tempos indicados, aliquotas foram recolhidas para a preparação de RNA. O gene de actina foi utilizado como controle interno.

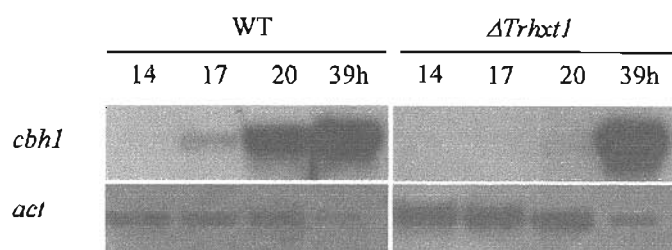
A partir destes resultados, resolvemos analisar a expressão do sistema de celulases de *T. reesei* na cepa mutante $\Delta Trhxt1$. A expressão do sistema foi monitorada pela expressão do gene *cbh1*, que codifica celobiohidrolase I, a celulase abundante do sistema celulolítico de *T. reesei*. É importante notar que a expressão do sistema é feita de forma coordenada e que, portanto, é possível analisar a expressão de todo o sistema através de apenas um de seus membros (Torigoi *et al.*, 1996).

Interessantemente, a expressão do gene *cbh1* está significativamente retardada na cepa mutante $\Delta Trhxt1$ (Fig. 26a). Estes resultados sugerem que o transporte de glicose tenha um papel importante nos mecanismos de indução dos genes das celulases de *T. reesei*.

Quando analisamos a indução do sistema com soforose, no entanto, não foram observadas alterações entre cepa selvagem QM 9414 e a cepa mutante $\Delta Trhxt1$ (Fig. 26b).

Uma vez que a expressão de *cbh1* não está alterada na indução com soforose, é razoável supor que o transporte de glicose seja importante para a formação do indutor solúvel do sistema a partir de celulose.

A



B

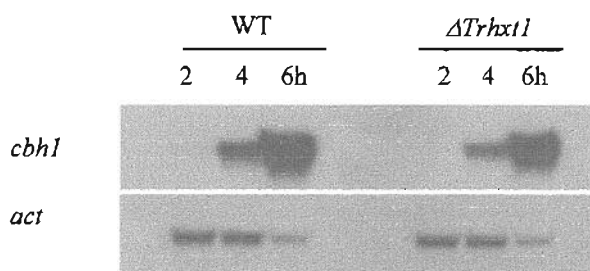


Fig. 26. Análise da expressão do gene *cbh1* de *T. reesei* na cepa mutante $\Delta Trhxt1$. A indução do sistema de celulases foi feita na presença de celulose (A) ou sofrorse (B). Nos dois casos, esporos da cepa selvagem QM 9414 (WT) e da cepa mutante $\Delta Trhxt1$ foram inoculados em glicerol 0,8 % (m/v) por, aproximadamente, 24 h. Em seguida, o micélio do fungo foi lavado e incubado em fosfato de potássio 100 mmol l⁻¹ por 2 h. Após esse tempo, o micélio do fungo foi transferido para meio fresco contendo celulose microcristalina 0,8 % ou sofrorse 2,5 mmol l⁻¹. Note a diferença no tempo de indução de *cbh1* entre celulose e sofrorse. O gene de actina foi utilizado como controle interno.

6. Discussão

Com o advento da era genômica, tornou-se possível a comparação de ESTs de diferentes organismos ou, ainda, a comparação de genomas completos. Em Zeng *et al.* (2001), os genomas de *C. albicans*, *N. crassa* e *Cryptococcus neoformans* que, naquele momento, encontravam-se quase concluídos, foram comparados entre si e com o genoma de *S. cerevisiae*. A comparação foi feita com base em ORFs identificadas no genoma de cada organismo. Além disso, ESTs de *A. nidulans*, *N. crassa*, *Fusarium sporotrichioides*, *C. neoformans* e de seres humanos foram comparados neste trabalho. Os resultados obtidos confirmaram, em termos quantitativos, a grande diversidade taxonômica entre os fungos em geral. Como exemplo, podemos citar as leveduras *S. cerevisiae* e *S. pombe*, cuja distância evolutiva entre si é tão grande quanto a que apresentam com seres humanos (Forsburg, 1999).

O aspecto mais importante do trabalho de Zeng *et al.* (2001), no entanto, foi a demonstração de que o número de proteínas homólogas entre as diversas espécies de fungo utilizadas em seu trabalho e os seres humanos é, praticamente, 2 vezes maior que o número encontrado quando se faz a comparação apenas entre *S. cerevisiae* e o homem.

Estes resultados nos dizem que é preciso ampliar o número de microorganismos utilizados como modelo no estudo de genes humanos.

Em comparação a organismos unicelulares, tais como *S. cerevisiae*, os fungos filamentosos apresentam estruturas morfológicamente mais complexas, especializadas para a reprodução, infecção e crescimento vegetativo, o que torna o seu uso relevante no estudo de células eucarióticas (Casselton & Zolan, 2002).

Em relação a estas considerações, cabe destacar, aqui, o papel histórico dos primeiros mutantes auxotróficos de *N. crassa*, no trabalho pioneiro de Beadle & Tatum (1941). Ao revelar a relação funcional entre genes e enzimas, este trabalho estimulou o uso de microorganismos na pesquisa genética e abriu uma nova era entre a bioquímica e a genética molecular.

Recentemente, a contribuição de *N. crassa* para o estudo de células eucarióticas foi revista por Davis & Perkins (2002), e inclui estudos sobre recombinação, ritmo circadiano e metilação de DNA.

Nesta perspectiva, acreditamos que o banco de dados de ESTs de *T. reesei* (<http://www.trichoderma.iq.usp.br>) irá contribuir para o desenvolvimento e diversificação

da pesquisa científica neste microorganismo, sobretudo nas áreas de biologia molecular e celular.

No presente trabalho, descrevemos a caracterização de dois genes, *Trhxt1* e *Trhxt2*, supostamente envolvidos com o transporte de glicose no fungo filamentosso *T. reesei*. Estes genes foram identificados no banco de dados de EST de *T. reesei*, e codificam proteínas com alta similaridade a transportadores de glicose de vários microorganismos.

A seqüência codificadora de *Trhxt1*, interrompida por dois introns, de 55 e 57 pb, codifica uma proteína de 548 aminoácidos, com massa molar prevista de 60,4 kD. A similaridade de TrHXT1 é especialmente alta com o transportador de glicose GTT1, de *T. harzianum* - 96,5 % de similaridade em um alinhamento completo das duas proteínas, de acordo com o programa Gap. Depois de GTT1, a maior similaridade de TrHXT1 foi observada com transportadores de glicose de leveduras: Hgt1p (55,7 %), de *K. lactis*, e Hgt1p (53,7 %), de *C. albicans*.

