UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

ERIK CENDEL SAENZ TEJADA

**Caracterização do gene do Fator Transcricional 3 da RNA
polimerase B (*btf3*) de *Trichoderma reesei* e efeito de seu
nocaute sobre a expressão gênica no
estresse por choque térmico**

São Paulo

Data do Depósito na SPG:
12 / 12 / 2006

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

ERIK CENDEL SAENZ TEJADA

**Caracterização do gene do Fator Transcricional 3 da RNA
polimerase B (*btf3*) de *Trichoderma reesei* e efeito de seu
nocaute sobre a expressão gênica no
estresse por choque térmico**

*Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título
de Doutor em Ciências (Bioquímica)*

Orientador: Prof. Dr. Hamza Fahmi Ali El-Dorry

São Paulo
2006

ERIK CENDEL SAENZ TEJADA

**“CARACTERIZAÇÃO DO GENE DO FATOR TRANSCRICIONAL 3 DA RNA POLIMERASE B (*btf3*)
DE *Trichoderma reesei* E EFEITO DE SEU NOCAUTE SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA NO ESTRESSE
POR CHOQUE TÉRMICO”**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*A meu filho **Dioguito**, o milagre
da minha vida que me enche de esperança e alegria.
A minha mãe Olga, a minha força distante
que nunca deixa de me incentivar.
A meu pai Nicolas e meus irmãos Lenin, Jeannet,
Alex, Nicolas, Christian, tesouros que a vida me deu.
A minha Esposa, amiga e companheira Charlotte,
obrigado por escutar meus pensamentos,
compreender meus sonos, conviver com meus defeitos
e por amar-me todos estes anos.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de me permitir desfrutar de esta seção para agradecer e homenagear as pessoas que colaboraram de alguma forma para a realização deste trabalho, apesar de que é muito difícil citar a todos e não cometer nenhuma injustiça.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Hamza El-Dorry, pela oportunidade de trabalhar com ele, e aprender cada um de seus ensinamentos nos momentos de estresse e nos momentos de descontração, lembro agora as monitorias coordenadas por ele e até nas reuniões quando discutíamos algum resultado do trabalho, e pelas inumeráveis mostras de amizade e consideração fora e dentro do âmbito profissional, por isso e tudo mais ... Muito obrigado Dorry!.

Também quero agradecer aos funcionários, pessoal técnico e administrativo do Departamento de Bioquímica, sobretudo aos técnicos do laboratório e ao pessoal da secretaria de Bioquímica.

As funcionárias e grupo de pesquisadores do laboratório do CAGE - *Center for Analysis of Gene Expression* do Departamento de Bioquímica.

Aos demais Professores e amigos, que sempre estiveram presentes quando precisei deles, entre eles: Prof. Dr. Abrahão Neto, Prof. Dr. Bayardo, Prof. Dr. Santelli (Em memória), e em especial ao Prof. Dr. João P. Simon Farah pelo tempo, paciência, amizade e contribuição para o tratamento estatístico dos dados envolvidos nas análises de “microarray”.

Aos meus queridos colegas de laboratório e amigos Augusto Ramos, Eric Bonaccorsi, Felipe Chambergo, Marluce Mantovani, César Camilo, Ynés Valencia, Adriano Freitas, Tais Campos, Fabiana Diniz, Wilton Lima e Zilda Mendoça, por cada um dos momentos compartilhados dentro e fora do laboratório. Valeu mesmo!!!

A meu querido amigo Ari Ferreira, por todos os momentos compartilhados, e por todo o esforço dedicado durante a realização e redação desta teses.

Aos meus amigos peruanos César, Paola, Miguel, Glenda, Miguelito, Julio, Celso, Miriam, Ricardo, Priscila, Marcos, Fernando, Juan e Eduardo, que com suas “bromas” nos corredores e sábados de futebol me ajudaram a relaxar quando algum resultado não estava dando certo.

Aos meus pais Julia Olga Tejada de Saenz e Nicolás Saenz Huertas e meus irmãos Lenin, Jannet, Nicolás, Alex e Christian, que sempre confiaram em mim, me apoiaram e deram suas palavras de alento e suas orações.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP pela bolsa de doutorado concedida.

***“Uma longa viagem começa
com um único passo”***
(Lao Tse)

***"Não esperes que teu barco chegue,
nade em direção a ele"***
(Samuel Johnson)

RESUMO

Saenz, E.C.T. **Caracterização do gene do Fator Transcricional 3 da RNA Polimerase B (*btf3*) de *Trichoderma reesei* e o efeito de seu nocaute sobre a expressão gênica no estresse por choque térmico**. 2006. (ex: 100p). Tese Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

A transcrição pela RNA polimerase II (RNA polimerase B) e a sínteses de proteínas são os mais importantes processos metabólicos em células eucarióticas, e estão envolvidas no controle da expressão gênica. *Trichoderma reesei* foi utilizado como modelo de estudo para o desenvolvimento deste estudo. Este fungo filamentososo é um microrganismo que vem sendo utilizado por vários laboratórios no mundo para o estudo dos diversos processos biológicos básicos devido à sua grande importância biotecnológica. Foi estabelecido por nosso grupo de pesquisa um banco de dados ESTs (“Expressed Sequence Tags”) para este microrganismo e, por meio da técnica de “microarrays” de cDNAs, determinou-se a reposta transcricional de *T. reesei* em função da disponibilidade de oxigênio e glicose, assim como a alguns estresses ambientais. Com base nesses resultados foram escolhidos alguns transcritos afetados pela limitação de oxigênio, tais como o gene *btf3*. Este gene codifica para a proteína reguladora BTF3 (Fator Transcricional 3 da RNA polimerase B), muito conservada em eucariotos, envolvida na transcrição de vários promotores da classe II e que faz parte do complexo que se liga aos polipeptídios nascentes (NAC).

Com o intuito de estudar a funcionalidade do gene *btf3* em condições normais e em choque térmico foi realizada uma análise transcricional comparativa em larga escala da cepa selvagem de *T. reesei* QM9414 e do mutante nocaute do gene *btf3*. A expressão de

aproximadamente 2.000 genes foi analisada, por meio de “microarrays”, em células submetidas ao estresse por choque térmico produzido pelo incremento da temperatura de cultura a 40°C.

O nocaute do gene *btf3* produziu o incremento da expressão dos genes das vias metabólicas primárias (ND4 e FBA), da defesa celular (DnaJ, HSP70 e RCI) e da síntese de proteínas (eIF2); enquanto que reprimiu genes da estrutura celular (HFBII) e da síntese de RNA (ATF21).

No choque térmico, genes que codificam para proteínas associadas com a defesa celular, como as chaperonas Hsp70 e DnaJ, tiveram sua expressão induzida enquanto que proteínas associadas à divisão celular, como histonas e septina B, e à síntese de proteínas, como as proteínas ribossomais, foram reprimidas em ambas as cepas como resultado do estresse. Os resultados obtidos na análise por “microarray” foram validados através de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Estes resultados sugerem que BTF3 possa atuar como repressor de alguns genes transcritos pela RNA polimerase II.

ABSTRACT

Saenz, E.C.T. **Characterization of the RNA Polymerase B Transcriptional Factor 3 (*btf3*) of *Trichoderma reesei* and the effect of its knockout on gene expression in stress by heat shock.** 2006. (ex: 100p). Tese Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Transcription by RNA polymerase II (RNA polymerase B) and protein synthesis are the most important metabolic processes in eukaryotic cells, and they are involved in the control of gene expression. *Trichoderma reesei* was used as model of study for the development of this study. This filamentous fungus is a microorganism that has been used by some laboratories around the world for the study of diverse basic biological questions due to its great biotechnological importance. We had established a data base of ESTs (Expressed Sequence Tags) for this microorganism and, through the technique of cDNA microarray, we had determined the transcriptional response of *T. reesei* to oxygen and glucose availability, as well as some environmental stresses. Based on such studies we chose some transcripts affected by oxygen limitation such as the *btf3* gene, for more detailed investigations. This gene codes for the BTF3 regulatory protein (RNA Polymerase B Transcription Factor 3), a conserved transcriptional factor among eukaryotes that is involved in the transcription of several class II promoters and is part of the nascent polypeptide-associated complex (NAC).

In order to study the functionality of the *btf3* gene in normal and heat shock conditions, a large-scale transcriptional comparative analysis between *T. reesei* wildtype strain QM9414 and the *btf3* knockout mutant was executed. The expression of approximately 2,000 genes was analyzed using microarrays in cells submitted to heat stress produced by culture temperature increment to 40°C.

The knockout of *btf3* produces the increment of the expression of genes involved with the primary metabolism pathways (ND4 and FBA), cellular defense (DnaJ, HSP70 and RCI) and protein synthesis (eIF2); whereas it repressed genes related to the structure cell (HFBII) and RNA synthesis (ATF21).

In heat shock, genes that encode Hsp70 and DnaJ proteins, associated to cellular defense, as chaperones, had their expression induced. On the other hand, genes for proteins associated to cellular division, such as histones and septin B, and those related to protein synthesis, such as ribosomal proteins were transcriptionally repressed in both strains as a result of the stress. The results obtained in the microarray analysis were validated through quantitative real-time PCR (qPCR). These results suggest that BTF3 can act as a repressor for some genes transcribed by RNA polymerase B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Modelo do complexo NAC, mostrando o papel de NAC na proteção e direcionamento das cadeias nascentes de peptídeos dos ribossomos para as membranas das mitocôndrias.	6
Figura 2: Mecanismo de resposta a choque térmico pela ativação do fator σ 32, codificado pelo gene <i>rpoH</i> . O aumento do fator σ 32 induz a transcrição de genes com resposta ao choque térmico “HSR”, em organismos procariontes	9
Figura 3: CV versus intensidade de média de fluorescência.	30
Figura 4: M(mr) versus A(mpd). A linha contínua indica a função LOWESS.	31
Figura 5: Análise da sequência nucleotídica do gene <i>btf3</i> de <i>T. reesei</i> ,	35
Figura 6: Análise da região codificante do gene <i>btf3</i> de <i>T. reesei</i> . A) Sequência de cDNA do gene <i>Trbtf3</i> ; B) Sequência de aminoácidos do proteína TrBTF3.	36
Figura 7: Subclonagem dos fragmentos do locus genômico do gene <i>Trbtf3</i> . A) Southern blot do fago <i>btf3</i> para selecionar os fragmentos para subclonagem. B) Confirmação do clone pE2 por PCR com os oligonucleotídeos denominados BTF3-EcoRI e BTF3-XhoI.	38
Figura 8: Análise comparativa entre as sequências de cDNA e de DNA genômico do gene <i>btf3</i> de <i>T. reesei</i> .	40
Figura 9. Representação esquemática do cassete de integração <i>btf3/hph</i> para recombinação homóloga.	43
Figura 10: Obtenção dos mutantes $\Delta Trbtf3$ do fungo <i>T. reesei</i> . A) Confirmação por PCR. B) “Southern blot”. C) “Northern blot”.	44
Figura 11: Curva de crescimento da cepa QM9414 selvagem e os mutantes $\Delta Trbtf3$ de <i>T. reesei</i> , em meio completo suplementado com glicerol 2%.	47
Figura 12: Indução de atividade celulolítica extracelular.	47
Figura 13: Efeito da indução com celulose da cepa QM9414 selvagem e dos mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) de <i>T. reesei</i> . Análise da expressão de <i>cbhI</i> e <i>cbhII</i> de <i>T. reesei</i> por “Northern blot”.	48

Figure 14: Análises de qPCR para avaliar a expressão gênica de <i>cbhI</i> em mutante $\Delta Trbt3$ após a indução com celulose a 2%.	49
Figura 15: Distribuição das funções celulares dos genes do mutante $\Delta Trbt3$ de <i>T. reesei</i> que tiveram alteração de pelo menos duas vezes no nível de expressão em comparação à cepa selvagem (referência).	52
Figura 16: Validação de resultados de “microarrays”. Para a comparação entre a expressão do mutantes $\Delta Trbt3$ e a cepa QM9414 selvagem de <i>T. reesei</i> .	55
Figura 17: Influência da temperatura sobre o crescimento de <i>T. reesei</i> . A) Crescimento radial da cepa QM9414 selvagem e os mutantes $\Delta Trbt3(M3$ e $M8)$ de <i>T. reesei</i> em meio mínimo (MM) e em meio PDA a 28°C e 40°C. B) Fotografia das culturas da cepa selvagem QM9414 e do mutante $\Delta Trbt3$, crescidas em meio PDA a 28°C e 40°C.	57
Figura 18: Curva de crescimento sob a influência da temperatura de 40°C. A) Cultivados em meio completo com 2% glicose, incubados a 28°C ou a 40°C. B) Fotografia dos fungos antes e depois do choque térmico.	58
Figura 19: Perfil de expressão dos genes do mutante $\Delta Trbt3$ e da cepa selvagem QM9414 de <i>T. reesei</i> submetidos a choque térmico a 40°C.	62
Figura 20 A, B, C: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de <i>T. reesei</i> induzidos ou reprimidos em 2 ou mais vezes,, em resposta ao choque térmico a 40°C, comparando a cepa selvagem QM9414 (1-5) e o mutante $\Delta Trbt3$ (6-10).	68 67 66
Figura 21: Padrões de expressão dos genes do mutante $\Delta Trbt3$ de <i>T. reesei</i> cuja expressão na condição do choque térmico foi alterada pela interrupção do gene <i>btf3</i> . A) Genes induzidos. B) Genes reprimidos.	70
Figura 22: Distribuição das funções celulares dos genes de <i>T. reesei</i> cuja expressão foi alterada, no mutante $\Delta Trbt3$ e na cepa selvagem QM9414, pelo choque térmico da cultura a 40°C.	72
Figura 23: Análises através da técnica de “microarray” do perfil transcricional de genes do metabolismo de carboidratos no fungo <i>T. reesei</i> sob choque térmico a 40°C por 30 minutos. (A) Cepa selvagem QM9414. (B) Mutante $\Delta Trbt3$.	74
Figure 24: Validação dos resultados de “microarrays”. Através de análises de qPCR para os genes TPI, PGM, PDC, DnaJ, HSP70, RCI, eFI2, rRNA 19S e ATF21 na cepa selvagem e no mutante $\Delta Trbt3$ de <i>T. reesei</i> .	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Hibridizações das lâminas de “microarray”. Condição de referência (2 horas, 28°C) marcada com fluoróforo Alexa Flúor® 555 (vermelho) e condição-teste (2 horas, 28 °C; 15min, 30 min e 60 min, 40 °C; 1 hora, 28 °C) com fluoróforo Alexa Flúor® 647 (verde), tanto para o mutante $\Delta Trbtf3$ -3 como para a cepa selvagem QM9414 de *T. reesei*. 28

Tabela 2: Seqüências nucleotídicas dos oligonucleotídeos específicos de genes de *T. reesei* utilizados durante o desenvolvimento deste projeto. 33

Tabela 3: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi reprimida significativamente pela mutação $\Delta Trbtf3$.

Tabela 4: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi induzida significativamente pela mutação $\Delta Trbtf3$.

Tabela 5: Número de genes induzidos ou reprimidos no mutante $\Delta Trbtf3$ e na cepa selvagem QM9414 de *T. reesei*, para cada condição de estudo do experimento de choque térmico, após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas. 64

Tabela 6: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi induzida/reprimida significativamente no mutante nocaute $\Delta Trbtf3$ comparada com a cepa selvagem QM9414 de *T. reesei*, na condição do experimento de choque térmico após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas. 95

Tabela 7: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi induzida/reprimida significativamente na cepa selvagem QM9414 de *T. reesei* e que não apresentaram mudanças significativas no mutante nocaute $\Delta Trbtf3$, na condição do experimento de choque térmico após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas. 117

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Fator Transcricional 3 da RNA polimerase B (<i>btf3</i>)	3
1.2.	Resposta ao choque térmico	7
1.3	<i>Trichoderma reesei</i> como sistema modelo	12
2.	OBJETIVOS	17
3.	MATERIAS E MÉTODOS	18
3.1.	Microrganismos	18
3.2.	Soluções e meios de cultura	18
3.3.	Condições de cultivo de <i>T. reesei</i>	19
3.4.	Determinação da atividade celulolítica total	19
3.5.	Manipulação de DNA e técnicas gerais de Biologia Molecular	20
3.6.	Seqüenciamento e análise computacional	21
3.7.	Construção do cassete de integração para recombinação homóloga do gene <i>btf3</i>	22
3.8.	Transformação de esporos de <i>T. reesei</i>	23
3.9.	Efeito choque térmico sobre o crescimento de <i>T. reesei</i>	24
3.9.1.	Crescimento radial em alta temperatura	24
3.9.2.	Cultivo em alta temperatura 40°C	24
3.9.3.	Experimento de choque térmico	25

3.10.	Produção e análise dos “microarrays” do mutante de $\Delta Trbtf3$	26
3.10.1.	Material para impressão e hibridização das lâminas	26
3.10.2.	Hibridização das lâminas de “microarrays”	27
3.10.3.	Normalização e análise dos dados extraídos	29
3.11.	Validação dos resultados através de Transcrição Reversa e qPCR	32
4.	RESULTADOS	
4.1.	Identificação e clonagem do gene <i>btf3</i>	34
4.2.	Obtenção de mutantes $\Delta Trbtf3$ de <i>T. reesei</i> .	40
4.3.	Efeito do rompimento do gene <i>btf3</i> sobre o crescimento de <i>T. reesei</i>	45
4.3.1.	Crescimento dos mutantes $\Delta Trbtf3$ em glicerol ou glicose.	45
4.3.2.	Crescimento dos mutantes $\Delta Trbtf3$ em celulose	45
4.4.	Análise em larga escala da expressão gênica de mutante $\Delta Trbtf3$ de <i>T. reesei</i>	50
4.5.	Efeitos da mutação $\Delta Trbtf3$ sobre a resposta de <i>T. reesei</i> ao choque térmico a 40°C.	55
4.5.1.	Efeito da temperatura a 40°C sobre o crescimento do mutante $\Delta Trbtf3$	56
4.5.2.	Resposta transcricional do mutante $\Delta Trbtf3$ ao choque térmico a 40°C	59
4.5.3.	Identificação de genes diferencialmente transcritos no mutante $\Delta Trbtf3$ pelo choque térmico a 40°C	63
5.	DISCUSSÃO	78
6.	CONCLUDES	86

7.	REFERÊNCIAS	87
	APÊNDICE	94
	SÚMULA CURRICULAR	

I. INTRODUÇÃO

Os microrganismos regulam a expressão de seus genes para poder se adequar às mudanças nutricionais e ambientais, tais como disponibilidade de fontes diversas de carbono, nitrogênio e concentração de oxigênio disperso. A regulação em nível transcricional determina, muitas vezes, mudanças metabólicas que levam à utilização de vias específicas necessárias para uma resposta fisiológica à condição em que o organismo se encontra (Ronne, 1995).

O conhecimento dos processos envolvendo a repressão e a indução de conjuntos diferentes de genes estimulou a pesquisa sobre a regulação metabólica em microrganismos unicelulares e multicelulares (DeRisi *et al.*, 1997; Chambergo *et al.*, 2002). As principais vias do metabolismo da maioria dos microrganismos eucarióticos estão preservadas, mas se tornaram reguladas distintamente. Por exemplo, um microrganismo unicelular como a levedura *S. cerevisiae* utiliza tanto a respiração quanto a fermentação, dependendo do estado metabólico da célula. Entretanto, microrganismos multicelulares como os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma*, utilizam preferencialmente a respiração (Bonaccorsi *et al.*, 2006). Com base neste fato e em que os organismos vivos surgiram numa atmosfera destituída de oxigênio, supõe-se que a respiração esteve implicada na transição evolutiva de organismos unicelulares para organismos multicelulares (Pfeiffer *et al.*, 2001).

A regulação metabólica mais estudada em microrganismos é a gerada pela glicose (DeRisi *et al.*, 1997). Glicose é a fonte preferencial de carbono e energia dos microrganismos eucarióticos (Vaulont *et al.*, 2000) sendo o mais importante efector do metabolismo, podendo agir em nível da expressão gênica (repressão por glicose), estabilidade do mRNA, tradução do mRNA e estabilidade de proteínas (Carlson, 1999).

Até o início de 2002 o GenBank (banco de seqüências do NCBI) contava com apenas 109 seqüências de genes de *T. reesei*. Mais recentemente as pesquisas a respeito deste fungo ganharam uma contribuição que ao mesmo tempo se constitui numa ferramenta para futuros trabalhos. Foi criado um banco de dados público de ESTs (“*Expressed Sequence Tags*”) de *T. reesei* (<http://trichoderma.iq.usp.br>) contendo cerca de 1200 seqüências únicas de genes deste fungo (Chambergo *et al.*, 2002). O número de ESTs no banco de dados foi aumentado para quase 2.000 seqüências únicas e análises de *microarrays* foram utilizadas para estudar o perfil transcricional de genes de *T. reesei* sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio (Bonaccorsi, 2003, Bonaccorsi *et al.*, 2006).

Entre os genes de *T. reesei* destacam-se alguns potenciais reguladores da expressão de vários outros genes responsivos às condições experimentais estudadas. Candidatos naturais a exercer tal papel são as proteínas classificadas como fatores e co-fatores de transcrição. Entre eles há alguns que codificam produtos que exercem tais funções e que foram afetados pela limitação de oxigênio. Um destes genes tem como produto um ortólogo de BTF3, uma proteína muito conservada em eucariotos, primeiramente identificada em células HeLa (Zheng *et al.*, 1987; Potashkin *et al.*, 1996). Diferentes funções são atribuídas a esta proteína, que faz parte de um complexo que se liga a polipeptídios nascentes (NAC – *nascent polypeptide-associated complex*) (George *et al.*, 1998; Brockstedt *et al.*, 1999; Hu & Ronne, 1994; Whitby & Dixon, 2001).

Dada a importância destes elementos com grande potencial para exercer ações reguladoras, estudos posteriores a respeito destas proteínas deverão consistir em identificar experimentalmente as funções que elas exercem no metabolismo de *T. reesei*. Finalmente, espera-se que este trabalho possa ajudar a identificar genes que apresentem ortólogos com funções correlatas em diferentes organismos. Neste aspecto, têm sido escolhidos transcritos afetados pela limitação de oxigênio, com funções já conhecidas até em humanos (BTF3 é um

exemplo). Contudo o grande número de ESTs de genes desconhecidos representa o potencial para novas descobertas. Com o desafio de desvendar as funções de genes com este potencial, o emprego de nocaute gênico e análises por “*microarrays*” são muitos utilizados.

Um aspecto muito interessante da tecnologia de “*microarrays*” está na possibilidade de se identificar, de uma só vez, vários genes que não apenas se mostram afetados pelas condições experimentais estudadas, mas que podem ser, eles mesmos, potenciais reguladores da expressão de vários outros genes responsivos a estas condições.

Este estudo é a continuidade dos trabalhos já desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa em glicose (Chamberg *et al.*, 2002), oxigênio (Bonaccorsi, *et al.*, 2006) e estresses ambientais (Ferreira, 2006). Conseqüentemente, decidimos produzir mutantes de *T. reesei* em que o gene *btf3* estivesse nocauteado e analisar a resposta transcricional deste mutante no estresse térmico através da técnica de “*microarrays*”.

1.1. Fator Transcricional 3 da RNA polimerase B (*btf3*)

O fungo filamentosso *T. reesei* tem a capacidade de poder utilizar diversas fontes de carbono: glicerol, glicose, galactose e celulose, entre outros, o que denota mudanças na expressão de genes e especificamente de fatores transcricionais que regulem a transcrição de diferentes redes metabólicas.

Entre esses genes de *T. reesei* destacam-se alguns potenciais reguladores da expressão responsivos às condições experimentais estudadas. Candidatos naturais a exercer tal papel são as proteínas classificadas como fatores e co-fatores de transcrição. Entre eles alguns que codificam produtos que exercem tais funções e que foram afetados pela limitação de oxigênio. Um destes genes tem como produto um ortólogo de BTF3, uma proteína muito conservada em eucariotos, primeiramente identificada em células HeLa (Zheng *et al.*, 1987; Potashkin *et al.*,

1996). Diferentes funções são atribuídas a esta proteína: participar de um complexo que se liga a polipeptídios nascentes (NAC – *nascent polypeptide-associated complex*), ligar-se ao DNA e também interagir com a RNA polimerase II (RNA polimerase B). BTF3 também já foi relacionada com o processo de morte celular programada (apoptose) e à repressão de vários genes (Brockstedt *et al.*, 1999; Hu & Ronne, 1994; Whitby & Dixon, 2001).

A iniciação da transcrição pela RNA polimerase II necessita de fatores transcricionais que interajam com a polimerase formando um complexo multiprotéico (BTF1, TAFs, BTF2, TFIIB, etc.) (Yotov *et al.*, 1998). Um outro fator cuja função ainda não foi claramente desvendada é BTF3 (“RNA polymerase B Transcription Factor 3”) (Zheng *et al.*, 1987). Este fator transcricional não se liga diretamente ao promotor, mas pode formar um complexo estável com a RNA pol II (Zheng *et al.*, 1990).

Os indícios da possível função de BTF3 foram obtidos de trabalhos realizados na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, foi demonstrado que para a ligação estável ao DNA do ativador Gal4p era necessária uma pequena proteína homóloga a BTF3 conhecida como Egd1p (“Enhanced Gal4 DNA binding”). Posteriormente, foi descrito que BTF3 é requerido para a transcrição a partir de vários promotores de classe II de forma independente à presença de uma caixa TATA, e se liga a RNA polimerase II *in vitro* (Hu & Ronne, 1994). BTF3 está ainda envolvido à repressão de vários genes (George *et al.*, 1998; Brockstedt *et al.*, 1999; Rospert *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 1990). Conseqüentemente, BTF3 foi proposto como um fator geral da transcrição para promotores classe II (George *et al.*, 1998; Brockstedt *et al.*, 1999; Hu & Ronne, 1994; Whitby & Dixon, 2001). Entretanto, estudos posteriores mostraram que BTF3 não é um componente essencial do complexo de pré-iniciação de classe II (Potashkin *et al.*, 1996).

Em humanos, duas isoformas de BTF3 são geradas por processamento alternativo do mesmo pré-mRNA. As isoformas expressas são denominadas “BTF3a” e “BTF3b”. As duas isoformas ligam-se a RNA polimerase II, mas só BTF3a é conhecida como ativa (Hu & Ronne, 1994). BTF3b, a isoforma transcricionalmente inativa, foi identificada fazendo interação com a subunidade beta da proteína kinase CK2 (Grein & Pyerin, 1999).

Ribossomos são maquinarias moleculares que sintetizam polipeptídicos, consistindo principalmente de RNA, sendo o próprio o sítio ativo de peptidil-transferase quase desprovido de proteína. As proteínas do núcleo ribossomal estão predominantemente envolvidas na estabilização da estrutura do RNA ribossomal (Cech, 2000). Também, algumas proteínas chaperonas estão especificamente associadas aos ribossomos (Rospert *et al.*, 2002).

A proteína BTF3 faz parte de um complexo protéico que se liga às cadeias de polipeptídios nascentes (NAC – “nascent polypeptide-associated complex”). NAC é um complexo dimérico que foi identificado em eucariotos superiores como um fator associado ao ribossomo em proximidade às cadeias nascentes de peptídeos (Wiedmann *et al.*, 1994). Como uma típica chaperona, NAC interage com as cadeias de peptídeos independentes da sua sequência de aminoácidos (Wiedmann *et al.*, 1994; Bukau *et al.*, 2000), sendo a subunidade β -NAC, originalmente nomeada BTF3 (Zheng *et al.*, 1987).

O complexo NAC muito abundante no citosol, é considerado um componente dinâmico do túnel de saída dos ribossomos, agindo como um escudo para os polipeptídeos nascentes (Rospert, *et al.*, 2002; Freire, 2005). Outras das possíveis funções estão relacionadas ao enovelamento, proteção e direcionamento correto das cadeias nascentes de peptídeos dos ribossomos para as membranas das mitocôndrias e do retículo endoplasmático (Beatrix *et al.*, 2000; George *et al.*, 1998; Rospert *et al.*, 2002; Gautschi *et al.*, 2001; Hartl &

Hartl, 2002; Funfschilling *et al.*, 1999), sendo a proteína ribossomal L23 a responsável pela interação entre os ribossomos e o complexo NAC (Wegrzyn *et al.*, 2006).

Figura 1: Modelo do complexo NAC, mostrando o papel de NAC na proteção e direcionamento das cadeias nascentes de peptídeos dos ribossomos para as membranas das mitocôndrias (George *et al.*, 1998).

Vários dos conhecidos RAFs, incluindo SRP, NAC e eEF1A, foram inicialmente associados às cadeias nascentes. eEF1A estimula a proteólise dependente de ubiquitina da histona H2A, actina e alpha-cristalina; além de estar associado a vários processos celulares (Hotokezaka *et al.*, 2002). A interação entre o fator de início da tradução eIF(iso)4E, e a subunidade beta-NAC, poderia confirmar o papel de NAC no controle da tradução. Aliás, demonstrou-se que beta-NAC é capaz de competir com a eIF(iso)4G na formação do complexo eIF(iso)4F. Estes resultados refletem o papel de beta-NAC na regulação do início da tradução e/ou na reciclagem dos componentes do complexo de iniciação da tradução eIF(iso)4F (Freire, 2005).

De forma geral as chaperonas moleculares interagem com polipeptídios nascentes, ou recém translocados, e com proteínas não enoveladas ajudando-as a atingirem suas conformações nativas tanto em condições fisiológicas quanto em condições de estresse. Especificamente sob condições de estresse que prejudiquem o enovelamento espontâneo, como o choque térmico, a ação de diferentes maquinarias de chaperonas é essencial para a manutenção da homeostase celular (Beissinger & Buchner, 1998).

Dada a importância desta proteína no exercício de ações reguladoras, decidimos obter mutantes de *T. reesei* em que o gene BTF3 (subunidade β -NAC) seja interrompido e analisar a resposta metabólica desses mutantes às variações nutricionais e de estresse térmico usando a técnica de “microarrays”.

1.2. Resposta ao choque térmico

A resposta celular do estresse é conservada evolutivamente em todos os organismos vivos, e esta resposta é principalmente atribuída à indução de proteínas de choque térmico (HSPs), e a outras moléculas que conferem proteção ao estresse. As respostas moleculares das células nestas condições representam a adaptação ambiental do organismo para a sua sobrevivência (Grover, 2002). Todos os organismos procarióticos e eucarióticos mostram uma profunda resposta ao incremento da temperatura e de outros estresses ambientais, respondendo com a ativação da transcrição de genes de choque térmico e chaperonas.

No nível molecular, a resposta de choque térmico (HS) é mediada pela reprogramação das atividades celulares caracterizadas pela síntese de HSPs, concomitantemente pela suspensão de processos que consumam grandes quantidades de energia (a síntese normal de proteínas, por exemplo). As HSPs são uma classe de proteínas altamente conservadas, desde seres primitivos (procariotas) até o homem, o que é um indício de seu grande valor evolutivo (Grover, 2002). As HSPs podem ser agrupadas em famílias: HSP27, HSP47, HSP60, HSP70,

HSP90 e HSP110, de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kDa - quilodaltons). Em cada família, há diferentes proteínas - por exemplo, HSP72 e HSP73 no grupo HSP70; os pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos. As famílias HSP60 e HSP70 são as mais ligadas ao processo geral de enovelamento de proteínas nas células (Jäättelä & Wissing, 1992; Meyer & da Silva, 1999).

Algumas das funções das HSPs incluem: a) modulação da resposta de receptores protéicos (HSP90); b) transporte intracelular e translocação de peptídeos, agindo como chaperonas (HSP60); c) formatação de proteínas nascentes (HSP60 e HSP70) e d) degradação protéica (ubiquitina). Assim, fica evidente o papel das HSPs na regulação do metabolismo, do crescimento e da diferenciação celular. Além disso, as HSPs podem rapidamente se adaptar a funções de reparo e degradação de proteínas danificadas (Lottermann, *et al.*, 2003).

Nos organismos eucarióticos, a resposta ao choque térmico leva à ativação transcricional de genes de HSPs pela oligomerização de fatores de choque térmico pré-existente (HSFs). A ativação dos promotores de choque térmico sob condições de estresse é desencadeada pela polimerização de HSFs que se ligam aos promotores dos genes de choque térmico. Pouco se conhece sobre os mecanismos da ativação da transcrição pelos HSFs, e como são reprimidos os demais genes, considerados não HSPs (Egyhazi, *et al.*, 1998).

O reconhecimento de seqüências promotoras é controlado por fatores que auxiliam ou interferem com a RNA polimerase. Em procariontes, a substituições de fatores sigma pode controlar o início da transcrição específica para certos genes, refletindo por exemplo na indução de proteínas de choque térmico. Um dos fatores mais conhecido é o fator sigma 32 (σ 32), codificado pelo gene *rpoH* (Cowing, *et al.*, 1985).

Mudanças no tipo de fator sigma acontecem nos casos aonde há uma reorganização global do padrão de transcrição, isso permite à RNA polimerase iniciar a transcrição em

promotores que não são normalmente reconhecidos pelos fatores sigma, por exemplo o fator sigma 70, que está envolvido no processo de esporulação e em processos de resposta a estresses ambientais como choque térmico.

Uma característica significativa dos promotores para cada enzima é que eles possuem o mesmo tamanho e a mesma localização relativa ao sítio de início de transcrição, apresentando seqüências consensuais nas posições -35 e -10, Estes promotores são reconhecidos pelo fatores σ 32 e σ 70, que competem pelos núcleos disponíveis da enzima, de modo que o conjunto de genes transcritos durante o choque térmico depende do equilíbrio entre elas. Na figura 2 é apresentado o processo de transcrição em procariontes induzido pelo choque térmico.

Figura 2: Mecanismo de resposta a choque térmico pela ativação do fator σ 32, codificado pelo gene *rpoH*. O aumento do fator σ 32 induz a transcrição de genes com resposta ao choque térmico “HSR”, em organismos procariontes (<http://homepages.strath.ac.uk/dfs97113/BB310/Lect16.html#Heat%20shock>).

Em eucariontes, todos os membros da família HSP70 ligam-se a ATP através de um domínio nucleotídico altamente conservado, ao qual se atribui diversas funções celulares sobre as condições de estresse e metabolismo de proteínas (Sheffield *et al.*, 1990). Os membros desta família ligam-se tanto a proteínas não-enoveladas quanto a pequenos

polipeptídeos *in vitro*. Nos compartimentos subcelulares, interagem com outras proteínas submetendo-se à síntese nos ribossomos ou transmigração para outras organelas. Assim, funcionam nos estágios iniciais da maturação protéica, ligando-se a elas e estabilizando-as, enquanto não enoveladas. Uma vez que a síntese ou a transmigração organelar esteja concluída, a HSP70 é liberada, em processo dependente de ATP, permitindo que a nova proteína comece a dobrar-se ou a sofrer montagem.

Segundo Wynn *et al.* (1994), o dogma atual seria: a HSP70 do citosol liga-se à cadeia polipeptídica nascente, enquanto esta ainda está associada ao ribossomo. As proteínas precursoras, que irão dirigir-se às mitocôndrias e ao retículo endoplasmático, ligam-se temporariamente à HSP70 carreadora no citosol, até que sejam liberadas para outras HSP70 nas organelas. A cadeia polipeptídica transferida entre as proteínas chaperonas durante a importação organelar tem conformação estendida, com pouca estruturação secundária ou terciária. A troca de polipeptídeos, mediada por chaperonas, entre HSPs citoplasmáticas e organelares pode também conferir a força necessária à transmigração do polipeptídeo para o interior da organela. Após esta interação com HSP70, as proteínas recentemente importadas são transferidas para HSP60 organelar, enovelando-se em reação dependente de ATP.

A indução da transcrição de genes de resposta ao choque térmico é mediada através da alteração da maquinaria de fosforilação da RNA pol II. A proteína quinase específica de choque térmico promove a fosforilação do domínio carboxi-terminal (CTD) da subunidade da RNA polimerase II (RNA pol II).

O papel da RNA pol II, fatores e cofactores na ativação da transcrição de genes HS ainda não foi muito esclarecida. Parker & Topol (1984) determinaram que o fator B da RNA pol II regula a expressão de um membro da família da HSP70. Este fator B foi inicialmente descrito como um fator de transcrição da RNA pol II que se liga às caixas TATA e é requerido para a ativação de um membro da família HSP70.

Certas proteínas de choque térmico podem ter funções regulatórias. Um exemplo é a regulação pelas HSP70s do citosol, que tem sido relacionada à repressão do fator de choque térmico (“Heat Shock Factor”, HSF), mediando a transcrição de outros genes, por eles mesmos, ou pelo complexo multichaperona HSP90, em adição a este também (Shi *et al.*, 1998; Zou *et al.*, 1998).

Nos últimos anos, houve uma extensa ampliação do conhecimento a respeito de como as células, desde as mais primitivas até as mais evoluídas, são capazes de elaborar respostas complexas de defesa quando desafiadas por diversos tipos de estresse. Embora ainda exista muito a ser descoberto, elucidado e conhecido em detalhes, há diversos pontos esclarecidos. Estes progressos admiráveis têm feito com que a compreensão de doenças, síndromes e fenômenos de natureza obscura sejam cada vez maiores. Diversas linhas de pesquisa poderão conduzir no futuro a benefícios através de suas aplicações biotecnológicas em microorganismos, plantas, animais, e nos seres humanos, principalmente na área biomédica (Grover, 2002).

1.3. *Trichoderma reesei* como sistema modelo

As espécies do gênero *Trichoderma* são microrganismos presentes no solo, em materiais vegetais e substratos em decomposição, e em geral são organismos dominantes na microflora de solos de uma grande variedade de “*habitats*”, atribuindo-se tal fato à sua diversa capacidade metabólica e à sua natureza competitiva, uma vez que possuem a habilidade de atacar outros fungos (Samuels, 1996).

Esse gênero apresenta necessidades nutricionais mínimas e caracteriza-se por um rápido crescimento e pela capacidade de produzir uma enorme gama de metabólitos secundários. Por terem se desenvolvido em um ambiente nutricionalmente pobre (Wainwright, 1993) adquiriram evolutivamente várias enzimas hidrolíticas que lhes conferem capacidade de obter glicose e outras fontes de energia a partir de polímeros freqüentemente encontrados no solo. Desta forma, estes microrganismos conseguem transformar uma variedade muito grande de materiais orgânicos tanto de origem natural quanto xenobiótica e são bem conhecidos pela hiper-produção de quitinases, celulases e hemicelulases, respectivamente envolvidas na lise de micélios de outros fungos (Haran *et al.*, 1996) e na hidrólise de celulose e outros polissacarídeos (Béguin & Aubert, 1994; Biely & Tenkanen, 1998).

Estes microrganismos vêm sendo utilizados por vários laboratórios no mundo para o estudo dos diversos processos biológicos básicos, devido à sua grande importância biotecnológica e pela capacidade de produzir e secretar diversas enzimas (Béguin, 1990). Celulases ou enzimas celulolíticas são denominações genéricas para designar mais de uma categoria de enzimas que atuam de forma sinérgica nas etapas de hidrólise de celulose (Nidetzky *et al.*, 1993 e 1994). O sistema celulolítico que conferiu notoriedade ao gênero *Trichoderma* é composto por duas diferentes categorias: Exoglucanases, ou celobiohidrolases

(CBH) (1,4- β -D-glucan celobiohidrolases, EC 3.2.1.91) retiram unidades de celobiose (dímero de glicose formado por ligação β -1,4) a partir das extremidades das cadeias do polissacarídeo. E, as endoglucanases (EG) (1,4- β -D-glucan-4-glucanohidrolase, EC 3.2.1.4) que produzem quebras mais randômicas no interior de cadeias longas, gerando novas extremidades onde as CBHs podem atuar.

A aplicação destes fungos tem sido explorada em diferentes ramos da indústria: na área têxtil e de papel e celulose, enzimas celulolíticas são utilizadas para o tratamento e modificação de tecidos e fibras; na agroindústria e indústria alimentícia, *Trichoderma* e suas enzimas são empregados no melhoramento da composição nutricional de rações animais, aumento do rendimento da produção de óleos vegetais, em certos estágios de produção de bebidas alcoólicas e sucos de frutas. Por suas características micoparasíticas, são utilizados também como agentes de controle biológico e indutores do crescimento vegetal (Samuels, 1996; Harman & Kubicek, 1998; Walsh *et al.*, 1993; Chang *et al.*, 1986; Altomare *et al.*, 1999). Através das técnicas de Biologia Molecular, várias espécies têm sido convertidas em eficientes produtoras industriais de enzimas e, mais recentemente, genes de *Trichoderma* vêm sendo pesquisados para a ainda controversa geração de plantas transgênicas mais resistentes a fungos fitopatogênicos (Lorito *et al.*, 1998; Bolar *et al.*, 2000).

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

Segundo a classificação taxonômica no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” dos “National Institutes of Health” dos E.U.A. (NCBI, NIH, USA) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy>), *T. reesei* tem a seguinte classificação:

➤ Taxonomy ID:	51453
➤ Super-reino:	Eukaryota
➤ Reino:	Fungi
➤ Filo:	Ascomycota
➤ Ordem:	Hypocreales
➤ Família:	Hypocreaceae
➤ Gênero:	<i>Hypocrea</i>
➤ Espécie:	<i>Hypocrea jecorina</i> - teleomorfo
	<i>Trichoderma reesei</i> - anamorfo

Morfologicamente, *T. reesei* apresenta hifas septadas, ramificadas (5-10 µm de diâmetro), polinucleadas, de núcleo haplóide, que formam colônias brancas de rápido crescimento, formando almofadas verdes ou amarelas de filamentos de esporulação. Os filamentos férteis, conidióforos, produzem fileiras laterais de pequenas fiálides. Os mitoesporos (conídios, geralmente de cor verde e de 3 a 5 µm de diâmetro) são produzidos sucessivamente no extremo da fiálide e agrupados em pequenas massas (Gams & Bissett, 1998).

Seu ciclo de vida é assexuado, com geração de esporos de coloração verde pálida. A germinação destes esporos dá origem a filamentos ramificados denominados hifas, (Samuels, 1996; Gams & Bissett, 1998). A forma de vida assexuada de um fungo é também chamada de anamórfica, enquanto a sexuada (meiose) é denominada teleomórfica (Kuhls *et al.*, 1996).