O gene *Trhxt2*, por sua vez, apresenta apenas um intron, de 71 pb, e codifica uma proteína de 554 aminoácidos e massa molar prevista de 60,5 kD. A maior similaridade de TrHXT2 foi observada com transportadores de glicose de outras espécies de fungos multicelulares: AmMST1 (56,3 %), de *A. muscaria*, e HXT1 (49,9 %), de *U. fabae*.

A análise computacional de *Trhxt1* e *Trhxt2* indica que ambos fazem parte da MFS, inseridos na família de transportadores de açúcares (SP) (Pao *et al.*, 1998). Assim como ocorre com os demais membros da família SP, TrHXT1 e TrHXT2 apresentam 12 segmentos transmembrânicos, com uma longa e hidrofílica alça citoplasmática conectando TM6 e TM7.

O alinhamento múltiplo de TrHXT1 e TrHXT2 entre si e com membros representativos de transportadores de glicose de microorganismos eucariotos revelou a presença de motivos conservados e característicos de transportadores de açúcares da família SP, tanto em TrHXT1 quanto em TrHXT2.

Kasahara *et al.* (1997) demonstraram que dois aminoácidos localizados na TM 10 do transportador Gal2p de *S. cerevisiae*, Tyr⁴⁴⁶ (Y) e Trp⁴⁵⁵ (W), são fundamentais para o reconhecimento e transporte de galactose. Em particular, a substituição de Tyr⁴⁴⁶ por qualquer um dentre os outros 19 aminoácidos resulta em proteínas incapazes de captar galactose.

O transportador de glicose Hxt2p, também de *S. cerevisiae*, não realiza o transporte de galactose. Os aminoácidos de Hxt2p correspondentes a Tyr⁴⁴⁶ e Trp⁴⁵⁵ de Gal2p são,

respectivamente, Phe⁴³¹ (F) e Tyr⁴⁴⁰. A substituição destes resíduos por Tyr e Trp torna Hxt2p capaz de mediar o transportar de galactose, o que comprova a importância dos aminoácidos Tyr⁴⁴⁶ e Trp⁴⁵⁵ na especificidade de Gal2p por galactose.

Por outro lado, a Phe⁴³¹ presente em Hxt2p é altamente conservada entre transportadores de glicose. Em *S. cerevisiae*, além de Hxt2p, todos os outros transportadores de glicose apresentam fenilalanina nesta posição. O mesmo ocorre com transportadores de glicose de outros microorganismos.

Interessantemente, os transportadores Ght3p e Ght4p, de *S. pombe*, que não estão envolvidos com o transporte de glicose, apresentam tirosina nesta posição, assim como Gal2p. Ght3p é um transportador de gluconato, enquanto a função de Ght4p permanece desconhecida (Heiland *et al.*, 2000).

Na Fig. 27, temos um alinhamento de vários transportadores de glicose de microorganismos eucariotos em torno de TM10. Notamos que na posição correspondente a Tyr⁴⁴⁶ de Gal2p, todos os transportadores de glicose apresentam Phe (em vermelho). Em Gal2p e Ght3p, por outro lado, que estão envolvidos, respectivamente, com o transporte de galactose e gluconato, a fenilalanina é substituída por tirosina.

Cabe destacar que tanto TrHXT1 quanto TrHXT2 apresentam Phe nesta posição, assim como os demais transportadores de glicose.

Sc_Hxt2p	I V F T C L F I F F F A I S W A P I A Y V I	442
Sc_Gal2p	I V F T C F Y I F C Y A T T W A P V A W V I	457
Sp_Ght3p	I V F S C L F L F S Y C C S W G P M G W V I	390
Hs_Glut1	I V A I F G F V A F F E V G P G P I P W F I	390
Kl_Hgt1p	I A S S Y L F V C F F A P T W G I G I W I Y	416
Th_GTT1	I A C T Y R F V A S F A P T W G P V S W T Y	413
Am_MST-1	I A F V C I Y I A F F A S T W G P M L W V I	398
Tr_TrHXT1	I A C T Y L F V A S F A P T W G P V S W T Y	413
Tr_TrHXT2	I A F I A I F I F F F A S T W G P G A W I V	439

Fig. 27. Alinhamento de vários transportadores de hexoses ao longo do segmento transmembrânico 10. Transportadores de glicose de microorganismos eucariotos apresentam um resíduo de fenilalanina (F) altamente conservado em TM10 (em vermelho). Em Gal2p, de *S. cerevisiae*, a fenilalanina é substituída por tirosina (Y), que exerce um papel crucial no reconhecimento de galactose (Kasahara *et al.*, 1997). Os organismos envolvidos na comparação são: *S. cerevisiae* (Sc), *H. sapiens* (Hs), *K. lactis* (Kl), *T. harzianum* (Th), *A. muscaria* (Am) e *T. reesei* (Tr).

Regulação da expressão de Trhxt1 e Trhxt2

A utilização adequada de glicose depende de um sistema de transporte eficiente e flexível, capaz de se ajustar à disponibilidade do açúcar no meio. Conforme vimos, a expressão dos diversos transportadores de glicose de *S. cerevisiae*, e de outros microorganismos, é regulada pela concentração extracelular de glicose, visando à utilização mais eficiente do substrato disponível.

Em geral, transportadores de baixa afinidade estão mais expressos em alta concentração de glicose, tais como Hxt1p, de *S. cerevisiae*, e Rag1p, de *K. lactis*. Em baixos níveis de glicose, por outro lado, a presença de transportadores de alta afinidade torna-se necessária para a captação do açúcar. É o caso de Hxt6p e Hxt7p, de *S. cerevisiae*, e de Hgt1p, de *K. lactis*.

O efeito de glicose na expressão de *Trhxt1* e *Trhxt2* foi investigado por *northern blot*. Durante o consumo de glicose em agitadores mecânicos, a expressão de *Trhxt1* foi observada apenas em baixos níveis de glicose ($\approx 100 \mu\text{mol l}^{-1}$); em concentrações mais altas ou após o consumo de glicose, o transcrito do gene não foi observado.

Em uma cultura contínua de *T. reesei*, utilizando-se glicose como substrato limitante, a concentração de glicose manteve-se constante em torno de $80 \mu\text{mol l}^{-1}$. Nestas condições, a expressão de *Trhxt1* foi facilmente detectada. Estes resultados sugerem que o gene *Trhxt1* esteja envolvido com o transporte de alta afinidade por glicose em *T. reesei*.