A primeira descrição taxonômica de *Trichoderma* data de 1794 e naquela época foram descritas quatro espécies, sem a percepção de que apenas os anamorfos estavam sendo descritos. Classificações taxonômicas são em grande parte fundamentadas em características morfológicas e, em geral, anamorfos e teleomorfos de uma mesma espécie apresentam características morfológicas diferentes. Assim, as duas formas de uma mesma espécie acabam recebendo nomes diferentes. Caso típico é o que ocorre com *T. reesei*, considerado como a forma anamórfica do fungo *Hypocrea jecorina* (teleomorfo), ambos representando a mesma espécie (Klein & Eveleigh, 1998; Kuhls *et al.*, 1996). Além disso, segundo os estudos deste último autor, as espécies *T. reesei* e *Hypocrea jecorina*, apresentam seqüências idênticas de nucleotídeos na região do espaçador interno de transcrição do DNA ribossomal e similar padrão de fragmentos de DNA obtidos por PCR, o que é característico de culturas da mesma espécie, estabelecendo que *T. reesei* e *H. jecorina* provavelmente representam a mesma espécie.

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

Até o início do ano de 2.002 o banco de dados público GenBank (NCBI) contava com apenas 109 seqüências de genes de *T. reesei*. Recentemente as pesquisas a respeito deste fungo ganharam uma contribuição que ao mesmo tempo se constitui numa ferramenta para futuros trabalhos. Foi criado um banco de dados público de ESTs (“Expressed Sequence Tags”) de *T. reesei* (<http://trichoderma.iq.usp.br>) contendo cerca de 2.000 seqüências únicas de genes deste fungo (Chambergo *et al.*, 2002, Bonaccorsi *et al.*, 2006).

Empregando essas seqüências e com o uso de “microarrays” de DNA, foi analisado o perfil da expressão gênica de *T. reesei* durante o consumo de glicose e elucidado o programa temporal

de expressão de genes envolvidos nas vias de seu metabolismo primário, nesta condição (Chambergo *et al.*, 2002). Também já foram analisadas as respostas transcricionais de *T. reesei* a diferentes condições de estresses. Bonaccorsi *et al.* (2006) estudaram em larga escala o efeito de baixas tensões e ausência de oxigênio (hipóxia e anóxia, respectivamente) sobre a expressão gênica de *T. reesei*, demonstrando no nível transcricional a prevalência do metabolismo aeróbico para a sobrevivência do fungo. Ferreira (2006) estudou a resposta transcricional em larga escala de *T. reesei* aos estresses ambientais de choque térmico a 40°C, cultivo em presença de íons do metal pesado cádmio, e às limitações de fonte de carbono e de nitrogênio, buscando identificar genes que pudessem ser considerados como membros de uma resposta geral a estresses. Para a realização do trabalho aqui apresentado, também foram utilizadas tais ferramentas.

II. OBJETIVOS

Avanços significativos sobre a biologia do gênero *Trichoderma*, principalmente no nível de biologia de sistemas, dependem de informações sobre sua análise genômica e de conhecimento sobre as vias de regulação da expressão gênica.

A partir da base de dados ESTs obtidas em nosso laboratório, o grande número de genes com funções desconhecidas representa um grande potencial para novas descobertas nesse sentido. Com o desafio de desvendar as funções de um gene com esse potencial, foi escolhido o gene *btf3*, dada a importância desta proteína no exercício de ações reguladoras.

Conseqüentemente decidimos traçar como objetivos principais deste trabalho a obtenção de um mutante nocaute do gene *Trbtf3* e estudar o efeito da interrupção da expressão deste gene sobre a expressão gênica dos 2.000 genes presentes em nosso banco de clones, por meio da técnica de “microarray”, comparando-o com a cepa selvagem QM9414 em condições normais e de estresse por choque térmico.

Os objetivos específicos são:

- Confirmar que o clone T. reesei TrESTA0186 corresponde à anotação como um ortólogo de BTF3.
- Construir um cassete de interrupção contendo o locus genômico de gene *Trbtf3* interrompido.
- Obtenção de mutantes nocautes do gene *Trbtf3*.
- Estudar o efeito do nocaute no normal desenvolvimento do fungo.
- Estudar o efeito do nocaute na condição de estresse por choque térmico.

III. MATERIAS E METODOS

3.1 – Microrganismos

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

Células de *Escherichia coli*, cepa DH10B (GIBCO BRL) e TOP10 (Invitrogen), foram utilizadas rotineiramente na propagação de plasmídeos

3.2 - Soluções e meios de cultura

Meio mínimo (composição por litro): KH₂PO₄, 15 g; (NH₄)₂SO₄, 5 g; MgSO₄.7.H₂O, 0,6 g; solução de metais, 1 mL; CaCl₂, 0,6 g (adicionado ao meio já autoclavado e resfriado à temperatura ambiente, a partir de uma solução estoque); pH 6,0.

Meio completo (composição por litro): KH₂PO₄, 0,1 mol; K₂HPO₄, 0,1 mol; (NH₄)₂SO₄, 2,1 g; MgSO₄.7.H₂O, 0,3 g; Tween 80, 2 mL; Proteose peptona 2 g; uréia, 0,3 g; solução de metais, 1 mL; CaCl₂, 0,3 g (adicionado ao meio já autoclavado e resfriado à temperatura ambiente, a partir de uma solução estoque); pH 6,0.

Solução de metais (em porcentagem): FeSO₄.7.H₂O, 0,5; MnSO₄.H₂O, 0,16; ZnSO₄, 0,14 e CoCl₂, 0,2, dissolvidos em HCl 28 mM.

Tampão de ressuspensão: sacarose, 350 mM; EDTA pH 8,0, 50,0 mM; Tris-HCl pH 7,4, 10,0 mM; proteinase K, 20 µg/mL adicionados no momento do uso.

Tampão de lise: NaCl, 150 mM; EDTA pH 8,0, 50,0 mM; Tris-HCl pH 7,4, 10,0 mM; proteinase K, 20 µg/mL adicionados no momento do uso.

TE: Tris-HCl pH 7,5, 10 mM; EDTA pH 8,0, 1 mM. STET-MW: 5 mL de Tween 20; 2 mL de NaCl 5M; 1,6 mL de Tris-HCl 1M pH 8,0; 200 µL de EDTA 0,5 M pH 8,0; água deionizada suficiente para 100 mL. Filtrar em membrana de 0,22 µm e, imediatamente antes de usar, adicionar: 24 µL de RNase a 10 mg/mL e 0,5 mg de lisozima.

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

3.3 – Condições de cultivo de *T. reesei*

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

Cultivos em meio líquido foram realizados em frascos “erlenmeyer”, em meio mínimo ou em meio completo, supra-descritos. Conforme o propósito do cultivo, a fonte de carbono acrescentada ao meio foi glicerol, glicose ou celulose, em concentrações diversas. A temperatura das culturas foi mantida em 28 °C e a agitação em 200 r.p.m.

3.4 - Determinação da atividade celulolítica total.

A atividade celulolítica foi medida com ácido dinitrossalicílico (DNS), segundo descrito por Wood & Bhat (1988). Para tanto, alíquotas do cultivo de *T. reesei* com Avicel foram filtradas, e o filtrado utilizado para medida da atividade celulolítica total, usando-se papel de filtro como substrato, conforme descrito a seguir:

Um mililitro de tampão citrato 0,05 mol/L, pH 4,8 foi adicionado a tubo de ensaio de aproximadamente 25 mL, contendo no fundo uma fita de papel Whatman nº 1 (1 x 6cm). Incubou-se a 50°C por 3 minutos antes da adição de 0,5 mL da solução enzimática adequadamente diluída no mesmo tampão citrato. Deixou-se sob incubação por 60 minutos e ao final deste período adicionou-se 3,0 mL de reagente DNS (NaOH 1,0%, ácido dinitrosalicílico 1,0%, fenol 0,2%, tartarato de sódio e potássio 20,0%). Homogeneizou-se a solução que foi então levada a banho fervente por 5 minutos. Adicionou-se à solução resfriada água suficiente para completarem-se 10 mL. Após repouso de 20 minutos, foi realizada medição colorimétrica a uma comprimento de onda de 540 nm. Utilizou-se uma curva padrão de glicose como referência para a determinação da concentração de açúcares redutores livres nas amostras.

A atividade celulolítica foi expressa em microgramas (μg) equivalentes de glicose produzida por minuto por um mililitro do filtrado, nas condições descritas.

3.5 - Manipulação de DNA e técnicas gerais de Biologia Molecular

Os procedimentos de manipulação de ácidos nucleicos, como transferência e hibridização ("Southern" e "Northern"); marcação com material radioativo; eletroforese de DNA e RNA; e outras técnicas empregadas em biologia molecular, foram feitas segundo descrito por Sambrook & Maniatis (1989).

Amostras de massa micelial das culturas foram coletadas para a preparação de RNA por filtração a vácuo em papel de filtro Whatman nº 3, rapidamente embrulhadas em papel alumínio devidamente nomeado e congeladas sob nitrogênio líquido. A preparação de RNA foi realizada através da maceração do micélio do fungo, sob nitrogênio líquido, e extração utilizando o reagente Trizol® (InvitrogenTM Life Technologies) seguindo as instruções do

fabricante. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro em comprimento de onda de 320 nm.

3.6 - Seqüenciamento e análise computacional

DNA plasmidial para seqüenciamento foi preparado empregando-se o “ConcertTM Rapid Plasmid Miniprep System kit” (GibcoBRL. UK). As reações de seqüenciamento pelo método de terminação de cadeia por dideoxi terminal (Sanger *et al.*, 1997) foram realizadas empregando-se o kit de ddNTPs, covalentemente ligados a agentes fluorescentes específicos para cada ddNTP, “ABI Prism[®] BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit with AmpliTaq[®] DNA polymerase FS”, seguindo o procedimento do fabricante.

O seqüenciamento foi realizado em seqüenciador automático AB Prism 377, empregando-se os módulos de programação para eletroforeses desenvolvidas em gel de 36,0 cm, com química de seqüenciamento BigDyeTM, tanto a 1200 V para 7 horas de aquisição de dados (SeqRun 36E-1200) quanto a 2400 V para 3,5 horas de aquisição de dados (SeqRun 36E-2400). Os dados do seqüenciamento automático foram coletados no programa “ABI Prism Data Collection” (Applied Biosystem Inc, USA) em um microcomputador PowerMacintosh 7300/200 (Apple Microcomputer Inc, USA). A análise dos géis de seqüenciamento foi realizada por meio do programa “Sequencing Analysis v 3.3” (Applied Biosystem Inc, USA), que forneceu para cada amostra seqüenciada um eletroforetograma. Os eletroforetogramas obtidos foram analisados através dos programas de bioinformática phred/phrap/crossmatch e consed (Ewing *et al.*, 1998; Gordon *et al.*, 1998), que determinam a qualidade do seqüenciamento e identificam e mascaram seqüências de vetores. A qualidade do seqüenciamento é dada para cada base através da análise do perfil eletroforético pelo programa phred. Perfis eletroforético com um mínimo de 150 bases com qualidade phred (Q) ≥ 20 , foram aceitos; perfis eletroforéticos de baixa qualidade e correspondentes a seqüências

de vetor não foram aceitos, sendo retirados da base de dados. As seqüências obtidas foram comparadas com a base de dados não redundante (nr) do GenBank (NCBI, USA) empregando o algoritmo BLASTX.

3.7 - Construção do cassete de integração para recombinação homóloga do gene *btf3*

O fragmento de DNA genômico contendo toda a seqüência codificadora do gene *Trbtf3* foi isolada na triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*, construída no fago Lambda DashTM II (Matheucci, 1993). A preparação em larga escala do DNA do clone do fago λ BTF3 foi realizada seguindo protocolo descrito por Santelli & Navarro-Catapan (2000).

O fragmento *λbtf3/BamHI* ($\approx 3,0$ kb) contendo o locus genômico do gene *Trbtf3*, nomeado pE2, foi subclonado no vetor plasmidial BlueScript KS(-) (Stratagene). A seleção de subclones foi realizada pela transformação de bactérias DH10B, ou Top10, com as ligações por eletroporação e plaqueamento em LB ágar, contendo ampicilina, IPTG e X-gal (Sambrook & Maniatis, 1989).

O cassete para recombinação homóloga *btf3/hph* foi construído a partir do vetor pCSN43, que contém o promotor do gene triptofano C (*P_{trpC}*) de *Aspergillus nidulans* controlando a expressão do gene *hph* de *E. coli* e o terminador de transcrição do mesmo gene de *A. nidulans* (*T_{trpC}*) após a região codificadora. A clivagem de pCSN43 com as enzimas de restrição *SalI* e *XbaI* liberou um fragmento de 2,2 kb contendo o promotor *P_{trpC}*, a região codificadora de *hph* e o terminador *T_{trpC}*. Este fragmento foi inserido no sítio *HindIII* presente na região codificado do gene *Trbtf3* no plasmídeo pE2, originando o plasmídeo nomeado pE2*hph*. Finalmente, o inserto deste plasmídeo foi utilizado como um cassete de integração para o nocaute de *Trbtf3* em esporos de *T. reesei*.

3.8 - Transformação de esporos de *T. reesei*

A transformação de esporos do fungo *T. reesei* foi realizado pela técnica de “biobalística” ou bombardeamento de partículas (Herrera-Estrella *et al.*, 1990). Esta técnica consiste no bombardeamento de células alvo com micropartículas de ouro, ou tungstênio, recobertas com o DNA exógeno. No interior das células, o DNA se dissocia das micropartículas e integra-se ao DNA genômico.

Na transformação de *T. reesei* foram utilizadas micropartículas de tungstênio M5, com diâmetro médio de 0,2 μm . Esporos de 7 - 10 dias de cultivo foram ressuspensos em 0,9% NaCl e espalhados em placas ($\approx 10^7$ esporos por placa) de meio sólido rico PDA (“Potato Dextrose Agar”), e incubadas a temperatura ambiente por 4 horas. Posteriormente, as placas foram bombardeadas com as micropartículas sob pressões de 1400 e 1600 psi de gás hélio. Após o bombardeamento, as placas foram incubadas a 28 °C por 7 h. Adicionou-se uma camada de PDA, suplementada com o antibiótico higromicina B (Hyg) para uma concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$, para iniciar a seleção de transformantes.

Os primeiros transformantes surgiram entre 2 e 3 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 estáveis foram transferidos para uma placa contendo apenas PDA e incubados por 7 dias para que ocorresse a esporulação.

Os transformantes obtidos da seleção em PDA/Hyg, foram analisados e confirmados por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR), e hibridizações de “Southern blots” com sondas marcadas seguiram os protocolos gerais (Sambrook & Maniatis, 1989).

3.9 – Efeito choque térmico sobre o crescimento de *T. reesei*.

3.9.1 - Crescimento radial em alta temperatura.

A comparação do crescimento dos transformantes viáveis do mutante nocaute $\Delta Trbtf3$ com a cepa selvagem foram realizadas em meio sólido. Esporos de 7 dias foram semeados a uma concentração de 1×10^5 em meio PDA (“Potato Destroxe Agar”), ou em meio mínimo, e incubados a 28°C, ou a 40°C, por 48 horas. Após esse período as placas foram recolhidas e medições do crescimento radial foram realizadas. Para cada condição de estudo foram realizadas triplicatas e as médias dessas foram utilizadas para como resultados.

3.9.2 – Cultivo em alta temperatura 40oC.

Para estudar o crescimento do mutante na temperatura de 40°C foram realizados inicialmente cultivos paralelos do mutante nocaute $\Delta Trbtf3$ e a cepa selvagem QM9414 de *T. reesei*. Os esporos das duas cepas foram inoculados a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ esporos / mL em 400 mL de meio completo contendo glicose a 2,0% como fonte de carbono em frasco “erlenmeyer” de 2,0 L. Desenvolveu-se a cultura por 16,0 horas a 28°C sob agitação de 200 r.p.m. em agitador orbital. Posteriormente realizou-se substituição do meio por um fresco com ressuspensão do micélio em 400 mL de meio. Cada cultura inicial, tanto a cepa mutante como a cepa selvagem foi dividida equitativamente em duas novas culturas em meio completo com glicose a 2%. As quatro culturas foram incubadas durante 2 horas a 28°C sob agitação de 200 r.p.m. em agitador orbital para adequação ao novo meio e incremento da massa micelial. Após esse período, dois frascos foram mantidos a 28°C, enquanto os outros dois foram transferidos para um segundo agitador orbital pré-aquecido e, a partir de então, incubados a 40°C sob a mesma velocidade de agitação. Para determinação de massa seca, as alíquotas das

quatro culturas, foram retiradas após 2 horas da mudança de meio, e 1, 2, 3, 4 e 5 horas após o início do choque térmico.

3.9.3 – Experimento de choque térmico.

Para os experimentos de descrição da resposta transcricional do mutante nocaute *ΔTrbtf3* comparado à cepa selvagem de *T. reesei* sob choque térmico, foram realizadas as culturas em banhos termostatizados com prateleira de agitação orbital (New Brunswick, Inc.). Também para assegurar uma mudança da temperatura rápida e homogênea em toda a cultura, o volume da mesma foi restrito ao máximo de 200 mL em frascos “erlenmeyer” de 1,0 L.

Assim, após o período de pré-cultura, como supra-descrito, ocorreu a substituição do meio por meio fresco completo com glicose a 2,0% e a divisão equitativa da massa micelial em duas culturas de 200 mL totais (incluindo o volume do micélio) dispensadas em frascos “erlenmeyer” de 1,0 L. Essas culturas passaram então a ser incubadas em banho termostatizado a 28,0°C sob agitação de 200 r.p.m.. Ao final de 2,0 horas nessa condição, uma das culturas foi repassada para um banho termostatizado similar ao anterior pré-aquecido a 40,0°C e permaneceu incubada a essa temperatura e sob mesma velocidade de agitação por 1,0 hora. Ao final desse período de choque térmico, a cultura do banho a 40,0°C retornou para o banho a 28,0°C e as duas culturas permaneceram sob incubação a essa temperatura e mesma velocidade de agitação por 1,0 hora adicional.

Alíquotas das culturas para determinações de massa seca foram obtidas 1,0 e 2,0 horas após o início da incubação em banho a 28,0°C, 1,0 hora após o choque térmico a 40,0°C e após 1,0 hora adicional a 28,0°C. Amostras de micélio para a extração de RNA de ambas as culturas foram retiradas imediatamente antes do início do choque térmico, 15, 30 e 60 minutos após o início do choque térmico, e ao fim da hora adicional a 28,0°C. O experimento

inteiro foi repetido nas mesmas condições, partindo de uma nova pré-cultura proveniente do mesmo estoque de esporos.

3.10 – Produção e análise dos microarrays do mutante de *ΔTrbt3*

As etapas de impressão das lâminas, hibridizações com cDNAs marcados com fluoróforos e leituras de intensidade das fluorescências das sondas hibridizadas nas lâminas de “microarray” foram desenvolvidas no laboratório CAGE (*Center for Analyses of Gene Expression* – IQ-USP).

3.10.1 – Material para impressão e hibridização das lâminas

Como detalhadamente descrito e realizado anteriormente (Ferreira, 2006), os cDNAs utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram amplificados por meio de PCR, purificados e quantificados previamente à sua impressão nas lâminas de “microarrays”. As reações de PCR foram realizadas, em placas de 96 poços, a partir de estoques de clones bacterianos (mantidos a -70°C) selecionados das bibliotecas de cDNA de *T. reesei* (Chamberg *et al.*, 2002; Bonaccorsi, 2003) e do genoma de *T. reesei* com oligonucleotídeos específicos (Bonaccorsi, 2006), num total de 1920 amplificações. Foram empregadas as seguintes condições de reação: Estoque bacteriano $\cong 1\ \mu\text{L}$ (com replicador de 96 pinos); dNTPs 0,125 mmol/L (cada); Primer M13 (forward e reverso) 0,166 $\mu\text{mol/L}$ (cada); MgCl_2 1,5 mmol/L; Tampão de reação 1X; Biolase Taq polimerase (5U/ μL) 0,5 U; água para volume final de 100 μL . Passos de reação em termociclador: 95°C por 4 min.; 40 ciclos de 95°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 min.; seguidos por 72°C por 5 min. Os produtos de amplificação foram purificados em placas “MultiScreen-FB filter plates”, modelo MAFB-NOB50 (Millipore), segundo protocolo desenvolvido no laboratório CAGE (Ferreira, 2006).

Os DNAs foram impressos em lâminas espelhadas 7Star (GE Healthcare) em sistema de impressão “Microarray Spotter Generation III” da Molecular Dynamics (GE Healthcare), presente no laboratório CAGE, de acordo com os protocolos específicos de funcionamento do aparelho.

3.10.2 – Hibridização das lâminas de microarrays

As sínteses de cDNAs a partir do RNA de amostras de *T. reesei* coletadas no experimento de choque térmico foram realizados com o kit “SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System” (Invitrogen™ Life Technologies), sendo as marcações dos cDNAs sintetizados realizadas com o fluoróforo Alexa Fluor® (Invitrogen™ Life Technologies). Assim a condição de estado estacionário fisiológico a 28°C foi tomada como referência para todas os tempos sendo marcado com o fluoróforo Alexa Fluor® 647 (correspondente ao fluoróforo Cy5-deoxiuridina trifosfato). Os cDNAs correspondentes ao choque térmico foram marcados com fluoróforo Alexa Fluor® 555 (correspondente ao fluoróforo Cy3-deoxiuridina trifosfato). Foram hibridizadas cinco lâminas de “microarray” para o mutante $\Delta Trbtf3-3$ e outras cinco para a cepa selvagem, com as amostras obtidas de 2 horas a 28 °C, 15min a 40 °C, 30 min a 40 °C, 60 min a 40 °C e 1 hora a 28 °C. Cada lâmina foi hibridizada com mistura de iguais proporções de cDNA-referência (vermelho) e cDNA da correspondente condição-teste (verde), como apresentado na tabela 1.

Os cDNAs marcados foram secos em “SpeedVac” (SC110, SAVANT) e então ressuspensos em 54 µL de solução de hibridização de seguinte composição: 50% formamida desionizada (27,0 µL), 25% tampão de hibridização (13,5 µL) e 25% água desionizada estéril (13,5 µL).

As lâminas foram colocadas em câmaras úmidas e incubadas a 42 °C por 16 horas. Após o período de hibridização as lâminas foram submetidas à lavagem manual com intervalos de agitação de 10 minutos em agitador orbital entre uma solução de lavagem e outra, utilizando sequencialmente as seguintes soluções: 1x SSC, 0,2% SDS; 0,1x SSC, 0,2% SDS; 0,1x SSC, 0,2% SDS a 55°C e, por fim, 0,1x SSC à temperatura ambiente com agitação por 1 minuto. Finalmente as lâminas foram mergulhadas rapidamente quatro vezes em água desionizada e secas com jato de nitrogênio ultrapuro.

A leitura das fluorescências das sondas hibridizadas foi realizada em “scanner” “Generation III DNA Scanner” (GE Healthcare) dedicado à leitura de lâminas de “microarray” segundo o protocolo padrão para a obtenção de imagens das lâminas. O programa de análise e aquisição de imagens do “scanner” transforma as fluorescências dos fluoróforos Alexa Flúor® 555 e Alexa Flúor® 647 nas cores verde e vermelha, respectivamente. Para cada lâmina foram realizadas duas leituras, com ganhos de sinal da CCD diferentes: 700 e 750V. Os arquivos referentes às imagens das lâminas foram então submetidos à extração dos dados de fluorescência para cada sonda do “microarray”.

Tabela 1: Hibridizações das lâminas de “microarray”. Condição de referência (2 horas, 28°C) marcada com fluoróforo Alexa Flúor® 555 (vermelho) e condição-teste (2 horas, 28 °C; 15min, 30 min e 60 min, 40 °C; 1 hora, 28 °C) com fluoróforo Alexa Flúor® 647 (verde), tanto para o mutante $\Delta Trbtf3$ -3 como para a cepa selvagem QM9414 de *T. reesei*.

		Lâmina 1	Lâmina 2	Lâmina 3	Lâmina 4	Lâmina 5
QM9414 Selvagem	Condição-Teste	2 horas 28°C	15 min 40°C	30 min 40°C	60 min 40°C	1 hora 28 °C
	Referência	2 horas 28°C	2 horas 28°C	2 horas 28°C	2 horas 28°C	2 horas 28°C
Mutante $\Delta Trbtf3$	Condição-Teste	2 horas 28°C	15 min 40°C	30 min 40°C	60 min 40°C	1 hora 28 °C
	Referência	2 horas 28°C	2 horas 28°C	2 horas 28°C	2 horas 28°C	2 horas 28°C

3.10.3 – Normalização e análise dos dados extraídos

A análise inicial dos dados é baseada nos valores de intensidades de fluorescência do fluoróforo Alexa Fluor® 647 (vermelho) e do fluoróforo Alexa Fluor® 555 (verde) para cada sonda, que serão respectivamente designadas por R (*red*) e G (*green*). Primeiramente foi calculada a razão das intensidades R/G para cada sonda, em cada lâmina de microarray. Em seguida, foram calculadas as médias e o coeficiente de variação (desvio padrão relativo à média, $CV = \text{desvio padrão} / \text{média}$) para cada gene, em cada lâmina.

Os pontos cuja razão apresentaram CV maiores que 100% foram recalculados tirando a multiplicata mais distante da média. Este procedimento foi repetido nos casos em que os novos CVs ainda eram maiores que 100%. Se depois da segunda multiplicata retirada ainda persistiu o problema os dados do gene para a lâmina em questão foram descartados.

Seguindo a metodologia descrita por Tseng *et al.* (2001), os dados de CV da razão R/G e a média das intensidades $(R+G)/2$ foram utilizados para descartar os pontos menos confiáveis estatisticamente. Utilizando subgrupos de 50 genes com médias de intensidade mais próximas ao um determinado gene, a média de intensidade de fluorescência para esse gene foi marcada como estatisticamente não-confiável se o valor do CV correspondente pertencesse aos 5 valores de CV (10%) mais altos dentro do subgrupo de genes. Se pertencesse aos 45 valores de CV inferiores, a média de fluorescência para esse gene foi considerada estatisticamente confiável para as análises posteriores. O procedimento pode ser visto através do gráfico da Figura 3.

Figura 3: CV versus intensidade de média de fluorescência. Os pontos mais escuros indicam o limite de CV para cada intensidade de média de fluorescência, acima dos quais os dados de média de fluorescência dos genes foram marcados como estatisticamente não-confiáveis.

Foi então feita a normalização em cada placa utilizando a metodologia descrita por Dudoit *et al.* (2000), calculando o logaritmo na base dois das médias das razões, M ($M = \log_2[R/G]$), e das intensidades, A ($A = [\log_2 R + \log_2 G] / 2$). Procedeu-se então à normalização dos dados pelo método conhecido como LOWESS (*LOcally WEighted Smoothing System*) ou regressão robusta com pesos locais, realizada através do programa S-PLUS 2000 (Professional MathSoft, Inc., Venables & Ripley, 1998), utilizando 25% como fração local (f). A idéia é obter, como valores das razões normalizadas, os resíduos entre os valores calculados pelo LOWESS e os valores experimentais (Figura 4).

Figura 4: M(mr) versus A(mpd). A linha contínua indica a função LOWESS. Os pontos destacados por círculos vermelhos representam os genes diferencialmente expressos (induzidos/reprimidos), conforme as intensidades das médias de fluorescências, utilizando 25% como fração local ($f=0,25$).

O agrupamento de genes, segundo o perfil transcricional apresentado durante experimento de limitação de oxigênio foi realizado pelo método conhecido como SOM (*Self Organizing Maps*) por meio do programa GeneCluster v2.1.7 (*Cancer Genomics Group, Whithead/MIT Center for Genome Research*) e por um programa específico, desenvolvido pelo Prof. Dr. João Pedro Simon Farah (Instituto de Química – USP-SP) utilizando a plataforma Metal 1.7.1, que permite uma forma alternativa e mais amigável de visualização dos grupos formados pelo GeneCluster.

3.11 – Validação dos resultados através de Transcrição Reversa e qPCR.

A validação dos resultados de análises de “microarray” foi realizada através da técnica quantitativa de PCR em tempo real, utilizando o aparelho GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) e o reagente “SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). As amplificações foram repetidas 4 vezes, e o conjunto de dados foi analisado de acordo com o método de $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$ utilizando-se o rRNA 18S como controle interno para a normalização dos dados. Nas amplificações foram utilizados os mesmos RNAs utilizados nas hibridizações dos “microarrays”.

Para validar os resultados dos “microarrays” foram desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes de *T. reesei*: TPI (triose-fosfato isomerase), PGM (fosfoglicerato mutase) e PDC (piruvato descarboxilase), HSP70 (proteína de choque térmico da família de 70 kDa), DnaJ (ATPase envolvida em enovelamento protéico), eIF2 (fator de iniciação da tradução) RCI (peptídeo específico de *T. reesei*) e ATF21 (fator transcricional da família ATF/CREB). Na tabela 2 apresentam-se as seqüências nucleotídicas dos oligonucleotídeos sintetizados.

Tabela 2: Sequências nucleotídicas dos oligonucleotídeos específicos de genes de *T. reesei* utilizados durante o desenvolvimento deste projeto.

Nomes dos oligonucleotídeos	Sequências nucleotídicas
Btf3	5` CCGGAATTCATGTCCGACGTCCAGGAG 3` 5` CCGCTCGAGTTACTCGACCTTGCTCTCAAA 3`
Hsp70-2330	5` GACTACGAGTTTGCCGGTGTC 3` 5` AATCCGTCAGCCAAGCTCTC 3`
Hsp70-696	5` CTCTCTCTTCGAGGGTGAGGAC 3` 5` CCATCGAAGAACTCGGACAG 3`
DnaJ-2341	5` GTCAAGGCCAACACCAAGTG 3` 5` CAGCAGAGGAAGAGCCAGAAG 3`
18SRNA-A3248	5` CGGGAGAGAAGACGAACTTCC 3` 5` CTCGAGCTCTCGGGAGGTAA 3`
19SRNA-3820	5` ACGAGGTCGAGATCCGAAAC 3` 5` CCTTCTCGGAGACGTACAGACC 3`
eIF2-248	5` CGGCAAGTCTACCACCACTG 3` 5` GAGCGTCAAAGACGGTGACA 3`
DnaJ-A2012	F CGCCTGTCGTCTTGATCACT 3` R GCGTTCTTGTCAGGATGGTG 3`
ATF-21-A0314	F CGTCTACCTCCGCCTCTCTT 3` R CATCTCCTGGAGGCTCACTG 3`
RCI-A0191	F CACTGCGACCTCTCTTGACA 3` R TAACCCAGGATCGTGAGGAG 3`
MBF	5` AAGCACGGAGCATGATACAGCT 3` 5` CGTGCATCTCTGAATAGACAGG 3`
CBHI	5` TGGACTCACGCTACGAACAG 3` 5` ATTCCTGGTAGGTCGTGTCG 3`
TCP	5` ATGTCGTTTGGAGGCCAGAC 3` 5` GGCCCAGCGTCGACTTGAT 3`
ACT	5` CTGAGCGTGGTTACACCTTC 3` 5` TGGAAGAGAGCCTGAGGAG 3`

IV. RESULTADOS

4.1 - Identificação e clonagem do gene *btf3*

A partir do banco de dados de ESTs de *T. reesei* desenvolvido por nosso laboratório, disponível no endereço <http://trichoderma.iq.usp.br>, foram investigados em larga escala os perfis de expressão gênica de *T. reesei* em resposta ao consumo de glicose e à disponibilidade de oxigênio através da técnica de “microarray” (Chambergo *et al.*, 2002; Bonaccorsi *et al.*, 2006), denotando a alteração da expressão de alguns prováveis reguladores transcricionais. Um destes foi o clone TREST-A0186 identificado como o fator de transcrição BTF3, cuja expressão se mostrou alterada pela diminuição da concentração de oxigênio disponível ao fungo.

Com a finalidade de melhor entender a função deste gene como regulador transcricional foi planejada a obtenção de um mutante *T. reesei* em que a expressão do gene *btf3* estivesse silenciada.

Com esse objetivo, a primeira etapa do trabalho foi confirmar que o clone TREST-A0186 correspondia à anotação como um ortólogo de BTF3. Para tal, o DNA plasmidial do clone foi seqüenciado com o par de oligonucleotídeos “Universal M13 senso & Universal M13 antisenso”. As seqüências obtidas foram analisadas pelos pacotes de programas phred/phrap/crossmatch, gerando uma seqüência consenso de qualidade phred ≥ 20 . A similaridade da seqüência consenso a seqüências conhecidas e depositadas nos bancos de dados público (NCBI, NIH, EUA) foi determinada empregando-se o algoritmo de comparação BLASTX (Altschul *et al.*, 1990), que traduz a seqüência de nucleotídeos em seqüência de aminoácidos nas 6 possíveis fases de leitura e realiza uma comparação das seqüências traduzidas com uma base não-redundante de seqüências de proteínas do banco de dados.

O melhor alinhamento produzido pelo programa BLASTX para a sequência consenso possui uma identidade de 85% com uma proteína do fungo *Neurospora crassa* descrita como um provável fator transcricional *BTF3a* (gi|38567258), com valores de *score* e *E-value* de 253 e 5e-65, respectivamente. Cabe ressaltar que os alinhamentos apresentados na figura 5 apresentam uma alta similaridade com proteínas BTF3 de vários outros organismos. Assim, considerou-se que a anotação do clone TrEST-A0186 correspondia realmente ao provável gene *BTF3* de *T. reesei*.

Figura 5: Análise da sequência nucleotídica do gene *bt3* de *T. reesei*. Utilizou-se o algoritmo de comparação BLASTX para determinar a similaridade da sequência consenso do clone TREST-A0186 a sequências depositadas em bancos de dados públicos. Os sete melhores alinhamentos obtidos na análise da sequência consenso estão indicados com os respectivos valores de *score* e *E-value*.

Além disso, os resultados mostram que a sequência consenso compreende toda a sequência codificante do gene *Trbtf3* numa ORF na fase de leitura +3 contendo 453 nucleotídeos. A sequência de aminoácidos prevista de 151 aminoácidos codifica uma proteína de aproximadamente 16,6 kDa (Figura 6).

A –

> cDNA de *TrBTF3*

ATGTCCGACGTCCAGGAGCGCCTCAAGAAGCTTGGCCAGGCCGCGCGAATCGGTGGAAAGGGAACCCCCG
AAGACCGGTTAAGCGCGCGCCCGCCGTTCCAACAACGATGACAAGAAGCTCCAGGCCAACCTGAAGAAGC
TCAACACCCAGCCCATCCAGGCCATCGAGGAGGTCAACATGTTCAAGTCCGACGGCAACGTCATCCACTTC
GCCGCTCCTAAGGTCCACGCCGCGTCCAGTCCAACACCTTCGCCATCTACGGCAACGGTGAGGACAAGGA
GCTCACCGAGCTCGTCCCCGGCATCCTCAACCAGCTCGGCCCGACTCCCTGGCTTCCCTGCGCAAGCTCG
CCGAGAAGCTACAGAACATGCAGAAGGCCGAGAAGGGCGAGGATGACGACGAGATCCACGACCTGTCAGAA
GGCGAGAAGCTTTGAGAGCAAGGTCGAGTAA

B –

>Proteína TrBTF3

MSDVQERLKKLGQAGRIGGKGTPRRPVKRAPARSNNDDKKLQANLKKLNTQPIQAIIEEVMFKSDGNVIHF
AAPKVHAAVQSNTFAIYNGEDKELTELVPGILNQLGPDLSLASLRKLAEKLQNMQKAEKGEDDDEIHDLS
GENFESKVE*

Figura 6: Análise da região codificante do gene *btf3* de *T. reesei*. A) Sequência de cDNA do gene *Trbtf3* contendo 453 pb; B) Sequência de aminoácidos da proteína TrBTF3 contendo 151 aminoácidos. Para a identificação da região codificante foi utilizado o programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Através da amplificação da sequência codificante do gene *Trbtf3* com os oligonucleotídeos BTF3-*EcoRI* senso e BTF3-*XhoI* antisenso específicos, preparou-se uma sonda para a triagem de uma biblioteca genômica de *T. reesei*, construída no fago Lambda DashTM II (Matheucci, 1993). Após sucessivos ciclos de hibridização foram obtidos fagos com fragmentos de DNA genômico do gene *Trbtf3*. Na procura de possíveis fragmentos para

a subclonagem contendo o locus genômico completo, os fagos foram clivados com várias enzimas de restrição, e analisados através de “Southern blot”.

Foi escolhido para clonagem o fragmento de aproximadamente 3,0 kb obtido da digestão com a enzima *BamHI*, resultado de hibridização única para essa digestão, indicativa de que o gene se encontra completo dentro deste fragmento (Figura 7A). O fragmento foi subclonado no vetor plasmidial BlueScript KS(-), nomeado pE2. A figura 7B mostra a confirmação da subclonagem através da amplificação da região codificadora do gene. A comparação dos produtos da amplificação do clone de cDNA e do clone genômico pE2 mostrou uma diferença de tamanho entre as bandas obtidas, aprox. 450 e 900 pb, respectivamente, que denota a presença de um ou mais íntrons. Essa hipótese foi comprovada através do seqüenciamento do clone genômico e subsequente comparação entre as seqüências genômica e de cDNA que revelaram a presença de dois íntrons: um de 276 pb e outro de 138 pb (Figura 8).

Figura 7: Subclonagem dos fragmentos do locus genômico do gene *Trbtf3*. A) “Southern blot” do fago *btf3* clivado com as enzimas de restrição: *Bam*HI, *Bgl*II, *Pst*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I e *Xho*I para selecionar fragmentos para subclonagem. Utilizou-se como sonda de hibridização o cDNA do gene *btf3*, marcado com [α - 32 P] dATP. B) A confirmação do clone pE2 foi realizada por PCR com os oligonucleotídeos denominados BTF3-*Eco*RI (senso) e BTF3-*Xho*I (anti-senso), desenhados a partir da sequência completa do cDNA do gene *Trbtf3*. C) Representação esquemática do locus *Trbtf3*, mostrando a sequência codificadora, contida no plasmídeo pE2, construído a partir de um fragmento *Bam*HI de aprox. 3 kb do fago *btf3*. As caixas pretas representam os éxons e as linhas entre elas os íntrons. Os sítios de cortes de várias enzimas são representados, além da posição dos oligonucleotídeos senso e anti-senso.

	10	20	30	40	50	60
cDNA						
Genômico	ATGTCCGACGTCCAGGAGCGCCTCAAGAAGCTTGGCCAGGCCGCGCCAATCG-----					

	70	80	90	100	110	120
cDNA						
Genômico	TATGATTGAATTGATGCACTCATCTATGCATCTCTGTTGTTGTTTGATATCGGAACCGTC					
	130	140	150	160	170	180
cDNA						
Genômico	ATCTAACGCCTCGTCTCTTCGCAGGGTATGTTTAATTACGTCGTCGCCAATTACCAACCA					
	190	200	210	220	230	240
cDNA						
Genômico	CCACCATCGCAACCCCCCTCCTCCACCAGCCCCCTCTCACAGAATTGCTCGCGAAAAA					
	250	260	270	280	290	300
cDNA						
Genômico	TCCCACTACGCTTCGAAATTCGATAGAATGCTTGCGAACCAACCTGATCCGATGACGAAC					
	310	320	330	340	350	360
cDNA						
Genômico	-----GTGGAAGGGAACCCCCGAAGACCGGTTAAG					
	TGATCAACTGACGTGTTGCGCCGTGCAGGTGGAAGGGAACCCCCGAAGACCGGTTAAG					

	370	380	390	400	410	420
cDNA						
Genômico	CGCGCGCCCGCCGTTCCAACAACGATGACAAGAAGCTCCAGGCCAACCTGAAGAAGCTC					
	CGCGCGCCCGCCGTTCCAACAACGATGACAAGAAGCTCCAGGCCAACCTGAAGAAGCTC					

	430	440	450	460	470	480
cDNA						
Genômico	AACACCCAGCCCATCCAGGCCATCGAGGAGGTCAACATGTTCAAGTCCGACGGCAACGTC					
	AACACCCAGCCCATCCAGGCCATCGAGGAGGTCAACATGTTCAAGTCCGACGGCAACGTC					

	490	500	510	520	530	540
cDNA						
Genômico	ATCCAATTGCGCCGCTCCTAAGG-----					
	ATCCAATTGCGCCGCTCCTAAGGTACGTTCCTCCCTTGTCATATTCGTCACAAGCAG					

	550	560	570	580	590	600
cDNA						
Genômico	CCTCCGCTGTGCCACCCCAATAACCCACACAAATAAGCAAAGCAAACGACGACACAAT					
	610	620	630	640	650	660
cDNA						
Genômico	-----TCCACGCCGCGCTCCAGTCC					
	CGCATAGCGACGAGATGCTGACCTGGTTCTTTGTTTCGAGTCCACGCCGCGCTCCAGTCC					

	670	680	690	700	710	720

cDNA	AACACCTTCGCCATCTACGGCAACGGTGAGGACAAGGAGCTCACCAGCTCGTCCCCGGC
Genômico	AACACCTTCGCCATCTACGGCAACGGTGAGGACAAGGAGCTCACCAGCTCGTCCCCGGC

	730 740 750 760 770 780
cDNA	ATCCTCAACCAGCTCGGCCCGACTCCCTGGCTTCCCTGCGCAAGCTCGCCGAGAAGCTA
Genômico	ATCCTCAACCAGCTCGGCCCGACTCCCTGGCTTCCCTGCGCAAGCTCGCCGAGAAGCTA

	790 800 810 820 830 840
cDNA	CAGAACATGCAGAAGGCCGAGAAGGGCGAGGATGACGACGAGATCCACGACCTGTCAGAA
Genômico	CAGAACATGCAGAAGGCCGAGAAGGGCGAGGATGACGACGAGATCCACGACCTGTCAGAA

	850 860 870
cDNA	GGCGAGAACTTTGAGAGCAAGGTCGAGTAA
Genômico	GGCGAGAACTTTGAGAGCAAGGTCGAGTAA

Figura 8: Análise comparativa entre as seqüências de cDNA e de DNA genômico do gene *btf3* de *T. reesei*. Os éxons estão indicados por asteriscos sob a seqüência genômica, enquanto os íntrons foram substituídos por traços na seqüência de cDNA. O alinhamento foi realizado através do programa Clustal W (<http://npsa-pbil.ibcp.fr>).