Além de TrHXT1 e GTT1, de *T. harzianum*, serem altamente similares, expressão de seus genes em glicose também é semelhante. Ambos são induzidos em baixos níveis de glicose, e reprimidos em altas concentrações. Na presença de glicerol, no entanto, o gene *gtt1* está expresso em níveis basais, ao contrário de *Trhxt1*, cuja expressão parece depender da presença de glicose.

O padrão de expressão de *Trhxt1* é semelhante ao dos genes *HXT2* e *HXT4* de *S. cerevisiae*, que também dependem de baixos níveis de glicose para a sua expressão. Na presença de glicose, a repressão de *HXT2* e *HXT4* é mediada pelo repressor Mig1p, que contém um domínio de ligação DNA do tipo *zinc finger* C_2H_2 . O efeito repressor de Mig1p ocorre ao nível transcricional, através de sua ligação ao promotor dos genes sob o seu controle. A inibição da transcrição causada por Mig1p depende do recrutamento de um complexo protéico, constituído de Tup1p e Ssn6p (Gancedo, 1998).

Na ausência de glicose, a expressão de *HXT2* e *HXT4* é reprimida por Rgt1p, cujo domínio de ligação ao DNA também envolve a presença de íons Zn^{2+} ; neste caso, porém, o domínio de ligação é do tipo $C_6 Zn_2$ (Ozcan *et al.*, 1996b).

Em *A. nidulans*, a repressão por glicose de vários genes é mediada por CREA (Ruijter & Visser, 1997). Em um mecanismo semelhante ao de Mig1p, o efeito repressor de CREA se dá através de sua ligação a seqüências específicas nos promotores de genes sob o seu controle. Isto foi claramente demonstrado em genes envolvidos no metabolismo de etanol (Kulmburg *et al.*, 1993) e prolina (Sophianopoulou *et al.*, 1993).

Em *T. reesei*, o gene de um repressor homólogo a CREA de *A. nidulans*, denominado de CRE1, foi identificado mais recentemente por Takashima *et al.* (1996) e Strauss *et al.* (1995). Nestes trabalhos, o envolvimento de CRE1 na repressão por glicose foi demonstrado na expressão dos genes *cbhl* e *xyn1*, que codificam, respectivamente, celobiohidrolase I e xilanase I.

Uma seqüência idêntica ao sítio de ligação de CRE1, presente no promotor do gene *xyn1*, foi identificado no promotor de *Trhxt1*, na posição -1361, em relação ao códon de iniciação (veja a Fig. 7, pág. 38). Isto sugere que a proteína CRE1 esteja envolvida com a repressão do gene *Trhxt1* na presença de altas concentrações de glicose.

O gene *Trhxt2*, por outro lado, apresenta um padrão de expressão muito diferenciado. Ao contrário de *Trhxt1*, a expressão de *Trhxt2* não é reprimida por glicose. Isto sugere que a proteína TrHXT2 seja importante para o transporte em altas concentrações do açúcar. É razoável, supor, portanto, que a afinidade de TrHXT2 por glicose seja relativamente menor que a de TrHXT1.

Além disso, a expressão de *Trhxt2* parece ocorrer de forma constitutiva, independentemente da concentração ou da presença de glicose. Tanto em glicerol quanto em celulose, a expressão de *Trhxt2* ocorre em níveis semelhantes aos de glicose.

Indução de Trhxt1 por hipoxia

Conforme discutido anteriormente, o transporte de glicose é estimulado por condições de hipoxia em células de mamíferos. O principal transportador responsável por este aumento na taxa de captação de glicose, ou pelo menos o mais bem estudado em relação a esse aspecto, é GLUT1. GLUT3 e GLUT4, no entanto, também estão envolvidos no aumento

do transporte de glicose em baixas concentrações de oxigênio (Bruckner *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 2000).

A atividade de GLUT 1 é estimulada por uma série de fatores, entre os quais podemos citar: fatores de crescimento, controle hormonal, transformação oncogênica e hipoxia. Ao contrário de outros genes hipóxicos em mamíferos, no entanto, a expressão de GLUT1 também é induzida por inibidores da fosforilação oxidativa.

O efeito do oxigênio na expressão dos genes *Trhxt1* e *Trhxt2* foi analisado a partir de uma cultura contínua de *T. reesei*, reduzindo-se gradualmente a concentração de oxigênio. No momento em que se iniciou a diminuição da concentração de O₂, a cultura de *T. reesei* encontrava-se em estado estacionário, no qual a concentração de todos os nutrientes do meio estava constante; nestas condições, a concentração de glicose era de, aproximadamente, 80 μmol l⁻¹.

O oxigênio exerce efeitos contrários na expressão de *Trhxt1* e *Trhxt2*. Em condições de hipoxia, a expressão de *Trhxt1* é induzida, enquanto a de *Trhxt2* é reprimida.

É interessante observar que a indução de *Trhxt1* por oxigênio é semelhante à de GLUT1, em células de mamíferos.

A indução, ao nível transcricional, de transportadores de glicose por hipoxia em microorganismos é um assunto menos estudado. Conforme vimos, a análise da expressão dos membros da família *HXT* de *S. cerevisiae*, em condições aeróbicas e anaeróbicas, não revelou um padrão diferenciado na expressão dos principais transportadores de glicose (Diderich *et al.*, 1999).

Em *S. cerevisiae*, portanto, a regulação do transporte de glicose, na carência ou na ausência de oxigênio, parece ser diferente do que se observa em células de mamíferos, pelo menos ao nível transcricional. É importante notar que a levedura *S. cerevisiae* é um microorganismo anaeróbico facultativo, capaz de se desenvolver na ausência completa de oxigênio. De fato, em culturas contínuas de *S. cerevisiae*, a redução na concentração de O₂ não provoca um aumento na concentração de glicose, como verificamos com *T. reesei*. Isto ocorre, provavelmente, porque a levedura é capaz de manter seu crescimento através do metabolismo anaeróbico.

Ao contrário de processos celulares básicos, os processos através dos quais os organismos interagem continuamente com o seu ambiente, ajustando-se às alterações naturais de seu habitat, estão sujeitos a forças de pressão seletivas diferenciadas. É razoável

que os mecanismos moleculares de regulação de tais processos sejam diferentes em espécies evolutivamente distantes.

O uso de *S. cerevisiae* como modelo de estudo da resposta adaptativa à hipoxia deve ser visto nesta perspectiva; ou seja, pela sua capacidade, desenvolvida ao longo da evolução, de se utilizar tanto da fermentação quanto da respiração, células de *S. cerevisiae* não se apresentam como um modelo adequado para a compreensão de como as células de mamíferos se adaptam a períodos de hipoxia/anoxia.