4.2 - Obtenção de mutantes $\Delta Trbtf3$ de *T. reesei*

Para a obtenção de mutantes (nocaute) $\Delta Trbtf3$ de *T. reesei*, foi realizada a construção dum cassete de integração para recombinação homóloga do gene *btf3* a partir do plasmídeo pE2 contendo fragmento genômico de aprox. 3,0 kb. As análises de restrição e o seqüenciamento do plasmídeo indicaram uma seqüência de aprox. 1,6 kb a montante (5') da região codificadora do gene *btf3* e uma seqüência de aprox. 0,6 kb a jusante (3'). Em função de tal distribuição, optou-se por inserir o cassete do gene de higromicina fosfotransferase (*hph*) (Gritz & Davies, 1983) no sítio de clivagem para *HindIII* após o codon de iniciação (ATG) para serem obtidas regiões de 1,6 e 1,4 kb a montante (5') e a jusante (3'), respectivamente, ao cassete *hph* a ser inserido (Figura 9). A inserção do cassete *hph* no sítio de clivagem para enzima *HindIII*, presente na região codificadora do gene *btf3*, foi realizada como descrito em Materiais e Métodos.

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 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O gene *hph* está sob controle do promotor constitutivo (*PtrpC*) e do terminador (*TtrpC*) do gene 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 derivadas do locus alvo e pela utilização de fragmentos lineares de DNA (Shiotani & Tsuge, 1995).

Nesta etapa os esporos do fungo *T. reesei* foram transformados com o cassete de integração contendo o locus genômico do gene *Trbtf3* interrompido pelo gene *hph*, através da técnica de biobalística (Aragão *et al.*, 1996). Os transformantes obtidos foram selecionados, conforme descrito em Materiais e Métodos, e analisados por PCR com o par de oligonucleotídeos BTF3-*EcoRI* (senso) e BTF3-*XhoI* (anti-senso) que amplifica uma seqüência de aprox. 800 pb correspondente ao locus genômico do gene *btf3*, ou uma seqüência de 3,0 kb que denota a incorporação do gene *hph* de 2,2 kb a esse locus. De 42 transformantes obtidos foram escolhidos dois por apresentarem produto de amplificação de 2,9 kb condizente com a inserção do gene *hph*, como mostrado na figura 10A.

Os transformantes $\Delta Trbtf3$ -M3 e $\Delta Trbtf3$ -M8 foram analisados por "Southern blot" para confirmação da substituição do locus genômico do gene *btf3* pelo cassete de integração *btf3/hph*. A figura 10B mostra a análise de restrição com as enzimas *BamHI* e *SalI* do locus genômico do gene *btf3* na cepa selvagem e nos mutantes. Os resultados da digestão com a

enzima *Bam*HI indicam que o fragmento de 3,0 kb, presente na cepa selvagem QM9414 (coluna 1), foi substituído por um fragmento de 5,0 kb nos mutantes M3 (coluna 2) e M8 (coluna 3). De forma análoga, na digestão com a enzima *Sal*I, observa-se a substituição do fragmento de 5,0 kb presente no selvagem por um fragmento de 7,0 kb nos mutantes. Esses dados confirmam a correta substituição do locus *btf3* pelo cassete de integração.

Uma vez confirmados, os mutantes $\Delta Trbtf3$ foram cultivados em glicose a 2% e a interrupção da transcrição do gene *Trbtf3* foi analisada por "Northern blots". Na figura 10C é apresentada a hibridização da sonda do cDNA de *Trbtf3* ao RNA da cepa selvagem, como esperado, enquanto não se observa-a nos mutantes. Esse resultado demonstra que a expressão do gene *Trbtf3* foi silenciada nos mutantes.

Figura 9: Representação esquemática do cassete de integração *bt3/hph* para recombinação homóloga. Mostrando a inserção do cassete de resistência a higromicina fosfotransferase (*hph*), ao locus genômico do gene *bt3* de *T. reesei*, as ligações foram feitas nos sítios indicados depois de formadas as extremidades cegas.

A-

B-

C-

Figura 10: Obtenção do mutantes $\Delta Trbtf3$ do fungo *T. reesei*. A) Confirmação dos transformantes realizada por amplificação através de PCR com os oligonucleotídeos denominados BTF3-*EcoRI* (senso) e BTF3-*XhoI* (anti-senso) específicos para *btf3*. Os transformantes 3 e 8 forneceram um produto de amplificação de aproximadamente 3,0 kb, resultante da inserção do cassete de *hph*. B) “Southern blot” confirmando a substituição do gene *btf3* pelo cassete de integração. Amostras de DNA genômico da cepa selvagem (WT) e dos mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) foram clivadas com as enzimas de restrição *BamHI* e *SalI*, obtendo-se nos mutantes fragmentos cujo tamanho supera os da cepa selvagem pela adição do cassete de integração. C) Análise da expressão de *Trbtf3* de *T. reesei* por “Northern blot”. Amostras de RNA da cepa selvagem (WT) e dos mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) foram preparadas de uma cultura em glicose a 2%. Utilizou-se como sonda, em ambas as hibridizações, o cDNA do gene *btf3* marcado com [α - 32 P] dATP.

4.3 – Efeito do rompimento do gene *btf3* sobre o crescimento de *T. reesei*

Para determinar se o rompimento do gene *Trbtf3* afeta o crescimento do fungo em diferentes condições metabólicas, a cepa selvagem e os mutantes foram cultivados na presença de diferentes fontes de carbono como glicerol, glicose e celulose.

4.3.1 - Crescimento dos mutantes $\Delta Trbtf3$ em glicerol

O crescimento dos mutantes estáveis foi inicialmente analisado através de cinética de crescimento na presença de glicerol, como fontes principais de carbono. Os esporos da cepa selvagem e dos mutantes foram inoculados paralelamente a uma concentração de 1×10^6 em meio completo suplementado com glicerol 2,0%. Após 12 horas de cultivo com a respectiva fonte de carbono foram retiradas alíquotas das culturas para a determinação da concentração celular. A comparação das curvas de crescimento entre os mutantes e a cepa selvagem mostra que os mutantes são capazes de crescer em glicerol, embora em menor velocidade do que a cepa selvagem (Figura 11).

4.3.2 - Crescimento dos mutantes $\Delta Trbtf3$ em celulose

Com o objetivo de estudar as características das cepas mutantes em relação à transcrição dos genes de celulasas, foi realizado um experimento de crescimento e indução do sistema celulolítico, para a extração de RNA e medição da atividade celulolítica extracelular. Neste experimento foram utilizados os dois mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) e a cepa QM9414 selvagem. Inicialmente foram cultivados em meio mínimo e então induzidos com celulose por 45 horas. Durante o período de indução foram retiradas e filtradas alíquotas de 20 mL de cultura, sendo a massa micelial recolhida congelada em nitrogênio líquido, para a obtenção de RNA total, e o sobrenadante mantido a -70 °C, para determinação da atividade celulolítica extracelular.

Utilizando sondas específicas dos genes *cbhI* e *cbhII* de *T. reesei*, a indução do sistema celulolítico foi comparada entre os mutantes $\Delta Trbtf3$ e a cepa selvagem, por meio de “Northern blot”. Os resultados obtidos indicam que os mutantes antecipam a indução da expressão desses transcritos em 3 horas com relação à cepa selvagem. O gene 25S RNA ribossomal foi utilizado como controle de expressão (Figura 13).

A atividade celulolítica foi medida com DNS (ácido dinitrossalicílico), conforme descrito em Matérias e Métodos. Os resultados mostram que os mutantes têm uma secreção exógena das enzimas celulolíticas antecipada. Na figura 12 pode-se observar uma quantidade substancial de atividade de celulasas já está presente às 21 horas de indução nos mutantes, em discordância da cepa selvagem que não apresenta atividade extracelular de celulasas nesse período.

Para validar os dados obtidos sobre a expressão gênica de *cbhI* no mutante $\Delta Trbtf3$, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes *cbhI* (Celobiohidrolase I), *act* (Actina), e *cdo* (Cisteína dioxigenase) de *T. reesei*. A avaliação foi realizada através da técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). A análise foi realizada utilizando o aparelho GeneAmp 5700 (Applied Biosystems) e SYBR GREEN PCR Master Mix (Applied Biosystems). O experimento foi repetido 4 vezes, e os dados foram normalizados de acordo ao método de $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$ utilizando o gene *cdo* como controle interno para a normalização. O gene de actina é um gene estrutural muito utilizado como controle de expressão por diversos grupos de pesquisa por ser um gene constitutivo, entretanto o fato de que a deleção do gene *btf3* aumentava a expressão de actina já havia sido descrito (Hu & Ronne, 1994).

Figura 11: Curva de crescimento da cepa QM9414 selvagem e os mutantes $\Delta Trbt3$ de *T.reesei*, em meio completo suplementado com glicerol 2%. As culturas foram incubadas a 28°C e 200 rpm. Após 12 horas de cultivo aliquotas foram tomadas e as medições foram realizadas por concentração celular em mg/mL após determinação do peso seco da massa micelial filtrada.

Figura 12: Efeito da celulose sobre a indução de atividade celulolítica extracelular. A cepa QM9414 selvagem e os mutantes $\Delta Trbt3$ (M3 e M8) de *T.reesei* foram cultivadas em meio contendo avicel a 2%. Amostras de meio de cultura foram coletadas nos tempos indicados para a medição da atividade de celulases, como descrita em Materiais e Métodos.

Figura 13: Efeito da indução com celulose da cepa QM9414 selvagem e dos mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) de *T. reesei*. Análise da expressão de *cbhI* e *cbhII* de *T. reesei* por “Northern blot”. A cepa QM9414 selvagem e os mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) de *T. reesei* foram cultivadas em meio contendo avicel a 2%. Amostras de meio de cultura foram coletadas nos tempos indicados para extração de RNA, como descrita em Materiais e Métodos.

Na figura 14, os resultados do qPCR demonstraram que a expressão do gene *act* no mutante aumenta durante a cultura em contraste com a cepa selvagem em que a expressão de actina permanece relativamente constante. No caso do gene *cbhI*, a observação de maior expressão do gene no mutante que no selvagem corroborou os resultados obtidos por “Northern blot”.

Figure 14: Análises de qPCR para avaliar a expressão gênica de *cbhI* em mutante $\Delta Trbtf3$ após a indução com celulose a 2%, através da expressão relativa dos genes *cbhI* e *act* de *T. reesei*. As amostras de RNA utilizadas foram 0, 12, 15, 18 e 45 horas de cultura em meio mínimo induzido com celulosa a 2%. A análise foi repetida 4 vezes e os dados foram normalizados de acordo com método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando o gene *cdo* como controle interno.

4.4 - Análise em larga escala da expressão gênica de mutante $\Delta Trbtf3$ de *T. reesei*

Com o objetivo de conhecer o efeito da interrupção da expressão do gene *Trbtf3* sobre a expressão gênica de aproximadamente 2.000 genes através da técnica de “microarray”, as cepas mutante $\Delta Trbtf3$ e selvagem QM9414 de *T. reesei* foram cultivadas em meio completo com 2% glicose a 28°C e 200 rpm, como descrito em Materiais e Métodos.

As lâminas de “microarrays” foram hibridizadas com cDNAs sintetizados a partir de duas réplicas biológicas do experimento previamente descrito. Utilizando como referência o RNA da cepa selvagem QM9414 e como condição de estudo o RNA da cepa mutante $\Delta Trbtf3$, foram produzidas duas lâminas, uma para cada réplica biológica. Cada lâmina foi hibridizada com misturas de mesma concentração dos cDNAs, marcado com fluoróforo Alexa Flúor 647 (Cy5 – vermelho) para a referência e marcado com fluoróforo Alexa Flúor 555 (Cy3 – verde) para a condição de estudo.

A análise das intensidades de fluorescência baseada na relação entre as fluorescências Cy5/Cy3, fornece informações a respeito da abundância dos transcritos representados nos “microarrays” em cada condição de estudo com relação a abundância na condição de referência. Em outras palavras, a razão das intensidades de fluorescência (R) para cada gene é interpretada como a razão das concentrações de seu mRNA nas duas condições analisadas (estudo/referência). Para a melhor interpretação dos resultados, os valores das razões calculadas são convertidos em logaritmos na base 2 ($\log_2 R$). Desta forma, em comparação com a condição de referência, induções e repressões de mesma magnitude tornam-se numericamente iguais, embora com sinais opostos. A normalização dos dados foi realizada através do programa S-PLUS 2000, utilizando o método de Dudoit *et al.* (2000).

Para uma melhor análise dos dados obtidos foram considerados os genes que nas duas lâminas tiveram o mesmo comportamento de expressão gênica, induzidos e/ou reprimidos. A análise das duas lâminas mostrou que 175 genes no mutante *ΔTrbtf3* tiveram alguma mudança significativa na expressão gênica em relação a cepa selvagem, sendo 111 genes induzidos e 64 genes reprimidos. Esses genes foram agrupados de acordo com a função celular: metabolismo, sínteses de proteínas, defesa celular, sinalização celular, estrutura celular, divisão celular, sínteses de RNA, ORFs putativas, não classificados e sem sequência similar (Figura 15).

Genes Alterados pela Interrupção do Gene *Trbtf3*

Genes Induzidos pela Interrupção do Gene *Trbtf3*

Genes Reprimidos pela Interrupção do Gene *Trbtf3*

Figura 15: Distribuição das funções celulares dos genes do mutante $\Delta Trbtf3$ de *T. reesei* que tiveram alteração de pelo menos duas vezes nos níveis de expressão em comparação à cepa selvagem (referência). Foram utilizados os dados de duas réplicas biológicas, aceitando-se como validos somente aqueles genes que estiveram alterados em ambas réplicas.

Pela possível função atribuída a este gene, como repressor, poderíamos esperar que genes regulados pela RNA polimerase II estejam induzidos. Assim, esperar-se-ia que os genes transcritos por essa última tivessem sua expressão aumentada. Nos dados observa-se o aumento da expressão de genes de metabolismo de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). E a repressão do transportador de aminoácidos “*MDR-Like ABC Transporter*”.

Com relação aos genes de defesa celular, não se detectou nenhuma proteína reprimida. Os genes induzidos, dentro desta categoria, foram o peptídeo de resposta a estresse RCI e as proteínas chaperonas DnaJ e DnaK (Hsp70) envolvidas no processo de translocação

Com relação à síntese de proteínas temos alguns fatores de tradução reprimidos, como o fator de alongação 1 alfa, o fator de alongação 1 gama, o fator de início de tradução 1 e o fator de início de tradução 3. A indução da subunidade alfa da proteína G pode estar relacionada com a fosforização deste fator eIF-2 e sua conseqüente ativação, assim como das proteínas envolvidas no choque térmico. Também foi observada a indução de vários genes relacionados a proteínas ribossomais.

Outro fator de tradução alterado, mas induzido, foi o fator de início da tradução 2 (*Initiation Factor eIF-2*), que está relacionado a indução de proteínas envolvidas na resposta a estresses (Jiang *et al.*, 2003). Um efeito secundário desse fator é a ativação da transcrição de diversos genes envolvidos no processamento e secreção de proteínas.

Na categoria de estrutura celular apresentam-se reprimidos o gene da hidrofobina II, envolvida na formação da parede celular do fungo, e de uma proteína do citoesqueleto, enquanto os genes que codificam para uma glicosiltransferase e a tubulina alfa-2 foram induzidos.

Na categoria de síntese de RNA, observou-se que os genes duma proteína que faz parte do complexo SAGA (TRA1), e duma subunidade da RNA polimerase III foram induzidos pelo

nocaute. Entre os genes reprimidos nesta categoria podemos encontrar o fator de transcrição ATF21 (*ATF/CREB-family transcription factor atf21 - S. pombe*).

Finalmente, notou-se um grande número de genes com função desconhecida e sem similaridade cuja expressão foi alterada pela interrupção da expressão gênica de *Trbt3*. Estes genes totalizaram uma porcentagem de 48 % do total de genes significativamente alterados. Nas tabelas 3 e 4 do apêndice são apresentadas as listas dos genes que tiveram alguma variação estatisticamente significativa ao comparar o mutante $\Delta Trbt3$ com a cepa selvagem de *T. reesei*.

Depois desta avaliação, procedeu-se à validação dos resultados obtidos dos “microarrays” através de comparações de amplificações obtidas através de transcrição reversa “RT-PCR”, com oligonucleotídeos específicos para nove genes. Para esta análise foram utilizados os mesmos RNAs utilizados na confecção das lâminas de “microarrays”. A partir destes resultados, pode-se atribuir uma tendência de indução mais pronunciada no mutante aos genes eFI-2, HSP70, DnaJ e RCI, conforme observado no “microarray”, sendo do gene RCI a indução mais ressaltante. Também pode-se comprovar que os genes 19S RNA ribossomal e ATF21 tiveram uma repressão mais pronunciada conforme os dados anteriormente apresentados. Utilizamos como controle o 18S ribossomal, um gene que não teve alteração significativa na sua expressão, segundo as análises dos “microarrays”. Devido à indução de vários genes do metabolismo de lipídios decidimos observar a expressão do gene *mbf1* (*Multiprotein bridging factor-1*), um co-fator que promove a interação de diferentes receptores nucleares com a maquinaria basal de transcrição e relacionado à regulação do metabolismo de lipídios (Brendel *et al.*, 2002). Observou-se que este gene tem uma tendência de indução no mutante. Em geral, o processo de validação mostrou boa correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas, conforme demonstrado na Figura 16, que apresenta algumas das comparações realizadas.

Figura 16: Validação de resultados de “microarrays”. Para a comparação entre a expressão do mutantes $\Delta Trbt3$ e a cepa QM9414 selvagem de *T. reesei* foi utilizado o mesmo RNA utilizado para as confecções e hibridizações dos “microarrays” mostrando concordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas.

4.5 - Efeitos da mutação $\Delta Trbt3$ sobre a resposta de *T. reesei* ao choque térmico a 40°C

Para determinar os efeitos do choque térmico sobre a expressão gênica do mutante $\Delta Trbt3$ comparada com a resposta da cepa selvagem QM9414 de *T. reesei* foi escolhida a temperatura de 40°C, com base na literatura disponível referente a choque térmico em fungos (Ferreira, 2006; Chen *et al.*, 2003; Bai *et al.*, 2003).

4.5.1 - Efeito da temperatura a 40°C sobre o crescimento do mutante *ΔTrbtf3*

Para determinar se os mutantes seriam capazes de crescer a 40°C, foram realizadas culturas paralelas da cepa selvagem QM9414 e dos mutantes *ΔTrbtf3* (M3 e M8) em meio sólido. Esporos de 7 dias foram semeados a uma concentração de 1×10^5 em meio PDA e em meio mínimo, e incubados a 28°C e a 40°C por 48 horas. Após este tempo as placas foram recolhidas e medições do crescimento radial foram realizadas. Para cada condição de estudo foram realizadas duas repetições e obtidas as respectivas médias. Os resultados mostram que o crescimento radial foi maior nos fungos crescidos em meio PDA a 28°C que a 40°C. Também o crescimento radial em meio mínimo foi maior quando os esporos foram incubados a 28°C. Na comparação entre os mutantes *ΔTrbtf3*(M3 e M8) e a cepa selvagem não foram percebidas diferenças significativas em todas as condições de estudo. Cabe mencionar que foram observadas diferenças nas características fenotípicas das culturas em que os mutantes apresentam hifas alongadas e com menor número de ramificações (Figura 17).

Posteriormente, o crescimento da cepa selvagem e do mutante M3 foi comparado através de curvas de crescimentos realizadas em meio completo com 2% glicose. Após a etapa de pré-cultura, e substituição do meio, cada cultura foi dividida: uma metade continuou sendo incubada a 28°C enquanto a outra passou a ser incubada a 40°C, ambas por período de 5 horas. Aliquotas a cada hora foram coletadas para determinar a concentração celular. Os resultados da comparação entre os mutantes e o selvagem indicaram que o crescimento do mutante a 40°C foi menor do que a 28°C, ambos menores do que o da cepa selvagem, embora não houve diferenças significativas no crescimento celular tanto da cepa selvagem como do mutante nas diferentes temperaturas. No microscópio observou-se menos ramificação das hifas no mutante (Figura 18).

A-

B-

QM 9414 - 28°C

$\Delta Trbtf3$ - 28°C

QM 9414 - 40°C

$\Delta Trbtf3$ - 40°C

Figura 17: Influência da temperatura sobre o crescimento de *T. reesei*. A) Crescimento radial da cepa QM9414 selvagem e os mutantes $\Delta Trbtf3$ (M3 e M8) em meio mínimo (MM) e em meio PDA a 28°C e 40°C. B) Fotografia das culturas da cepa selvagem QM9414 e do mutante $\Delta Trbtf3$, crescidas em meio PDA a 28°C e 40°C.

A-

B-

Figura 18: Curva de crescimento sob a influência da temperatura de 40°C. A) A cepa QM9414 selvagem e o mutante $\Delta Trbtf3$ de *T.reesei* foram cultivados em meio completo com 2% glicose, as alíquotas foram tomadas 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a incubação a 28°C, ou a 40°C. Dados de concentração celular (mg/mL) após secagem da massa micelial. B) Fotografia dos fungos antes e depois do choque térmico.