Um microorganismo estritamente aeróbico, como *T. reesei* (Chambergo *et al*, 2002), torna-se, portanto, um modelo de estudo complementar e mais adequado que *S. cerevisiae* para a compreensão dos mecanismos sensores de oxigênio em células eucarióticas.

Seria interessante, por exemplo, observar se o gene *Trhxt1* responde da mesma forma que GLUT1 à presença de metais de transição, quelantes de ferro ou inibidores da fosforilação oxidativa, fatores que estão associados à indução de GLUT1 em células de mamíferos.

Sítios semelhantes aos de HIF-1, de células de mamíferos, ou ao sítio LORE, identificado em *S. cerevisiae*, não foram identificados no promotor de *Trhxt1*. Estes elementos de controle em *cis* estão associados à indução de genes hipóxicos em baixos níveis de oxigênio.

A investigação dos mecanismos de indução do gene *Trhxt1* por hipoxia poderia fornecer informações relevantes sobre as similaridades e diferenças de tais processos entre células de mamíferos, microorganismos multicelulares e microorganismos unicelulares.

Expressão heteróloga em levedura

De acordo com os resultados apresentados, o gene *Trhxt1* de *T. reesei* não complementa cepas de *S. cerevisiae* ou de *S. pombe*, deficientes no transporte de glicose. Uma hipótese razoável é a de que a proteína TrHXT1 não esteja sendo corretamente endereçada à membrana plasmática das células de levedura.

Em Kasahara & Kasahara (1996), observou-se que o transportador GLUT1 de rato, quando expresso em *S. cerevisiae*, não contribui para a captação de glicose nas células da levedura. Experimentos de imunofluorescência indicaram que a proteína GLUT1 fica retida em vesículas intracelulares, nas células de *S. cerevisiae*.

É provável que o sinal de endereçamento à membrana plasmática de GLUT1 não seja devidamente reconhecido em *S. cerevisiae*. O mesmo pode ocorrer, portanto, na expressão de *Trhxt1* em *S. cerevisiae* ou em *S. pombe*.

Cabe mencionar que o transportador GTT1, de *T. harzinaum*, com o qual TrHXT1 apresenta alta similaridade, também não é capaz de complementar mutantes de *S. cerevisiae* deficientes no transporte de glicose.

Transporte de glicose em T. reesei

A análise do transporte de glicose em *T. reesei* revelou a presença de um sistema de transporte bifásico, constituído de um componente de alta e outro de baixa afinidade por glicose, assim como ocorre em outros microorganismos.

O transporte de nutrientes de um dado organismo ocorre no habitat específico em que o organismo está adaptado a sobreviver.

No caso de *T. reesei*, o seu habitat natural é o solo, um ambiente considerado pobre em nutrientes. De acordo com Burgstaller (1997), conforme vimos, isto corresponde a concentrações de glicose inferiores a $200 \mu\text{mol l}^{-1}$.

É natural supor, portanto, que *T. reesei* tenha desenvolvido um sistema de transporte com afinidade muito alta por glicose, e provavelmente do tipo ativo.

A análise do transporte de glicose em *T. reesei*, em concentrações de glicose que devem corresponder aos valores encontrados em seu habitat natural (de 5 a $100 \mu\text{mol l}^{-1}$), revelou a presença de um sistema de transporte com valor de K_m em torno de $20 \mu\text{mol l}^{-1}$. Este valor é semelhante ao encontrado em outras espécies de fungos filamentosos que habitam o solo, tais como, *T. harzinaum* ($K_m \approx 12 \mu\text{mol l}^{-1}$), *N. crassa* ($K_m \approx 10\text{-}60 \mu\text{mol l}^{-1}$) e *A. nidulans* ($K_m \approx 40 \mu\text{mol l}^{-1}$).

O nocaute de *Trhxt1* no fungo *T. reesei* revelou apenas uma discreta redução no transporte de glicose. Os resultados obtidos sugerem, portanto, que, além de TrHXT1, outras proteínas estejam envolvidas com o transporte em baixas concentrações de glicose em *T. reesei*.

Um destes transportadores poderia ser o produto do gene *Trhxt2*, cuja expressão, conforme vimos, também ocorre em baixos níveis de glicose ($\approx 100 \mu\text{mol l}^{-1}$).

Estes resultados não descartam, naturalmente, que TrHXT1 também esteja envolvido no transporte de outros açúcares. Em *S. cerevisiae*, os principais transportadores

de glicose de *S. cerevisiae* também são capazes de captar frutose e manose, embora façam isso com diferentes afinidades pelo substrato.

Sistema de celulases de T. reesei

Os microrganismos capazes de degradar celulose secretam, normalmente, um conjunto de celulases com diferentes modos de ação e especificidade pelo substrato, compondo um sistema enzimático de maior ou menor complexidade.

O fungo *T. reesei* produz e secreta um sistema de celulases muito eficiente na degradação de celulose, que tem sido extensivamente investigado. Durante o cultivo de *T. reesei* em celulose, a concentração de glicose mantém-se em níveis muito baixos ($< 100 \mu\text{mol l}^{-1}$). Observamos que, nestas condições, o gene *Trhxt1* encontra-se expresso, o que sugere o seu envolvimento na captação da glicose gerada pela degradação de celulose.

Interessantemente, o nocaute do gene *Trhxt1* provoca um retardado significativo na indução do sistema celulolítico de *T. reesei* por celulose. Quando o dissacarídeo sofrorose é utilizado como indutor, no entanto, não se observam alterações na expressão do sistema de celulases na cepa mutante ΔTrhxt1 .

Estes resultados sugerem que o transporte de glicose seja, de alguma forma, importante para o mecanismo de indução do sistema celulolítico de *T. reesei*. Podemos especular, ainda, que o transporte de glicose seja importante para a formação do indutor solúvel, a partir de celulose, já que a indução do sistema não está afetada na presença de sofrorose.

Conforme vimos anteriormente, supõe-se que a sofrorose seja o indutor natural do sistema de celulases de *T. reesei*. Neste modelo, a sofrorose seria formada *in vivo* a partir de celobiose pela atividade de transglicosilação de β -glicosidases. No mecanismo desta reação, a glicose tem um papel importante, atuando como um acceptor de resíduos de glicose (Crook & Stone, 1957).

Isto poderia justificar a importância do transporte de glicose na indução do sistema de celulases de *T. reesei* por celulose.