4.5.2 - Resposta transcricional do mutante $\Delta Trbtf3$ ao choque térmico a 40°C.

Uma vez determinado que o mutante poderia sobreviver a 40°C foi realizado o experimento de choque térmico, segundo descrito em Matérias e Métodos, para estudar o efeito do silenciamento do gene *Trbtf3* sobre a resposta transcricional de aproximadamente 2.000 genes no fungo *T. reesei* ao choque térmico através da técnica de “microarray”.

As lâminas de “microarrays” foram hibridizadas com cDNAs sintetizados a partir de RNAs extraídos das amostras de *T. reesei* coletadas durante a exposição do fungo a alta temperatura (40°C). A condição de estado estacionário fisiológico a 28 °C por 2 horas, correspondente à primeira amostra coletada, foi tomada como referência para todos os pontos. Foram produzidas cinco lâminas de “microarrays”, para o mutante $\Delta Trbtf3$ -3, e cinco lâminas para a cepa selvagem, com as amostras obtidas de 2 horas a 28 °C, 15 min a 40 °C, 30 min a 40 °C, 60 min a 40 °C e 1 hora a 28 °C. Cada lâmina foi hibridizada com mistura de iguais proporções de cDNA-referência (marcado com Cy3 – verde) e cDNA da correspondente condição de estudo (marcado com Cy5 – vermelho). Desta forma, a primeira lâmina foi hibridizada com duas populações de cDNA da condição referência, uma marcada com Cy3 e outra com Cy5. A segunda foi hibridizada com cDNA referência-Cy3 e condição 1 (15min a 40 °C)-Cy5, a terceira com cDNA referência-Cy3 e condição 2 (30min a 40 °C) -Cy5, e assim por diante. Como se mostra na tabela 1 em Matérias e Métodos.

Numa primeira análise das lâminas produzidas da cepa selvagem e do mutante, e de acordo com os critérios de seleção aplicados às quadruplicatas dos 1.920 genes de *T. reesei* representados nas demais lâminas, foram escolhidos 1.843 genes para análise. O perfil transcricional destes 1.843 genes, referente ao choque térmico a 40°C no mutante $\Delta Trbtf3$

comparado com a cepa selvagem, são apresentados na figura 19, agrupados pelo método SOM (“Self Organizing Maps” – mapas auto-organizáveis) do programa GeneCluster v.2.1.7, com os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 500.000 iterações com faixa de difusão igual a 72, faixa de aprendizado de 0,1 a 0,00005 e faixa de atualização de 5 a 0,0005, num arranjo 5 x 6, formando 30 grupos de genes em função das tendências apresentadas do seu comportamento transcricional face às variações no choque térmico. Segundo a categoria funcional, atribuída com base em bancos de dados públicos, estes 1.843 assim distribuem-se: 34 em defesa celular, 19 em divisão celular, 29 em sinalização celular, 29 em estrutura celular, 285 em metabolismo, 171 em síntese protéica, 30 em síntese de RNA, 34 em outros genes, 336 em ORFs putativas, 79 não classificados e 798 em sem sequência similar.

Através do agrupamento por SOM a formação dos grupos ou “clusters” de genes, apresentados na Figura 19, promove uma separação preliminar de genes que possuem comportamentos similares nas condições de choque térmico. Numa primeira análise destes grupos, de caráter puramente visual, verificou-se nos “clusters” c0-c5 a ocorrência de indução da transcrição tanto no selvagem como no mutante, notando-se que os “clusters” c0-c2 tiveram uma tendência de indução mais pronunciada no mutante. Nos “clusters” c6-c13 observou-se tendência de indução apenas na cepa selvagem, enquanto nos “clusters” c14-c21 só ocorreu indução no mutante. Assim, a indução dos genes dos “clusters” c6-c13 mostrou-se dependente de *Trbtf3*, enquanto que o nocaute desse gene induziu a expressão dos genes dos “clusters” c14-c21, indicando um possível papel direto ou indireto desse gene na manutenção de uma menor expressão desses genes frente ao choque térmico.

Nos grupos de genes reprimidos pode-se observar que os “clusters” c23 e c24 tiveram uma tendência de repressão mais pronunciada ao selvagem, e, no “cluster” c27 pode-se atribuir

uma tendência de repressão mais pronunciada ao mutante. Nos “clusters” c19, c27 e c28 no selvagem e c29 no mutante, notou-se apenas indução no retorno a temperatura de 28 °C, enquanto no “clusters” c26 praticamente não se observou modificações entre os níveis transcricionais do mutante e da cepa selvagem.

Inicialmente, o comportamento transcricional de qualquer gene na lâmina referente ao último ponto do experimento (1 hora a 28 °C) deve ser considerado com certa ressalva, tendo sempre em vista que esta condição representa o alívio de uma situação estressante para o organismo. Pode-se considerar que não houve tempo suficiente para um retorno completo ao estado estacionário inicial e também que o organismo com o intuito de retornar ao estado inicial expresse certos genes em taxa diferente da condição inicial. Portanto, apesar da temperatura ser a mesma do início do experimento, é de se esperar que em vários casos os níveis transcricionais sejam diferentes nas duas condições.

Figura 19: Perfil de expressão dos genes do mutante $\Delta Trbt3$ e da cepa selvagem QM9414 de *T. reesei* submetidos a choque térmico a 40°C. Pelo programa SOM, 1.843 genes representados nos “microarrays” foram agrupados em 30 clusters (c0 a c29), de acordo com o comportamento transcripcional frente ao choque térmico. Para cada “cluster” há um gráfico com a tendência de expressão (linha azul) e as dispersões (linhas vermelhas) dentro do grupo. O numero de genes que compõem cada grupo esta indicado ao lado no numero do “cluster”. Cada coluna corresponde a uma condição do experimento: As colunas 0 (referência de 2 horas a 28 °C); colunas 1 (15min a 40 °C); colunas 2 (30min a 40 °C); colunas 3 (60 min a 40 °C); colunas 4 (retorno 1 hora a 28 °C). Induções e repressões são representadas, respectivamente, em vermelho e em verde.

4.5.3 - Identificação de genes diferencialmente transcritos no mutante $\Delta Trbt3$ pelo choque térmico a 40°C

Depois de uma primeira avaliação dos dados obtidos das lâminas de “microarrays”, buscou-se identificar aqueles genes cuja variação nos níveis de transcrição fosse significativa nas condições experimentais empregadas e quais, dentre eles, apresentavam-se pelo menos 2 vezes mais induzidos, ou reprimidos, com relação à condição de referência. Seguindo este critério, 595 genes no selvagem e 667 genes no mutante foram selecionados por apresentar mudanças significativas na expressão gênica (Tabela 5).

Para a análise da resposta transcricional ao choque térmico foram selecionados os genes que passaram no teste em pelas menos duas das lâminas, com exceção daquela correspondente à condição de referência. Desse modo, dos 1.843 genes representados nos “microarrays”, foram selecionados 741 diferencialmente expressos ($P < 0,05$), com níveis de indução, ou repressão, maiores ou iguais a duas vezes com relação à condição inicial de temperatura a 28°. Dentre os 741 genes (Tabela 6 e 7 do apêndice), houve genes que apresentaram mudanças significativas somente em uma das cepas em estudo: 265 no mutante e 152 na cepa selvagem; enquanto os demais 324 genes tiveram a expressão modificada em ambas as cepas. Cabe mencionar que, em função do tempo de choque térmico, o ponto de maior modificação do padrão transcricional, em relação à condição de temperatura normal de cultivo (28°C), foi aquele após 30 minutos do início do estresse para as duas cepas, embora com um maior número de genes afetados no mutante.

Tabela 5: Número de genes induzidos ou reprimidos no mutante $\Delta Trbtf3$ e na cepa selvagem QM9414 de *T. reesei*, para cada condição de estudo do experimento de choque térmico, após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas.

	Condição	Total	Invariantes	Induzidos	Reprimidos	Modificados
<i>$\Delta Trbtf3$-3</i>	40°C – 15 min	1843	1535	204	104	308 (16.7%)
	40°C – 30 min	1843	1282	314	247	561 (30.4%)
	40°C – 60 min	1843	1401	237	205	442 (24.0%)
	28°C – 60 min	1843	1688	102	53	155 (8.4%)
QM9414	40°C – 15 min	1843	1496	178	169	347 (18.8%)
	40°C – 30 min	1843	1489	172	182	354 (19.2%)
	40°C – 60 min	1843	1573	125	145	270 (14.7%)
	28°C – 60 min	1843	1594	121	128	249 (13.5%)

Para melhor relacionar os perfis transcricionais desses 741 genes nas condições de estudo, foi arbitrariamente dado o valor de 0 para os logaritmos em base 2, da razão de expressão, M, para as condições de referências, já que esses valores foram utilizados para determinar os limites de M para se considerar a variação, ou não, da expressão gênica, então os genes considerados induzidos terão um valor $M \geq 1$ e os reprimidos terão um valor $M \leq -1$. No apêndice são apresentadas as listas dos genes, com suas respectivas identificações e agrupados em categorias funcionais (Metabolismo, Síntese de proteínas, Divisão celular, Defesa celular, entre outros), que tiveram alguma variação estatisticamente significativa ao comparar o mutante com a cepa selvagem.

Também pelo método de agrupamento por SOM, esses genes foram organizados em “clusters” utilizando os mesmos parâmetros descritos anteriormente. Na figura 20 (A, B e C), são apresentados os grupos de genes com perfis transcricionais semelhantes em resposta ao choque térmico, por meio de mapas de expressão gerados na plataforma Metal 1.7.1., acompanhados de gráficos de perfil transcricional para cada grupo. Para a confecção dos mapas na plataforma Metal normalizou os valores de razão de expressão, M, numa faixa de $M \leq 1$ para valor mais induzido e $M \geq -1$ para o valor mais reprimido, sendo os genes reprimidos representados em coloração verde e os induzidos, em coloração vermelha.

Através duma análise visual pode-se observar quatro grandes grupos nas ocorrências de indução / repressão de transcrição tanto na cepa selvagem como na cepa mutante em função das condições experimentais. O primeiro contém os "clusters" de genes (c0 - c5) que foram induzidos em ambas as cepas. Nota-se que os "clusters" c2 e c5, compostos majoritariamente por genes de resposta a estresses, apresentam uma tendência de indução, mais pronunciada no mutante. O segundo grupo ("clusters" c6 – c9) apresenta genes reprimidos no mutante e induzidos ou invariáveis na cepa selvagem, é composto sobretudo por genes proteínas ribossomais e fatores de tradução. No terceiro grupo ("clusters" c10 – c15) encontram-se genes cuja expressão teve comportamento inverso ao grupo anterior: induzida no mutante e reprimida ou invariável na cepa selvagem. Dentre os genes deste grupo foram identificados genes do metabolismo. No quarto grande grupo ("clusters" c16 – c19), estão genes que foram reprimidos em ambas cepas durante o choque térmico, representando principalmente genes do ciclo celular. Note-se que em todos os grupos encontra-se um grande número de genes com função desconhecida, com ou sem sequência similar.

Figura 20A: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* induzidos ou reprimidos em 2 ou mais vezes, em resposta ao choque térmico a 40°C, comparando a cepa selvagem QM9414 (1-5) e o mutante $\Delta Trbt3$ (6-10). Os genes foram agrupados pelo perfil transcricional através do algoritmo SOM do pacote de análise de programa GeneCluster 2.1.7 em 20 “clusters”. Para cada “cluster” há um gráfico com a tendência de expressão (linha azul) e as dispersões (linhas vermelhas) dentro do grupo, apresentando também o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes. Cada coluna corresponde a uma condição do experimento. As colunas 0 (referência de 2 horas a 28 °C); colunas 1 (15min a 40 °C); colunas 2 (30min a 40 °C); colunas 3 (60 min a 40 °C); colunas 4 (retorno 1 hora a 28 °C). Induções e repressões são representadas, respectivamente, em vermelho e em verde, normalizadas com relação aos maiores valores.

Figura 20C: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* induzidos ou reprimidos em 2 ou mais vezes,, em resposta ao choque térmico a 40°C, comparando a cepa selvagem QM9414 (1-5) e o mutante $\Delta Trbt3$ (6-10). Os genes foram agrupados pelo perfil transcricional através do algoritmo SOM do pacote de análise de programa GeneCluster 2.1.7 em 20 “clusters”. Para cada “cluster” há um gráfico com a tendência de expressão (linha azul) e as dispersões (linhas vermelhas) dentro do grupo, apresentando também o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes. Cada coluna corresponde a uma condição do experimento. As colunas 0 (referência de 2 horas a 28 °C); colunas 1 (15min a 40 °C); colunas 2 (30min a 40 °C); colunas 3 (60 min a 40 °C); colunas 4 (retorno 1 hora a 28 °C). Induções e repressões são representadas, respectivamente, em vermelho e em verde, normalizadas com relação aos maiores valores.

Na figura 21, mostra-se a cinética da expressão na condição de choque térmico dos genes das lâminas de “microarray” (item 4.4) que tiveram sua expressão gênica significativamente alterada pela mutação do gene *Trbtf3* comparada com a cepa selvagem. Para esta análise foram utilizados os critérios de seleção aplicada nos dados mostrados no item 4.5.3. Assim os genes que tiveram sua expressão gênica induzida, ou reprimida, em pelo menos duas vezes foram aceitos para a confecção dos mapas, na plataforma metal 1.7.1.

Os genes induzidos pelo nocaute em sua maioria continuaram induzidos durante todo transcurso do experimento de choque térmico. Também tivemos genes que permaneceram induzidos durante o choque térmico tanto na cepa mutante como na selvagem. Um desses, da categoria de defesa celular, é o peptídeo RCI. Também observamos genes que permaneceram reprimidos na cepa selvagem e foram induzidos no mutante, entre eles os da subunidade TRA1 do complexo SAGA, da proteína beta-transducina e uma protease. Um terceiro grupo foi daqueles genes que se mostraram reprimidos nas duas cepas.

Os genes reprimidos pelo nocaute também permaneceram reprimidos em sua maioria durante o estresse térmico, como o “MDR-Like transporter”. Tivemos genes induzidos na cepa selvagem que permaneceram reprimidos no mutante. Alguns deles foram os da hidrofobina II, do fator de início de tradução (eIF1) e do fator de início de tradução (eIF3).

Estes resultados nos demonstram que o efeito da mutação no gene *Trbtf3* é mantido durante a condição de estresse térmico. O conhecimento do comportamento destes e de outros genes afetados pela mutação podem explicar o papel de *btf3* na regulação da transcrição de *T. reesei*.

Figura 21: Padrões de expressão dos genes do mutante $\Delta Trbtf3$ de *T. reesei* cuja expressão na condição do choque térmico foi alterada pela interrupção do gene *btf3*. A) Cinética de expressão dos genes induzidos significativamente pela mutação. B) Cinética de expressão dos genes reprimidos significativamente pela mutação. Cada coluna corresponde a uma condição do experimento: As colunas 0 (referência de 2 horas a 28 °C); colunas 1 (15min a 40 °C); colunas 2 (30min a 40 °C); colunas 3 (60 min a 40 °C); colunas 4 (retorno 1 hora a 28 °C). Induções e repressões são representadas, respectivamente, em vermelho e em verde.

Baseando-se na anotação atualizada dos genes cuja transcrição foi induzida, ou reprimida, são apresentados gráficos da distribuição das funções celulares em resposta ao choque térmico na cepa selvagem e na cepa mutante (Figura 22). Pelos dados obtidos pode-se observar, como esperado, que a resposta ao estresse se concentrou na indução das proteínas de choque térmico. A maioria das proteínas de choque térmico são chaperonas cuja função principal é re-enovelar as proteínas desnaturadas e têm a capacidade de desagregar aglomerados de proteínas desnaturadas. Na categoria de função não classificada encontrou-se induzida a proteína tioredoxina, que tem papel na proteção da célula contra espécies reativas de oxigênio. Ela pode servir como doador de elétrons (redutor), e também está implicada na formação de pontes dissulfeto em proteínas. Na categoria de sinalização celular observou-se uma porcentagem maior de genes induzidos que reprimidos nas duas cepas. Na categoria de síntese protéica, uma alta porcentagem tanto de genes induzidos como reprimidos em ambas cepas foi verificada, embora a porcentagem de genes reprimidos no mutante fosse maior. Essa diferença na porcentagem de genes reprimidos entre as cepas deveu-se ao maior número de genes de proteínas ribossomais reprimidos no mutante.

A repressão de genes envolvidos na estrutura celular (hidrofobina II), e na divisão celular (histonas), assim como a indução do gene que codifica a proteína Sps2 específica para esporulação, durante o choque térmico evidenciou uma pausa no ciclo celular e o início da esporulação, uma resposta de defesa conhecida para fungos visando sua preservação na forma latente de esporos.

Na categoria de metabolismo pudemos observar um grande número de genes induzidos e reprimidos para as duas cepas. No mutante a porcentagem de genes induzidos foi maior que na cepa selvagem, em oposição ao maior número de genes reprimidos na cepa selvagem que no mutante.

Figura 22: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada, no mutante $\Delta Trbtf3$ e na cepa selvagem QM9414, pelo choque térmico da cultura a 40°C. Ao lado de cada fatia são apresentados, respectivamente àquela função celular, o número de genes que sofreu alteração em sua expressão e a correspondente porcentagem em relação ao total de genes com alteração

A Figura 23 exibe a comparação da expressão dos genes envolvidos no metabolismo de carboidratos (glicólise, via das pentoses-fosfato, ciclo de ácidos tricarboxílicos - TCA) no mutante $\Delta Trbtf3$ e na cepa selvagem QM9414 na condição de estresse (choque térmico a 40 °C) por 30 minutos.

A expressão dos genes envolvidos na conversão de glicose a piruvato nas duas cepas foi similar, indicando que em alta temperatura a via glicolítica está induzida facilitando o fluxo de glicose a piruvato, que pode ser contemplado pelo nível de expressão dos transcritos de hexoquinase, fosfofrutoquinase, frutose-1,6-bisfosfato aldolase, enolase, piruvato quinase.

Na cepa selvagem o gene piruvato descarboxilase (PDC) foi ativado na temperatura 40°C indicando que piruvato possa ser metabolizado a acetaldeído. Esse seria uma via disponível uma vez que o ciclo de TCA encontrava-se reprimido, evidenciado pela forte repressão dos genes citrato sintase e malato desidrogenase. Posteriormente o acetaldeído seria acumulado nesta condição, ou poderia ser reduzido a etanol pela enzima álcool desidrogenase (ADH) para a oxidação do NADH a NAD^+ , necessária para a continuidade da atividade glicolítica, podendo ser a única via disponível nessa condição visto a forte repressão da acetaldeído desidrogenase (ALD1). No mutante o gene PDC também foi induzido na temperatura de 40°C, entretanto o ciclo de TCA também encontrava-se metabolicamente funcional devido à indução de seus genes, inclusive citrato sintase e malato desidrogenase reprimidos na cepa selvagem. Dessa forma o piruvato poderia ser oxidado no ciclo de TCA ou ser reduzido a acetaldeído. Haveria duas possibilidades para o metabolismo do acetaldeído: ser reduzido produzindo etanol, já que o gene álcool desidrogenase foi fortemente induzida, e / ou ser oxidado formando acetato, uma vez que a expressão da acetaldeído desidrogenase (ALD2) também foi induzida. Então o destino final dependeria da afinidade de cada enzima pelo piruvato, e, se no hipotético caso o destino fosse o acetaldeído, a via a seguir também dependeria da afinidade de ALD e ADH por acetaldeído.

Também foram induzidas nas duas cepas a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), envolvida na via das pentoses-fosfato, e a fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK), enzima necessária para a entrada de intermediários do ciclo de TCA na gliconeogênese. A respiração é favorecida devido à ativação desse conjunto enzimático e é satisfeita a necessidade de glicose através de gliconeogênese.

Analisando os dados obtidos e assumindo que a regulação só ocorre no nível transcricional, podemos afirmar que o nocaute do gene *btf3* potencializa e induz a expressão dos genes do metabolismo de carboidratos na condição de temperatura alta.

A.

B.

Figura 23: Análises através da técnica de “microarray” do perfil transcricional de genes do metabolismo de carboidratos no fungo *T. reesei* sob choque térmico a 40°C por 30 minutos. (A) Cepa selvagem QM9414. (B) Mutante Δ Trbtf3. Os quadrados em vermelho indicam genes induzidos; em verde, os genes reprimidos; em preto, os que não tiveram sua expressão alterada; e em branco, os não analisados.

Para validar os resultados obtidos nos “microarrays” foi empregada a técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). As comparações foram realizadas com os mesmos RNAs utilizados na hibridização dos “microarrays”. Para esta análise foram desenhados oligonucleotídeos específicos para os genes do metabolismo de carboidratos: triose-fosfato isomerase (TPI), fosfogluco mutase (PGM) e piruvato descarboxilase (PDC); para genes de defesa celular: ATPase DnaJ, o peptídeo RCI e genes da família protéica das HSP70; para o gene do fator de iniciação de tradução eIF2, e para o gene do fator transcricional ATF21. As amplificações foram repetidas 4 vezes, e os dados obtidos foram analisados de acordo com o método de $2^{-(\Delta\Delta C_T)}$, utilizando o gene do rRNA 18S como controle interno para normalização dos resultados. Para a confecção dos gráficos de expressão relativa, os dados foram transformados em porcentagem de indução com relação ao valor mais alto obtido entre as duas cepas para um mesmo gene. Tal critério foi adotado considerando que o valor das referências (28°C por 2 horas) em base de $\log_2$ é sempre de 1,00 para ambas as cepas.

A partir dos resultados obtidos nas hibridizações dos “microarrays” podemos atribuir uma tendência de indução maior nos genes para TPI, PGM, PDC, DnaJ, RCI, eIF2 e as duas HSP70. Notou-se que os genes do metabolismo de carboidratos foram induzidos em ambas cepas, com maiores porcentagens de indução na cepa mutante. Assim também se sucedeu com relação à expressão dos genes de defesa celular, em que se observou uma diferença na tendência de indução entre a cepa selvagem e a mutantes, sendo maior e mais marcante para esta última, tendo como bom exemplo a expressão relativa do peptídeo RCI. Quanto ao fator transcricional ATF21 constatou-se que sua tendência de expressão se manteve significativamente inalterada durante a cinética do experimento. Cabe mencionar que a expressão desse gene estava sob repressão na condição inicial do experimento, e que, após a submissão dos dados aos critérios de normalização

para determinação de expressão significativa, permaneceu inalterada. Com relação à categoria de síntese de proteínas verificou-se que o fator de tradução eIF2 foi reprimido na cepa selvagem e induzido no mutante, em contraposição ao resultado observado para o gene do rRNA 19S, que foi induzido na cepa selvagem e reprimido no mutante. Em geral, o processo de validação mostrou boa correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas, conforme demonstrado na Figura 11, que apresenta algumas das comparações realizadas

Segundo os resultados obtidos pela técnica de qPCR para os genes acima mencionados, comprovou-se uma tendência de indução mais pronunciada na cepa mutante dos genes para eIF-2, HSP70, DnaJ e RCI, conforme observado no “microarray”, sendo a indução do gene do peptídeo RCI a mais proeminente. Também se pode observar que o gene do rRNA 19S tem uma repressão mais pronunciada conforme os dados anteriormente apresentados. O rRNA 18S foi utilizado como controle interno visto que não teve alteração significativa em sua expressão segundo as análises dos “microarrays”. Por conseguinte considerou-se que o processo de validação mostrou boa correlação entre os resultados obtidos pelas duas técnicas, conforme demonstrado na Figura 24.

Figure 24: Validação dos resultados de “microarrays”. Através de análises de qPCR foi medida a expressão gênica relativa dos genes para TPI, PGM, PDC, DnaJ, HSP70, RCI, eF12, rRNA 19S e ATF21 na cepa selvagem (coluna 1-5) e no mutante $\Delta TrbTf3$ (coluna 6-10) de *T. reesei*, na condição do choque térmico a 40°C. Nas análises foram utilizados os mesmos RNAs utilizados para as hibridizações dos “microarrays” mostrando concordância entre os resultados obtidos pelas duas técnicas. A análise foi repetida 4 vezes e os dados foram normalizados de acordo com método de $2^{-\Delta\Delta C_T}$ utilizando o gene rRNA 18S como controle interno.

V. DISCUSSÃO

O seqüenciamento do genoma de inúmeros organismos assim como o do ser humano (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001), e de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996), marcou o advento da era genômica, e tornou possível análises comparativas entre genomas de diferentes organismos (Zeng *et al.*, 2001). O aspecto mais importante do trabalho de Zeng *et al.* (2001) 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 entre *S. cerevisiae* e o homem. Esses resultados confirmam a importância dos fungos como modelos de estudo em diversos processos moleculares.

Em comparação a organismos unicelulares, tais como *S. cerevisiae*, os fungos filamentosos apresentam estruturas morfolologicamente mais complexas e especializadas para a reprodução, infecção e crescimento vegetativo, o que os tornam relevantes no estudo de células eucarióticas. Atualmente os fungos filamentosos estão sendo utilizados como modelo de organismo eucariótico para o estudo da diversidade metabólica e regulação gênica da diferenciação celular (Champe *et al.*, 1994; DeRisi *et al.*, 1997; Hoffmann *et al.*, 2001; Chambergo *et al.*, 2002).

A regulação da expressão gênica, em nível transcricional, é, muitas vezes, determinada na utilização de vias metabólicas específicas. Estas mudanças transcricionais são mediadas por proteínas ativadoras e/ou repressoras que interagem com distintas regiões dos promotores dos genes regulados (Zaragoza *et al.*, 2001). O conhecimento dos processos envolvendo a repressão e a indução de conjuntos diferentes de genes estimulou a pesquisa sobre a regulação metabólica em microrganismos unicelulares e multicelulares (DeRisi *et al.*, 1997; Chambergo *et al.*, 2002).

Trichoderma reesei é um fungo filamentoso, organismo modelo para a análise genômica da regulação de redes metabólicas. Nosso laboratório tem construído um banco de dados contendo uma amostra significativa de seqüências parciais de 2000 genes (ESTs – “Expressed Sequence Tags”) deste fungo e o padrão de expressão destes genes foi analisado pela técnica de “microarray” (Chamberg *et al.*, 2002, Bonaccorsi *et al.*, 2006). Estes dados estão disponíveis em banco público (<http://trichoderma.iq.usp.br>).

Neste trabalho, descrevemos a caracterização de um destes transcritos, que foi identificado como um gene que codifica para uma proteína com atividade regulatória, ortóloga de BTF3 (Zheng *et al.*, 1987; Potashkin *et al.*, 1996), uma proteína muito conservada em eucariotos, que faz parte do complexo que se liga a polipeptídios nascentes (NAC), e também interage com a RNA polimerase II (George *et al.*, 1998; Brockstedt *et al.*, 1999; Hu & Ronne, 1994; Whitby & Dixon, 2001, Yotov *et al.*, 1998). Dada a importância desta proteína no exercício de ações regulatórias, obtivemos mutantes nulos de *T. reesei* em que o gene *btf3* fosse nocauteado, e analisamos a resposta gênica deste mutante ao choque térmico usando “microarrays” de cDNA.

5.1 – Efeito da mutação do gene *Trbtf3* em *T. reesei*

Para desvendar o mecanismo pelo qual os fatores transcricionais regulam o processo da transcrição é preciso entender seu papel dentro da maquinaria transcricional nos diversos processos metabólicos e celulares.

O fator transcricional 3 da polimerase II foi primeiramente descrito como um fator necessário para o início da transcrição pela RNA polimerase II em adenovírus-2 (Zheng *et al.*, 1987; Moncollin *et al.*, 1992). Trabalhos posteriores o apresentaram como um regulador negativo da RNA polimerase II (Gerard *et al.*, 1991; Hu & Ronne, 1994; Parthun *et al.*, 1992). No trabalho realizado por Hu & Ronne (1994), com mutantes nulos de genes homólogos a *BTF3*, mostraram

que os genes envolvidos no metabolismo de galactose sofreram maior indução na presença de galactose. Baseados nestes resultados e devido à importância de *T. reesei* como produtor de enzima celulolíticas, avaliamos a produção destas enzimas no mutante nocaute $\Delta btf3$, denotando a antecipação da expressão dos genes envolvidos na degradação de celulose, com relação à cepa selvagem.

Através da técnica de “microarrays” é possível estudar o comportamento transcricional de um grande número de genes, envolvidos em diferentes processos celulares e vias metabólicas ao mesmo tempo. Com este intuito, a expressão de 1.920 genes de *T. reesei* foi avaliada para determinar o efeito da mutação do gene *btf3*.

Na identificação das variações do nível transcricional dos genes do metabolismo primário, numa cultura do mutante contendo glicose, quando comparada com a cepa selvagem, observou-se o aumento da expressão de genes do metabolismo de carboidratos, lipídeos, aminoácidos e do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Estes resultados podem evidenciar a potencialização da expressão de genes já induzidos numa condição metabólica específica, provocada pelo aumento da atividade da RNA polimerase II pelo nocaute de *btf3*.

Sobre o papel desta proteína como membro do complexo NAC (“Nascent polypeptide complex”), relacionado ao enovelamento, proteção e direcionamento correto das cadeias nascentes de peptídeos dos ribossomos para as membranas das mitocôndrias e do retículo endoplasmático (Freire, 2005; Beatrix *et al.*, 2000; George *et al.*, 1998; Rospert *et al.*, 2002; Gautschi *et al.*, 2001), observou-se que a expressão das proteínas chaperonas DnaJ e DnaK (Hsp70), envolvidas neste processo de translocação, também foi induzida, aumento este que pode ser uma contrapartida do microorganismo à falta da proteína BTF3 no complexo NAC com o objetivo de manter os corretos enovelamento e direcionamento das novas cadeias polipeptídicas

nesse “background” genético. As proteínas de degradação protéica também foram induzidas, possivelmente para evitar o acúmulo de proteínas irreversivelmente desenoveladas.

Com relação à síntese de proteínas temos alguns fatores de tradução reprimidos, como fatores de alongação (*Elongation Factor 1-Alpha, Similarity To Elongation Factor 1 Gamma Subunit*) e o fator de início de tradução 1 (*eIF1 - Translation Initiation Factor 1*). Este último liga-se às cadeias nascentes de peptídeos, além de estimular mudanças conformacionais nos tRNAs para favorecer a alongação das cadeias nascentes. Também está envolvido em vários processos celulares, estimulando a proteólise, dependente de ubiquitina, de histonas H2A, actina e vários microtúbulos, componentes importantes na estrutura celular e durante a divisão celular (Hotokezaka, *et al.*, 2002). Pelos resultados apresentados (item 4.3.2) e o “microarray”, indicando que actina está mais expressa no mutante, podemos atribuir a indução do gene de actina à repressão do fator de início de tradução 1, reprimido no nocaute, como um efeito secundário da mutação do gene *Trbtf3*.

Outro fator de tradução alterado, mas desta vez induzido, foi o fator de início da tradução 2 (*Initiation Factor eIF-2*) que está relacionado à indução de genes envolvidos na resposta a estresses (Jiang *et al.*, 2003). Um efeito secundário desse fator é a ativação da transcrição de diversos genes envolvidos no processamento e secreção de proteínas. É possível que a indução observada da subunidade alfa de proteína G possa estar relacionada com a fosforização deste fator eIF-2 e sua ativação.

Na categoria de estrutura celular o gene da hidrofobina II, envolvido na formação da parede celular do fungo, e de uma proteína do citoesqueleto foram reprimidos, o que poderia explicar o menor crescimento do mutante em relação à cepa selvagem. Além disso, o gene do fator de transcrição ATF21 (*ATF/CREB-family transcription factor*) também foi reprimido. Essa proteína está envolvida na indução da divisão celular e da esporulação (Shiozaki & Russell,

1996). Cabe notar que também está envolvida no efeito da repressão por glicose (Nehlin *et al.*, 1992), sugerindo que a repressão de *atf21* faria com que os genes que estariam reprimidos por este fator transcricional, na condição de estudo com alta concentração de glicose, deixassem de sofrer tal repressão.

5.2 - Efeito do choque térmico sob a expressão gênica no mutante nocaute $\Delta Trbtf3$

Os fungos filamentosos têm a habilidade de responder rapidamente a mudanças ambientais, podendo adaptar-se a uma ampla diversidade de “habitats” por meio de mudanças no nível transcricional, induzindo ou reprimindo genes envolvidos em diferentes vias de degradação de fontes de carbono, e por sua propriedade de secretar uma abundante gama de enzimas, e outras proteínas, em seu meio ambiente capazes de degradar os mais complexos polímeros. Uma destas proteínas secretadas é a hidrofobina II (HFBII), proteína envolvida na morfogênese do fungo (Kershaw & Talbot, 1998; Wosten, 2001), constituindo parte da superfície da parede celular e de outras estruturas fúngicas (Wessels, 1994; McCabe & Alfen 1999). Em função de sua propriedade de agregação hidrofóbica, forma uma monocamada anfifílica que permite que o fungo possa suportar tensões entre o interior celular e o meio ambiente (Kershaw, 2005; Hakanpää *et al.*, 2004). No mutante nocaute $\Delta Trbtf3$, observamos na condição de choque térmico que este gene estava reprimido em comparação com a cepa selvagem. Os resultados do crescimento celular no mutante (item 4.3 e 4.4) indicaram que este crescia numa taxa menor comparada com a cepa selvagem, além de apresentar menor ramificação de suas hifas (Figura 11 e 12). Pelo previamente mencionado pode-se atribuir esses fatos à repressão do transcrito HFBII, que também está envolvida na formação e desenvolvimento das hifas aéreas, assim como de esporos (Vries *et al.*, 1999; VanWetter *et al.*, 1996; Kershaw, 2005; McCabe & Alfen 1999),

cabendo mencionar que uma outra característica fenotípica do mutante é a diminuição na produção de esporos (dado não apresentado).

Durante o choque térmico observou-se no mutante uma porcentagem maior de genes reprimidos envolvidos com a estrutura celular. Este fato, somado à repressão dos genes envolvidos na divisão celular como as histonas H2A, H2B, H3 e H4 e o gene que codifica a septina B, envolvida na formação dos septos das hifas, estaria indicando uma pausa na divisão celular provavelmente para economizar energia em função da utilização desta para indução de proteínas essenciais para a resposta ao o choque térmico. Comparativamente, na cepa selvagem a indução da proteína Sps2 específica da esporulação, assim como a repressão da septina B, e de alguns genes da parede celular podem evidenciar o início da esporulação, como um mecanismo de defesa e preservação do fungo ao estresse térmico.

Na categoria de defesa celular, como esperado, a resposta ao estresse se concentrou na indução das proteínas de choque térmico, a maioria deles com uma maior indução no mutante. A maioria das proteínas de choque térmico são chaperonas, ou chaperoninas, cuja função principal na resposta ao choque térmico é o de re-novelar as proteínas desnaturadas. HSP98 (Vassilev, *et al.*, 1992), tem a capacidade de desagregar os aglomerados de proteínas desnaturadas, que uma vez livres podem então ser renaturadas pela ação da Hsp70 e DnaJ (Gautschi *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2001; Schffol *et al.*, 1998). Cabe ressaltar que essas proteínas incluindo o peptídeo RCI foram induzidos como efeito da mutação no gene *btf3*, e foram elas mesmas quem tiveram a maior indução entre as chaperonas induzidas. De forma semelhante à indução da transcrição de genes envolvidos na degradação de proteínas, relacionada ao acúmulo de proteínas que tenham sido irreversivelmente afetadas, indica que a maquinaria de degradação protéica estava em pleno funcionamento durante a resposta a um estresse ambiental. Assim, foi verificada a indução de genes que codificam tanto proteases e peptidases. No nocaute se percebeu um maior número de

genes codificando proteases e peptidases, o que pode ser devido à ausência do complexo NAC, incorrendo em falhas no endereçamento de proteínas para o retículo endoplasmático e mitocôndrias (Funfschilling & Rospert, 1999; Lauring et al., 1995).

A indução observada da transcrição do gene da superóxido dismutase mitocondrial e a proteína tiorredoxina, proteína antioxidante, indica o aumento da concentração intracelular de $O_2^{\cdot-}$ associado ao choque térmico já descrito previamente (Bai, *et al.*, 2003). Cabe ressaltar que a tiorredoxina está implicada na formação de pontes dissulfeto em proteínas (Ross *et al.*, 2000; Periago *et al.*, 2002), provavelmente auxiliando no processo de re-enovelamento das proteínas desnaturadas.

Com relação às proteínas envolvidas na síntese de proteínas, podemos dizer que a mutação do gene *btf3*, na condição de choque térmico leva à repressão de um grande número genes de proteínas ribossomais, assim como de alguns fatores de tradução. Evidências da interação entre fatores de início da tradução e a proteína BTF3 foram mostradas pelos trabalhos experimentais de Freire (2005), propondo o papel de BTF3 na regulação na etapa de início da tradução, e na reciclagem de componentes do complexo de início da tradução.

Componentes das maquinarias de transcrição e processamento de RNA, além de diversos fatores de transcrição, tiveram a expressão de seus genes reprimida na cepa selvagem. Em divergência desses resultados, os genes dos fatores de transcrição do tipo “zinc finger” C2H2, componente Tra1 do complexo SAGA, o fator transcricional AMP cíclico dependente, o fator HAC1, tiveram regulação positiva no mutante, identificando-os como possíveis fatores que integrem a resposta ao choque térmico.

Em termos de sinalização celular, no mutante como na cepa selvagem, encontramos um número igual de genes de induzidos, relacionados com proteínas quinases, que pode ser vista

como uma resposta secundária do choque térmico, uma vez que as proteínas quinase têm um papel de regulador nas respostas a estresse (Thevelein & De Winde, 1999). Uma diferença marcante nesta categoria é a repressão no selvagem de dois genes codificando para “UbiquitinS/27 e Polyubiquitin 5”, e a indução no mutante de um gene que codifica para uma proteína G identificada como “ β -Transducin” (Lai *et al.*, 1990). Note-se que as proteínas de resposta ao choque térmico precisam ser fosforiladas para se tornarem ativas (Kukreja *et al.*, 2004; Grover, 2002).

Como resposta do metabolismo à condição de choque térmico, as funções anabólicas em termos de aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos foram negativamente afetadas no nível transcricional, nas duas cepas. Assim mesmo, os genes do metabolismo de carboidratos também se encontram induzido nas duas cepas. No entanto, no mutante observou-se uma maior indução de genes relacionados com o metabolismo de açúcares. Na cepa selvagem o metabolismo do piruvato através do ciclo de TCA encontra-se reprimido, direcionando o fluxo de piruvato para a acetaldeído, através da indução do gene que codifica para a enzima piruvato descarboxilase (PDC), a repressão do aldeído desidrogenase (ALD), levanta a possibilidade da formação de etanol. No mutante, em contraste à cepa selvagem, os genes envolvidos no ciclo de TCA encontram-se induzidos, mas PDC também encontra-se induzido, havendo então duas possibilidades de destino para o piruvato: formação de acetil-coA e/ou acetaldeído. Note-se que genes da via das pentoses-fosfato também foram induzidos nas duas cepas.

A resposta geral a estresses ambientais se distingue pela redução das funções celulares que demandam grandes quantidades de energia na forma de ATP em prol do desvio desse potencial energético para funções de proteção e / ou resgate de estruturas ou moléculas essenciais à vitalidade celular durante o transcorrer do estresse.

VI. CONCLUSÕES

Neste trabalho descrevemos a caracterização do clone TrEST-0186, anotado como um ortólogo do fator transcricional 3 da RNA polimerase II, supostamente envolvido na repressão de genes transcritos pela RNA polimerase II.

O seqüenciamento completo e análise computacional do clone TrEST-0186 confirmaram a anotação de *Trbtf3*, e a obtenção do locus genômico de *Trbtf3* indicou a presença de dois íntrons.

Pelas análises da indução do sistema celulolítico determinamos que o nocaute de *Trbtf3* induz a expressão dos genes *cbhI* e *cbhII*.

Através da técnica de “microarray” de cDNA foram identificados vários genes que são regulados diretamente pelo gene *Trbtf3*, e que por sua vez podem cumprir um papel importante na regulação de outros genes envolvidas na transcrição e na tradução. Entre eles destacamos os fatores trascricionais ATF21 e TRA1; os fatores de tradução eIF1 e eIF2; e as chaperonas HSP70 e DnaJ, entre outras.

Pela imensa bagagem de genes do metabolismo primário induzidos pelo nocaute na condição de choque térmico, podemos atribuir que a proteína BTF3 está envolvida diretamente na transcrição de genes transcritos pela RNA polimerase II. A confirmação poderia ser feita através de estudos de interação da proteína BTF3 com a RNA polimerase II.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que uma ampla variedade de genes envolvidos nas diversas vias metabólicas e funções celulares foi afetada pelo nocaute $\Delta Trbtf3$ durante a resposta ao choque térmico, sendo que o grande número de ESTs de genes desconhecidos responsivos a tal nocaute representa grande potencial para novas descobertas funcionais.

VII. REFERÊNCIAS

1. Altomare, C., Norvell, W.A., Björkman, T., Harman, G.E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl. Environ. Microbiol.* 65,2926-33.
2. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-10.
3. Aragão, F.J.L., Barros, L.M.G., Brasileiro, A.C.M., Riberio, S.G., Smith, F.D., Sanford, J.C., Faria, J.C., Rech, E.L. (1996). *Theoretical and Applied Genetics*, 93, 142-150.
4. Bai, Z., Harvey, L. *et al.* (2003). Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus *Aspergillus niger* B1-D. *Biotechnol Bioeng*, 83: 772-9.
5. Beatrix, B., Sakai, H., Wiedmann, M. (2000). The α and β Subunit of the Nascent Polypeptide-associated Complex Have Distinct Functions. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 37838-45.
6. Béguin, P. 1990. Molecular biology of cellulose degradation. *Annual Reviews of Microbiology*, 44: 219-248.
7. Béguin, P., Aubert, J. P. (1994). The biological degradation of cellulose. *FEMS Microbiol Rev*, 13, 25-58.
8. Beissinger, M., Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol Chem* 379: 245-259.
9. Biely, P., Tenkanen, M. (1998). Enzymology of hemicellulose degradation. Em: *Trichoderma & Gliocladium*. V.2. Editor: Gary E. Harman & Christian P. Kubicek. Editora: Taylor & Francis, London.
10. Bolar, J., Norelli, J. L., Wong, K.-W., Hayes, C. K., Harman, G. E., Aldwinckle, H. S. (2000). Increased resistance to scab of endochitinase transgenic McIntosh apple lines. *Phytopathology*, 90, 72-77.
11. Bonaccorsi, E.D. (2003). Regulação da expressão gênica por oxigênio em microrganismos eucariotos: Análises de ESTs ("Expressed Sequenced Tags") e 'microarrays' de cDNA de *Trichoderma reesei*. USP - Instituto de Química.
12. Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J.S., Chamberg, F., Ramos, A.S.P., Mantovani, M.C., Farah, J.P.S., Sorio, C.S., Gombert, A.K., Tonso, A., Hamza El-Dorry. (2006). Transcriptional Response of the Obligatory Aerobe *Trichoderma reesei* to Hypoxia and Transient Anoxia: Implications for Energy Production and Survival in the Absence of Oxygen. *Biochemistry*, 45, 3912 -3924.
13. Brendel, C., Gelman, L., Auwerx, J. (2002). Multiprotein bridging factor-1 (MBF-1) is a cofactor for nuclear receptors that regulate lipid metabolism. *Mol. Endocrinol*, 16,1367-77.
14. Brockstedt, E., Otto, A., Rickers, A., Bommert, K., Wittmann-Liebold, B. (1999). Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein. Chem.*, 18, 225-31.
15. Bukau, B., Deuerling, E., Pfund C., Craig, E. A. (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101: 119-122.