Também é possível que o atraso observado na expressão dos genes das celulases de *T. reesei* esteja associado especificamente ao gene *Trhxt1*, e não ao transporte de glicose de modo geral.

7. Conclusões

Neste trabalho, descrevemos a caracterização de dois genes, *Trhxt1* e *Trhxt2*, supostamente envolvidos com o transporte de glicose no fungo filamentosso *T. reesei*. Os dois genes codificam proteínas com alta similaridade a transportadores de glicose de vários microorganismos. A análise computacional de *Trhxt1* e *Trhxt2* indica que ambos fazem parte da MFS, inseridos na família de transportadores de açúcares (SP). Doze segmentos transmembrânicos e vários motivos conservados entre os membros da MFS foram identificados em TrHXT1 e em TrHXT2.

A expressão de *Trhxt1* ocorre apenas em baixos níveis de glicose ($\approx 100 \mu\text{mol l}^{-1}$), enquanto a de *Trhxt2* parece ocorrer de forma relativamente constitutiva, independentemente da concentração de glicose ou da fonte de carbono.

A análise cinética do transporte de glicose em *T. reesei* revelou a presença de um sistema de transporte bifásico, constituído de um componente de alta e outro de baixa afinidade por glicose. O K_m do transporte de alta afinidade em *T. reesei* é de, aproximadamente, $20 \mu\text{mol l}^{-1}$, semelhante aos valores encontrados em outras espécies de fungos filamentosos. Valores de K_m nesta faixa de concentrações de glicose ($< 100 \mu\text{mol l}^{-1}$) refletem a adaptação destes microorganismos ao solo, um ambiente relativamente pobre em nutrientes.

Dados de expressão de *Trhxt1* e a análise cinética da captação de glicose em uma cepa $\Delta Trhxt1$ indicam que o gene *Trhxt1* está envolvido com o transporte em concentrações muito baixas de glicose, em torno de $100 \mu\text{mol l}^{-1}$, que correspondem, provavelmente, aos valores encontrados no solo, o habitat natural de *T. reesei*.

Uma vez que foi observada uma redução discreta na taxa de captação de glicose no mutante $\Delta Trhxt1$, o fungo *T. reesei* deve apresentar outras proteínas envolvidas com o transporte em baixas concentrações de glicose. Um destes transportadores poderia ser o produto do gene *Trhxt2*, cuja expressão em baixos níveis de glicose também foi observada.

Um dado importante apontado neste trabalho corresponde ao efeito do oxigênio na expressão de *Trhxt1* e *Trhxt2*. A expressão de *Trhxt1* é induzida em condições de hipoxia, de forma semelhante ao que ocorre com o transportador GLUT1, em células de mamíferos. Esta indução em baixas concentrações de O_2 , por outro lado, não é observada entre os transportadores de glicose de *S. cerevisiae*. Isto se deve, provavelmente, ao fato de

S. cerevisiae ser um microorganismo anaeróbico facultativo, ao contrário de *T. reesei* e de células de mamíferos, que dependem majoritariamente do metabolismo aeróbico.

A expressão de *Trhxt2*, por outro lado, que ocorre de forma constitutiva em condições de plena aeração, é reprimida durante a falta de oxigênio.

Interessantemente, o nocaute de *Trhxt1* em *T. reesei* provoca um retardo significativo na indução do sistema de celulasas por celulose. Nenhuma alteração é observada, no entanto, quando se utiliza sofrorse como indutor. Estes resultados sugerem que o transporte de glicose tenha um papel importante na expressão dos genes das celulasas de *T. reesei*. Com base no fato de que a indução destes genes não está alterada na presença de sofrorse, podemos supor, ainda, que o transporte de glicose esteja envolvido, direta ou indiretamente, na formação do indutor solúvel do sistema de celulasas, a partir de celulose.

Cabe ressaltar que *Trhxt1* e *Trhxt2* são os primeiros genes de transportadores de monossacarídeos descritos em *T. reesei*.

Finalmente, esperamos que este trabalho possa contribuir para o preenchimento de uma lacuna em relação ao transporte de glicose em fungo filamentosos, de tal forma que se possa compreender melhor a regulação e os mecanismos envolvidos na captação de glicose nestes microorganismos.

8. Perspectivas

Na continuação deste trabalho, esperamos concluir a caracterização funcional do gene *Trhxt1*, através da análise da captação de glicose em diversas outras condições experimentais. Especificamente, pretendemos determinar o transporte de glicose em células de *T. reesei* cultivadas na presença de sofrorose. Conforme vimos, este dissacarídeo induz a expressão de *Trhxt1*, o que pode vir se tornar um modo adequado de se comparar a captação de glicose entre a cepa selvagem QM 9414 e a cepa mutante $\Delta Trhxt1$.

Ainda em relação a *Trhxt1*, pretendemos analisar com maior profundidade o controle de sua expressão por oxigênio. Tendo o fungo *T. reesei* como modelo, esperamos contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no controle do transporte de glicose por O₂ em células eucarióticas.

Por outro lado, conforme dito anteriormente, a caracterização do gene *Trhxt2* ainda se encontra em uma fase preliminar. Experimentos de complementação heteróloga em células de levedura e o nocaute do gene em *T. reesei* serão realizados em breve.

Por fim, gostaríamos de salientar que o trabalho apresentado nesta Tese introduziu nosso laboratório ao tema do transporte através de membranas, não apenas ampliando as linhas de pesquisa do laboratório, mas trazendo consigo, além disso, o aprimoramento dos demais projetos que se encontram em desenvolvimento. Esperamos, portanto, que este trabalho se torne o precursor de vários outros a serem realizados nesta área.

9. Referências Bibliográficas

01. Abrahão-Neto, J. (1991) Sinais metabólicos e o controle da expressão de celobiohidrolase I e endoglucanase I em *Trichoderma reesei*. Tese de doutoramento apresentada ao Departamento de Bioquímica o Instituto de Químico da Universidade de São Paulo.
02. 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**, 10456-10462.
03. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., & Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
04. Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. & Struhl, K.: Short Protocols in Molecular Biology (1992), 2 nd, John Wiley & Sons.
05. Bairoch, A. (1993) The PROSITE dictionary of sites and patterns in proteins, its current status. *Nucleic Acids. Res.*, **21**, 3097-3103.
06. Balasubramanian, B., Lowry, C.V. & Zitomer, R.S. (1993) The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. *Mol Cell Biol.*, **13**, 6071-6078.
07. Beadle, G.W. & Tatum, E.L. (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**, 499-506.
08. Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R. & Caro, J. (1991) Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. *J Biol Chem.*, **266**, 15563-15566.
09. Béguin, P. (1990) Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Review of Microbiology*, **44**, 219-248.
10. Behrooz, A & Ismail-Beigi, F. (1999) Stimulation of glucose transport by hypoxia: signals and mechanisms *News. Physiol. Sci.*, **14**, 105-110.
11. Bell, G.I. & Polonsky, K.S. (2001) Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. *Nature*, **414**, 788-791.
12. Billard, P., Ménart, S., Blaisonneau, J., Bolotin-Fukuhara, M., Fukuhara, H. & Wesolowski-Louvel, M. (1996) Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J. Bacteriol.*, **178**, 5860-5866.
13. Bird, D. & Bradshaw, R. (1997) Gene targeting is locus dependent in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **255**, 219-225.
14. Boles, E. & Hollenberg, C.P. (1997) The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.*, **21**, 85-111.

15. Bruckner, B. A., Ammini, C.V., Otal, M.P., Raizada, M.K. & Stacpoole, P. (1999) Regulation of brain glucose transporters by glucose and oxygen deprivation. *Metabolism*, **4**, 422-431.
16. Bruckner, R. & Titgemeyer, F. (2002) Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiol. Lett.*, **209**, 141-148.
17. Bunn, H.F. & Poyton, R. O. (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiol. Rev.*, **76**, 839-885.
18. Burgstaller, W. (1997) Transport of small ions and molecules through the plasma membrane of filamentous fungi. *Crit Rev Microbiol.*, **23**, 1-46.
19. Carruthers, A. (1990) Facilitated diffusion of glucose. *Physiol. Rev.*, **70**, 1135-1176.
20. Carle-Urioste, J.C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, O., 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**, 10169-10174.
21. Carlson, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.*, **2**, 202-207.
22. Casselton, L. & Zolan, M. (2002) The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet.*, **3**, 683-697.
23. 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**, 13093-13988.
24. Coons, D.M., Boulton, R.B. & Bisson, L.F. (1995) Computer-assisted non linear regression analysis of the multicomponent glucose uptake kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **177**, 3251-3258.
25. Cortassa, S., Aon, J.C. & Aon, M.A. (1995) Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 193-208.
26. Crook, E.M. & Stone, B.A. (1957) The enzymatic hydrolysis of β -glucosides. *Biochemistry*, **65**, 1-12.
27. Cullen, D., Leong, S.A., Wilson, L.J. & Henner, D.J. (1987) Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, *hph*. *Gene*, **57**, 21-26.
28. Cziferszky, A., Mach, R.L. & Kubicek, C. (2002) Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J. Biol. Chem.*, **17**, 14688-14694.

29. Davis, R.H. & Perkins, D.D. (2002) *Neurospora*: a model of model microbes. *Nature Rev. Genet.*, **3**, 397-403.
30. Delgado-Jarana, J., Moreno-Mateos, M.A. & Benitez, T. Glucose uptake in *Trichoderma harzinaum*: role of the *glt1* gene in glucose transport (submitted).
31. Diderich, J.A., Schepper, M., van Hoek, P., Luttik, M.A.H., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., Klaassen, P., Boelens, H.F.M., de Mattos, M.J.T., van Dam, K. & Kruckeberg, A. L. (1999) Glucose uptake kinetics and transcription of *HXT* genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15350-15359.
32. Ebert, B.L., Firth, J.D. & Ratcliffe, P.J. (1995) Hypoxia and mitochondrial inhibitors regulate expression of glucose transporter-1 via distinct cis-acting sequences. *J. Biol. Chem.*, **270**, 29083-29089.
33. 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. USA.*, **86**, 6138-6141.
34. Eveleigh, D.E. & Klein, D. (1998) Ecology of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium* (Christian P Kubicek & Gary E Harman, eds), pp. 57-74.
35. Ewing, B. & Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res.*, **8**, 186-194.
36. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.*, **8**, 175-185.
37. Forsburg, S.L. (1999) The best yeast? *Trends Genet.*, **15**, 340-344.
38. Forsythe, J.A., Jiang, B-H, Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koops, R.D. & Semenza, G.L. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.*, **16**, 4604-4613.
39. Gams, W. & Bissett, J. (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium* (Christian P Kubicek & Gary E Harman, eds), VI, pp. 3-34.
40. Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Rev.*, **62**, 334-361.
41. Gietz, R.D. & Sugino, A. (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-34.
42. Goldberg, M.A., Dunning, S.P. & Bunn, H.F. (1988) Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science*, **242**, 1412-1415.
43. Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W.,

- Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., & Oliver, S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546-567.
44. Gordon, D., Abajian, C., & Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.*, **8**, 195-202.
 45. Gritz, L. & Davies, J. (1983) Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, **25**, 179-188.
 46. Han, E., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H. & Michels, A. (1995) Characterization of *AGT1* encoding a general α -glucoside transporter form *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.*, **17**, 1093-1107.
 47. Hayashi, T., Hirshman, M. F., Fujii, N., Habinowski, S.A., Witters, L. A. & Goodyear. (2000) Metabolic stress and altered glucose transport. Activation of AMO-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism. *Diabetes*, **49**, 527-531.
 48. Heiland, S., Radovanovis, N. Hofer, M., Winderickx, J & Lichtenberg H. (2000) Multiple hexose transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.*, **171**, 1303-1308.
 49. Henderson, P.J.F. & Maiden, M.C.J. (1990) Homologous sugar transport proteins in *Escherichia coli* and their relative in both prokaryotes and eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. London Ser. B*, **326**, 391-410.
 50. 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**, 229-237.
 51. Henrissat, B. (1994) Cellulases and their interaction with cellulose. *Cellulose*, **1**, 169-196.
 52. Herrera-Estrella, A., Goldman, G.H., Van Montagu, M., & Geremia, R.A. (1990) High-efficiency transformation system for the biocontrol agents, *Trichoderma* spp. *Mol Microbiol.*, **4**, 839-43.
 53. 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**, 515-521.
 54. Iligins, C.F. (1992) ABC transporters from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **8**, 67-113.
 55. Irwin, D., Spezio, M. Walker, L. P. & Wilson. D. (1993) Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism and binding domain effects. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1002-1013.

56. Ismail-Beigi, F. (1993) Metabolic regulation of glucose transport. *J. Membr. Biol.*, **135**, 1-10.
57. Joost, H.G & Thorens, B. (2001) The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential functions of its novel member. *Mol Mem Biol.*, **18**, 247-256.
58. Karhunen, T., Mantyla, A., Nevalainen, H. & Suominen, P.L. (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. I. Endoglucanase I overproduction. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 515-522.
59. Kasahara, M., Shimoda, E. & Maeda, M. (1997) Amino acids residues responsible for galactose recognition in yeast Gal2 transporter. *J. Biol. Chem.*, **272**, 16721-16724.
60. Kasahara, T & Kasahara, M. (1996) Expression of the rat GLUT1 glucose transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **315**, 177-182.
61. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E.L.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Bioinformatics*, **17**, 646-653.
62. Kruckeberg, A. L. (1996) The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, **166**, 283-292.
63. Kruckeberg, A.L., YE, L., Berden, J.A & Dam, K van. (1999) Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with green fluorescent protein. *Biochem. J.*, **339**, 299-307.
64. 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**, 7755-7760.
65. Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J. & Felenbok, B. (1993) Specific binding sites in the alcR and alcA promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.*, **7**, 847-857.
66. 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. USA*, **96**, 5446-5451.
67. 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**, 250-265.
68. Kyte, J. & Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.

69. Jelkmann, W. (1992) Erythropoietin: Structure, control of production, and function. *Physiol. Rev.*, **72**, 449-489.
70. Lichtenberg-Fraté, H., Naschen, T., Heiland, S. & Hofer, M. (1997) Properties and heterologous expression of the glucose transporter *GHT1* from *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **13**, 215-224.
71. Lieckfeldt, E., Kuhls, K. & Muthumeenakshi. (1998) Molecular taxonomy of *Trichoderma* and *Gliocladium* and their teleomorphs. In: *Trichoderma & Gliocladium* (Christian P Kubicek & Gary E Harman, eds), pp 35-74.
72. Lowry, C.V. & Zitomer, R.S. (1988) ROX1 encodes a heme-induced repression factor regulating ANB1 and CYC7 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, **8**, 4651-4658.
73. Madi, L., McBride, S.A., Bailey, L.A. & Ebbole, D.J. (1997) *rco-3*, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics*, **146**, 499-508.
74. Maiden, M.C.J., Davis, E.O., Baldwin, S.A., Moore, D.C.M. & Henderson, P.J.F. (1987) Mammalian and bacterial sugar transport proteins are homologous. *Nature*, **235**, 641-643.
75. Mandels, M. & Reese, E.T. (1960) Induction of cellulase in fungi by cellobiose. *J. Bacteriol.*, **79**, 816-826.
76. Mantyla, A.L., Rossi, K.H., Vanhanen, S.A., Penttila, M.E., Suominen, P.L., & Nevalainen, K.M. (1992) Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum* (*reesei*) strains. *Curr. Genet.*, **21**, 471-477.
77. Maundrell, K. (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*, **123**, 127-30.
78. Marger, M.D. & Saier Jr, M. H. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 13-20.
79. Mark, C.G. & Romano, A.H. (1971) Properties of the hexose transporter systems of *Aspergillus nidulans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **249**, 216-226.
80. Matheucci, J.E. (1993) Clonagem e caracterização do gene de actina de *Trichoderma reesei*. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
81. Maxwell, P.H., Pugh, C. W. & Ratcliffe, P.J. (1993) Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: Evidence for a widespread oxygen sensing mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 2423-2427.
82. Mildbradt, B & Hofer, M. (1994) Glucose-transport-deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*: phenotype, genetics and use for genetic complementation.

83. Montenecourt, B.S. (1983) *Trichoderma reesei* cellulases. *Trends Biotechnol.*, **1**, 156-161.
84. Montenecourt, B. S. & Eveleigh, D. E. (1979) Selective screening for the isolation of high yielding cellulase mutants of *T.reesei*. *Adv. Chem. Ser.*, **181**, 289-301.
85. Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. (1991) Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Enzymology*, **194**, 795-822.
86. Necas, E. & Neuwirt, J. (1972) The effect of inhibitors of energy metabolism on erythropoietin production. *J Lab Clin Med*, **79**, 388-396.
87. Nehls U., Wiese J., Guttenberger M., & Hampp R. (1998) Carbon allocation in ectomycorrhizas: Identification and expression analysis of an *Amanita muscaria* monosaccharide transporter. *Mol Plant Microbe Interact.*, **11**, 167-76.
88. Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr. & Deerfield, (1997) GeneDoc: Analysis and visualization of genetic variation, EMBNEW.NEWS 4:14.
<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>.
89. Olson, A.L. & Pessin, J.E. (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Annu. Rev. Nutr.*, **16**, 235-256.
90. Ozcan, S. & Johnston, M. (1999) Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **63**, 554-569.
91. Ozcan, S., Dover, J. & Johnston, M. (1996a) Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J.*, **9**, 2566-2573.
92. Ozcan, S., Leong, T. & Johnston, M. (1996b) Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6419-6426.
93. Pao, S.S., Paulsen, I.T. & Saier Jr., M.H. (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Rev.*, **62**, 1-34.
94. Phaff, H.J. (1986) Ecology of yeasts with actual and potential value in biotechnology. *Microb. Ecol.*, **12**, 31-42.
95. Postma, E., Kuiper, A., Tomasouw, W.F., Scheffers, W.A. & Dijken, V.J.P. (1989) Competition for glucose between the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 3214-3220.
96. Postma, P.W., Lengeler, J.W. & Jacobson, G.R. (1993) Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiol. Rev.*, **57**, 543-594.
97. Raitt, D.C., Bradshaw, R.E. & Pillar, T.M. (1994) Cloning and characterization of the cytochrome c gene of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **242**, 17-22.

98. Reifengerger, E., Freidel, K. & Ciriacy, M. (1995) Identification of novel *HXT* genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Mol Microbiol.*, **16**, 157-167.
99. Reifengerger, E., Boles, E. & Ciriacy, M. (1997) Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their regulation to the triggering mechanism of glucose repression. *Eur. J. Biochem.*, **245**, 324-333.
100. Ruijter, G.J.G. & Visser, J. (1997) Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **151**, 103-114.
101. Saltiel, A.R. & Kahn, C.R. (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, **414**, 799-806.
102. Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour, N.Y.
103. Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5463-5467.
104. Scarborough, G.A. (1970a) Sugar transport in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **245**, 1694-1698.
105. Scarborough, G.A. (1970b) Sugar transport in *Neurospora crassa*: II. A second glucose transport system. *J. Biol. Chem.*, **245**, 3985-3987.
106. Schneider, R.P. & Wiley, W.R. (1971) Kinetic characteristic of two glucose transport systems in *Neurospora crassa*. *J. Bacteriol.*, **106**, 479-486.
107. Semenza, G.L., Neufelt, M.K., Chi, S.M. & Antonarakis, S.E. (1991) Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl acad Sci USA*, **88**, 5680-5684.
108. Semenza, G.L., Roth, P.H., Fang, H.M. & Wang, G.L. (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23757-23763.
109. Semenza, G.L. & Wang, G.L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol.*, **12**, 5447-5454.
110. Serrano, R. (1977) Energy requirements for maltose transport in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **80**, 97-102.
111. Shetty, M., Loeb, J. N., Vikstrom, K. & Ismail-Beigi, I. (1993) Rapid activation of GLUT1 glucose transporter following inhibition of oxidative phosphorylation in clone 9 cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 17225-17232.
112. Shiotani H. & Tusge T. (1995) Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol. Gen. Genet.*, **248**, 142-150.

113. Sophianopoulou, V., Suárez, T., Diallinas, G & Scazzocchio, C. (1993) Operator derepressed mutations in the proline utilization gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, **236**, 209-213.
114. Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, J., Schechtman, M., Kinsey, J. & Selker, E. (1989) Use of a bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics*, **36**, 79-81.
115. Stambuk, B.U., Araújo, P.S. de, Panek, A.D. & Serrano, R. (1996) Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **237**, 876-881.
116. Stambuk, B.U., Panek, A.D., Crowe, J.H., Crowe, L.M. & Araújo, P.S. de. (1998) Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1379**, 118-128.
117. Steiner S., Wendland J., Wright, M.C. & Philippsen P. (1995) Homologous recombination as the main mechanism for DNA integration and cause of rearrangements in the filamentous ascomycete *Ashbya gossypii*. *Genetics*, **140**, 973-987.
118. Sternberg D. & Mandels, G.R. (1979) Induction of cellulolytic enzymes in *Trichoderma reesei* by sophorose. *J. Bacteriol.*, **139**, 761-769.
119. 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 Let.*, **376**, 103-107.
120. Suominen, P.L., Mantyla, A.L., Karhunen, T., Hakola, S. & Nevalainen, H. (1993) High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol. Gen. Genet.*, **241**, 523-530.
121. Svatopluk, B., Goffrini, P., Ferrero, I. & Wesolowski-Louvel. (2001) *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics*, **158**, 541-548.
122. Takashima, S., Iikura, H., Nakamura, A., Masaki, H. & Uozumi, T. (1996) Analysis of CRE1 binding sites in *Trichoderma reesei cbh1* upstream region. *FEMS Microbiol. Rev.*, **145**, 361-366.
123. Tan, C.C. & Ratcliffe, P.J. (1991) Effect of inhibitors of oxidative phosphorylation on erythropoietin mRNA in isolated perfused rat kidneys. *Am J Physiol.*, **261**, F982-F987.
124. Ter Linde, J.J.M., Liang, H., Davis, R.W., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P. & Pronk, J.T. (1999) Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **181**, 7409-7413.
125. Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, **22**, 4673-4680.

126. Torigoi, E., Henrique Silva, F., Escobar Vera, J., Carle Urioste, J. C., Crivellaro, O., El-Dorry, H. & El-Gogary, S. (1996) Mutants of *Trichoderma reesei* are defective in cellulose induction, but not basal expression of the cellulase-encoding genes. *Gene*, **173**, 199-203.
127. Vaheri, M., Leisola, M. & Kauppinen, V. (1979) Transglycosylation products of the cellulase system of *Trichoderma reesei*. *Biotech. Lett.*, **1**, 41-46.
128. Varma A., Singh, B.B., Karnani, N., Lichtenberg-Fraté, H., Hofer, M., Magee, B.B. & Prasad, R. (2000) Molecular cloning and functional characterization of a glucose transporter, *CaHGT1*, of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **182**, 15-21.
129. Vasconcelles, M.J., Jiang, Y., McDaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C.E. & Goldberg, M.A. (2001) Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14374-14384.
130. Voegelé, R. T., Struck, C., Hahn, M. & Mendgen, K. (2001) The role of haustoria in sugar uptake during infection of broad bean by the rust fungus *Uromyces fabae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8133-8138.
131. Wang, G.L., Jiang, B-H., Rue, E.A. & Semenza, G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5510-5514.
132. Wang, G.L. & Semenza, G.L. (1993) Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: Implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood*, **82**, 3610-3615.
133. Webster, K.A. (1987) *Mol Cell Biochem.*, **77**, 19-28.
134. Weierstall, T., Cornelis, P.H. & Boles, E. (1999) Cloning and characterization of three genes (SUT1-3) encoding glucose transporters of the yeast *Pichia stipitis*. *Mol. Microbiol.*, **31**, 871-883.
135. Weinglass, A.B. & Kaback, H.R. (2000) The central cytoplasmic loop of the major facilitator superfamily of transport proteins governs efficient membrane insertion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8938-8943.
136. Wesolowski-Louvel, M., Goffrini, P., Ferrero, I. & Fukuhara, H. (1992) Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transport gene. *Mol. Gen. Genet.*, **233**, 89-96.
137. Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., van den Broek, P.J.A. & Dijken, J.P. (1994) Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.*, **58**, 616-630.
138. White, O. & Kerlavage, A.R. (1996) TDB: new databases for biological discovery. *Methods Enzymol.*, **266**, 27-40.

139. Wieczorke R., Krampe, S., Weier, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. & Boles, E. (1999) Concurrent knockout of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **464**, 123-128.
140. Williams, L.E., Lemoine, R. & Sauer, N. (2000) Sugar transporters in higher plants – a diversity of roles and complex regulation. *Trends Plant Sci*, **5**, 283-290.
141. Yu, J., Chang, P., Bhatnagar, D. & Cleveland, T.E. (2000) Cloning of a sugar utilization gene cluster in *Aspergillus parasiticus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1493**, 211-214.
142. Zeng, Q., Morales, A.J. & Cottarek, G. (2001) Fungi and humans: closer than you think. *Trends Genet.*, **17**, 682-684.

CURRICULUM VITAE

Dados Pessoais

Nome: Augusto Sávio Peixoto Ramos

Nascimento: 16/10/1971

Naturalidade: Brasília, DF

Formação Acadêmica

Ensino médio

Instituição: Colégio Marista de Brasília, Brasília, DF.

Período: De 1987 a 1989.

Graduação

Bacharelado e Licenciatura em Química

Instituição: Universidade de Brasília-UnB, Brasília, DF.

Período: De 2º/1990 a 1º/1996.

Pós-graduação

Doutorado em Bioquímica.

Instituição: Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

Publicação

Chambergo, F.S, Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J., Ramos, A.S.P., Ferreira J.R Júnior, Abrahão-Neto, J., Farah, J.P. % 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**, 13983-88.