16. Carlson, M. (1999) Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2,202-7.
17. Casselton, L., Zolan, M. (2002). The art and desing of generic screens: filamentous fungi. *Nat. Rev. Genet.*, 3: 683-697.
18. Cech, T. R. (2000). Structural biology. The ribosome is a ribozyme. *Science* 289: 878-879.
19. Chambergo, F.S., Bonaccorsi, E.D., Ferreira, A.J.S., Ramos, A.S.P., Ferreira Jr., J.R., Abrahão-Neto, J., Farah, J.P.S., El-Dorry, H. (2002). Elucidation of the metabolic fate of glucose in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* using Expressed Sequence Tag (EST) analysis and cDNA microarrays. *J. Biol. Chem*, 277, 13983-8.
20. Champe, S. P., Nagle, D. L., Yager, L. N. (1994). Sexual Sporulation. Em: *Aspergillus: 50 years on*, eds. S.D. Martinelli and J.R. Kinghorn, Elsevier, Amsterdam, Program in *Industrial Microbiology*. 29: 429-454.
21. Chang, Y.-C., Chang, Y.-C., Baker, R. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Dis*, 70,145- 8.
22. Chen, D., Toone, W. (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*, 14, 214-29.
23. Cowing, D., Bardwell, J., Craig, E., Woolford, C., Hendrix, R., Gross, C. (1985). Consensus Sequence for *Escherichia coli* Heat Shock Gene Promoters. *PNAS*, 82: 2679-2683.
24. Cullen, D., Leong, S., Wilson, L., Henner, D. (1987). Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin resistance gene, *hph*. *Gene*, 57: 21-26.
25. Dahmus, M. (1995). Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1261: 171-182.
26. DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. (1997). Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 278, 680-6.
27. Dudoit, S., Yang, Y.H., Callow, M.J., Speed, T.P. (2000). Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. Technical report # 578, (<http://www.stat.berkeley.edu/users/terry/zaray/Html/matt.html>) (acesso em 25/03/2003)
28. Egyhazi, E., Ossoinak, A., Lee, J., Greenleaf, A., Makela, T., Pigon, A. (1998). Heat-Shock-Specific phosphorylation and transcriptional activity of RNA Polymerase II. *Experimental cell research*, 242: 211-221.
29. Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using *Phred*. I. Accuracy Assessment. *Genome Research*, 8: 175-185.
30. Freire, M.A. (2005). Translation initiation factor (iso) 4E interacts with BTF3, the β subunit of the nascent polypeptide-associated complex. *Gene*, 345: 271-277.
31. Ferreira, A.J.S. (2006) Regulação da resposta transcricional a estresses amnientais em fungos: Análise de “Microarray” de cDNAs de *Trichoderma reesei*.
32. Funfschilling, U., Rospert, S. (1999). Nascent Polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Molecular Biology of the Cell*, 10, 3289-99.

33. Gams, W., Bissett, J. (1998) Morphology and identification of *Trichoderma*. Em: *Trichoderma & Gliocladium*. V.1 Editor: Kubicek, C. & Harman, G. E. Editora: Taylor & Francis, London. 3-34.
34. Gautschi, M., Lilie, H., Fünfschilling, U., Mun, A., Rospert, S. (2001). RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK-DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 98, 3762-67
35. George, R., Beddoe, T., Landl, K., Lithgow, T. (1998). The yeast nascent polypeptide associated complex initiates protein targeting to mitochondria *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95, 2296-301.
36. Gerard, M., Fischer, L., Moncollin, V., Chipoulet, J.M., Chambon, P., Egly, J.M. (1991). Purification and interaction properties of the human RNA polymerase B(II) general transcription factor BTF2. *J. Biol. Chem.*, 266, 20940-5.
37. Goffeau, A., Barrell, B., Bussey, H. *et.al.* (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274: 546-567.
38. Gordon, D., Abajian, C., Green, P. (1998). A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*, 8, 195-202.
39. Grein, S., Pyerin, W. (1999). BTF3 is a potencial new substrate of protein kinase CK2. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 191: 121-128.
40. 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 cereviceae*. *Gene*, 25: 179-188.
41. Grover, A. (2002). Molecular biology of stress responses. *Cell*, 7:1-5.
42. Hakanpaa, J., Paananen, A., Askolin, S., Nakari-Setälä, T., Parkkinen, T., Penttilä, M., Linder, M.B., Rouvinen, J (2004). Atomic resolution structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. *J Biol Chem*, 279: 534-9
43. Haran, S., Schickler, H., Oppenheim, A. E Chet, I. (1996). Differential Expression of *Trichoderma harzianum* Chitinases During Mycoparasitism. *Phytopathology*, 86: 980-985.
44. Harman, G. E., Kubicek, C. P. (1998). *Trichoderma* and *Gliocladium*. V.2. Em: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Editora: Taylor & Francis, London. 96
45. Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295:1852-8.
46. 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. Microbio.*, 7, 515-21.
47. Hoffmann, Bernd; Valerius, Oliver; Andermann, Meike and Braus, Gerhard H. (2001). Transcriptional Autoregulation and Inhibition of mRNA translation of Amino Acid regulator Gene *cpcA* of Filamentous *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*. 12, 2846-2857.
48. Hotokezaka, Y., Többen, U., Hotokezaka, H., Leyen, K.V., Beatrix, B., Smith, D.S., Nakamura, T., Wiedmann, M. (2002). Interaction of the Eukaryotic Elongation Factor 1A with Newly Synthesized Polypeptides. *J. Biol. Chem.*, 277, 18545-51.

49. Hu, G.Z., Ronne, H. (1994) Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res*, 22, 2740-3.
50. Jäättelä, M., Wissing, D. (1992). Emerging role of heat shock proteins in biology and medicine. *Ann Méd*, 24: 249-58.
51. Jiang, H-Y., Wek, S.A., McGrath, B.C., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Cavener, D.R., Wek, R.C. (2003). Phosphorylation of the α -subunit of eukaryotic initiation factor 2 is required for activation of NF-kB in response to diverse cellular stresses. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 5651-5663.
52. Kershaw, M.J., Thornton, C.R., Wakley, G.E., Talbot, N.J. (2005). Four conserved intramolecular disulphide linkages are required for secretion and cell wall localization of a hydrophobin during fungal morphogenesis. *Molecular Microbiology*, 56: 117.
53. Kershaw, M.J., Talbot N.J. (1998). Hydrophobins and Repellents: Proteins with Fundamental Roles in Fungal Morphogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 23: 18-33.
54. Klein, D., Eveleigh, D.E. (1998) Ecology of *Trichoderma*. In *Trichoderma & Gliocladium*. v.1. p.57-74. Christian P. Kubicek and Gary E. Harman. eds.
55. 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*, 15: 7755-60.
56. Kukreja, R., Qian, Y.Z., Okubo, S., Flaherty, E. (2004). Role of protein kinase C and 72 kDa heat shock protein in ischemic tolerance following heat stress in the rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 195: 123-131.
57. Lai, R., Perez-Sala, D., Rando, R. (1990). The gamma subunit of transducin is farnesylated. *Proc Natl Acad Sci US A*, 87: 7673-77.
58. Lander, E.S., Linton, L.M. Birren, B., *et.al.* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409: 860-921.
59. Luring, B., Sakai, H., Kreibich, G., Wiesmann, M. (1995). Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92, 5411-15.
60. Lorito, M., Woo, S. L., Garcia, I., Colucci, G., Harman, G. E., Pintor-Toro, J. A., Filippone, E., Mucciflora, S., Lawrence, C. B., Zoina, A., Tuzun, S., Scala, F. (1998). Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.* 95, 7860-5.
61. Lottermann, A., Ranzolin, A., von Mühlen, C.A., Staub, H.L. (2003). Antibodies to Heat-Shock Proteins, Autoimmunity and Atherosclerosis. *Rev. Bras. Reumatol*, 43: 302-8.
62. Mandels, M., Reese, E.T. (1957). Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacterio.*, 73, 269-78.
63. Mantyla, A. L., K. H. Rossi, *et al.* (1992). Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant *Trichoderma longibrachiatum (reesei)* strains. *Curr Genet*, 21: 471-7.

64. Mantyla, A. L., Paloheimo, M., Suominen, P. (1998). Industrial mutants and recombinant strains of *Trichoderma reesei*. Em: *Trichoderma & Gliocladium*. V.2. Editor: Kubicek, C. & Harman, G. E. Editora: Taylor & Francis, London.
65. Matheucci, J.E. (1993). Clonagem e caracterização do gene da actina de *Trichoderma reesei*. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Bioquímica de Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
66. McCabe, P.M., Van Alfen, N.K. (1999). Secretion of Cryparin, a Fungal Hydrophobin. *Appl. Envir. Microbiol.*, 65: 5431 - 35.
67. Meyer, T.N., Da Silva, A.L. (1999). Resposta celular ao estresse. *Rev. Assoc. Med. Brás*, 45: 181-188.
68. Moncollin, V., Fischer, L., Cavallini, B., Egly, J-M., Chambon, P. (1992). Class II (B) general transcription factor (TFIIB) that bind to the template-committed preinitiation complex is different from general transcription factor BTF3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 397-401.
69. Nehlin, J.O., Carlberg, M., Ronne, H. (1992). Yeast SKO1 gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription. *Nucleic Acids Res*, 20, 5271-8.
70. Nidetzky, B., Hayn, M., Macarron, R., Steiner, W. (1993). Synergism of *Trichoderma reesei* cellulases while degrading different celluloses. *Biotechnological Letters*, 15 : 71-6.
71. Nidetzky, B., Steiner, W., Claeysens, M. (1994). Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: adsorptions of two cellobiohydrolases, two endocellulases and their core proteins on filter paper and their relation to hydrolysis. *Biochim J.* 303, 817-23.
72. Parker, C.S., Topol, J. (1984). Adrosophila RNA Polymerase II Transcription Factor Binds to the Regulatory site of an hsp 70 gene. *Cell*, 37: 273-283.
73. Parthun, M. R., Mangus, D. A., Jaehning, J. A. (1992). The EGD1 Product, a Yeast Homolog of Human BTF3, may be Involved in GAL4 DNA binding. *Molecular and Cellular Biology*, 12: 5683-5689.
74. Periago, P.M., Van Schaik, W., Abee, T., Wouters, J.A. (2002). Identification of proteins involved in the heat-stress response of *Bacillus cereus* ATCC14579. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 3486 – 95.
75. Pfeiffer *et al.*, 2001 Pfeiffer, T., Schuster, S., & Bonhoeffer, S. (2001) Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways. *Science*, 292, 504-507.
76. Potashkin, J., Wentz-Hunter, K., Callaci, J. (1996). BTF3 is evolutionarily conserved in fission yeast. *Biochim. Biophys. Act.*, 1308, 182-4.
77. Ronne, H. (1995) Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11, 12-17.
78. Rospert, S., Dubaquié, Y., Gautschi, M. (2002). Nascent-polymerase-associated complex. *CMLS, Cell. Mol. Life. Sci.*, 59: 1632-1639.
79. Ross, S., Findlay, V., Malakasi, P., Morgan, B. (2000). Thioredoxin Peroxidase Is Required for the Transcriptional Response to Oxidative Stress in Budding Yeast. *Molecular Biology of the cell*, 11: 2631-42.
80. Sambrook, J., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Guide. 2nd Edition, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

81. Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycology Research*, 100, 923-35.
82. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74,5463-7.
83. Santelli, R.V. & Navarro-Catapan, L., *Genetics and Molecular Biology*, 23 (1), 65-66 (2000).
84. Schoffl, F., Prandl, R., Reindl, A. (1998). Regulation of the Heat-Shock Response. *Plant. Physiol.* 117: 1135-1141.
85. Shi, Y., Mosser, D., Morimoto, R. (1998). Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. *Genes Dev*, 12:654-666.
86. Sheffield, W.P., Shore, G.C., Randall, S.K. (1990). Mitochondrial precursor protein. Effects of 70-kilodalton heat shock protein on polypeptide folding, aggregation, and import competence. *J Biol Chem.* 265:11069-11076.
87. Shiotani, H., Tusge, T. (1995). Efficient gene targeting in the filamentous fungus *Alternaria alternata*. *Mol. Gen. Genet.*, 248:142-150.
88. Shiozaki, K., Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes & Development*, 10, 2276-88.
89. Staben, C., Jensen, B., Singer, M., Pollock, K., Schechtman, M., Kinsey, J., Selker, E. (1989) Use of the bacterial Hygromycin B resistance gene as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa* transformation. *Fungal Genetics*, 36: 79-81.
90. Sung, D.Y., Vierling, E., Guy, C.L. (2001). Comprehensive Expression Profile Analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 Gene Family. *Plant Physiol.*, 126: 789-800.
91. Thevelein, J. M., De Winder, J.H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 33: 904-18.
92. Tseng, G.C., Oh, M.K., Rohlin, L., Liao, J. and Wong, W.H. (2001). Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. *Nucleic Acids Res*, 29, 2549-2557.
93. Van Wetter, M.A., Schuren, F., Schuurs, T., Wessels, J. (1996). Targeted mutation of the SC3 hydrophobin gene of *Schizophyllum commune* affects formation of aerial hyphae. *FEMS Microbiology Letters*, 140: 265-269.
94. Vassilev, A. O., N. Plesofsky-Vig, *et al.* (1992). Isolation, partial amino acid sequence, and cellular distribution of heat-shock protein hsp98 from *Neurospora crassa*. *Biochim Biophys Acta*, 1156:1-6.
95. Vaulont, S.; Vasseur-Cognet, M. and Kahn, A. 2000. Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem.* Oct 13; 275 (41): 31555-8.
96. Vries, O., Moore, S., Arntz, C., Wessels, J., Tudzynski, P. (1999). Identification and characterization of a tripartite hydrophobin from *Claviceps fusiformis*. A novel type of class II hydrophobin. *Eur. J. Biochem.* 262, 377-385.

97. Wainwright, M. (1993). Oligotrophic growth of fungi – stress or natural state?. Em: Stress Tolerance of Fungi. Editor: Jennings, D.H. Editora: Mercel Dekker, New York. *Apud*
98. Walsh, G.A., Power, R.F., Headon, D.R. (1993). Enzymes in the animal-feed industry. *Trends Biotechnol.* 11, 424-30.
99. Wegrzyn, R., Hofmann, D., Merz, F., Nikolay, R., Rauch, T., Deuerling E. (2006). A Conserved Motif Is Prerequisite for the Interaction of NAC with Ribosomal Protein L23 and Nascent Chains. *J. Biol. Chem.*, 281: 2847-2857.
100. Wessel, J. (1994). Developmental regulation of fungal cell wall formation. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32: 413-437.
101. Whitby, M.C., Dixon, J. (2001). Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J. Mol. Biol.*, 306, 703-16.
102. Wiedmann, M., Sakai, H., Davis, T.A., Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature*, 370: 434-440.
103. Wood, P.S., Bhat, K.M. (1988). Methods for measuring cellulase activities. *Meth. Enzymol.* 160: 87-112.
104. Wosten, H. (2001). Hydrophobin: multipurpose proteins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55: 625-646.
105. Wynn, R.M., Davie, Jr, Cox, R.P., Chuang, D.T. (1994). Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. *J Lab Clin Med*, 124: 31-6.
106. Yotov, W.V., Moreau, A., ST-Arnaud, R. (1998). The Alpha Chain of the Nascent Polypeptide-Associated Complex Functions as a Transcriptional Coactivator. *Molecular and Cellular Biology.* 18: 1303-1311.
107. Zaragoza O., Vincent O., Gancedo J.M. (2001). Regulatory elements in the FBP1 promoter respond differently to glucosedependent signals in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. J.*, 359, 193-201.
108. Zeng, Q., Morales, A., Cottarek, G. (2001). Fungi and humans: closer than you think. *Trends Genet.*, 17: 682-684.
109. Zheng, X.M., Black, D., Chambon, P., Egly, J.M. (1990). Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature*, 344: 556-559.
110. Zheng, X.M., Moncollin, V., Egly, J.M., Chambon, P. (1987). A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell*, 50, 361-8.
111. Zou, J., Gou, Y., Guettouche, T., Smith, D.F., Voellmy, R. (1998). Repressao of the heat shock transcription factor HSF1 activation by Hsp90 (Hsp 90 complex) that forms a stress-sensitive complex with HSF1. *Cell*, 94, 471-480.

APENDICE

Tabela 3: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi reprimida significativamente pela mutação $\Delta Trbt3$.

Função	Sub-Função	ID Clone	Identificação
<u>Sinalização celular</u>	<i>Modificação protéica</i>	TrEST-A783	<i>Related To Glc8 Protein Regulator</i>
<u>Estrutura celular</u>	<i>Citoesqueleto</i> <i>Parede celular</i>	TrEST-A1013 TrEST-A1272 TrHFB2	<i>Cytoskeletal Protein</i> <i>Hydrophobin II Precursor</i> <i>Hydrophobin II</i>
<u>Síntese protéica</u>	<i>Proteínas ribossomais</i> <i>Fator de tradução</i>	TrEST-B28A06 TrEST-A248 TrEST-A3417 TrEST-B15B07 TrEST-B17H05 TrEST-A1101	<i>related to 40S ribosomal protein L9, mitochondrial precursor</i> <i>Elongation Factor 1-Alpha</i> <i>Translation Initiation Factor Eif1</i> <i>Translation Initiation Factor 3 Subunit 7 Homolog</i> <i>Similarity To Elongation Factor 1 Gamma Subunit</i> <i>ATF/CREB-family transcription factor atf2 1 - fission yeast</i>
<u>Síntese RNA</u>	<i>Fator de transcrição</i>	TrEST-A1101	
<u>Metabolismo</u>	<i>Energia e ciclo de TCA</i>	TrEST-B19C03 TrEST-B25G04 TrKDH	<i>Cytochrome C Oxidase Polypeptide V Precursor</i> <i>Citrate Synthase</i> <i>Alpha Ketoglutarate Dehydrogenase</i>
-	<i>Açúcares e glicólise</i>	TrARAB TrEDGLIV	<i>ARAB</i> <i>endo-beta-1,4-gluconase</i>
-		TrEST-A750	<i>Xylosidase / arabinosidase</i>
-	<i>Transporte</i>	TrEST-A386 TrEST-B06A05 TrPKT1	<i>Potassium Transporter</i> <i>MDR-Like ABC Transporter</i> <i>PKT1</i>
<u>Não classificados</u>	<i>Não classificados</i>	TrEST-A3497 TrEST-A539 TrEST-B43C07 TrEST-B20E09	<i>putative protein transport protein</i> <i>PREDICTED: Similar To Rrna Intron-Encoded Homing Endonuclease</i> <i>Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase</i> <i>Simply Not Fertile; U2 snRNP B1Protein; Splicing Necessary Factor</i>
<u>Outros genes</u>	<i>Outros genes</i>	TrEST-A922	<i>Haemolysin-III family protein</i>
<u>Desconhecidos</u>	<i>Relacionado a ORFs putativas</i>	TrEST-A1591 TrEST-A2336 TrEST-A2343 TrEST-A3685 TrEST-A4182 TrEST-A992 TrEST-B23E02 TrEST-B24E02 TrEST-B43B03 TrEST-B44F09 TrEST-A1738 TrEST-A413 TrEST-B17D01	<i>Hypothetical Protein FG02512.1</i> <i>Hypothetical Protein MG00602.4</i> <i>Hypothetical Protein</i> <i>Hypothetical Protein</i> <i>Hypothetical Protein)</i> <i>Hypothetical Protein MG07696.4</i> <i>Hypothetical Protein</i> <i>Hypothetical Protein FG10848.1</i> <i>Hypothetical Protein</i> <i>Hypothetical Protein FG04232.1</i> <i>Hypothetical Protein FG02244.1</i> <i>Hypothetical Protein FG01047.1</i> <i>Hypothetical Protein FG01228.1</i>

Função	Sub-Função	ID Clone	Identificação
<u>Desconhecidos</u>	<i>Relacionado a ORFs putativas</i>	TrEST-B19E03 TrEST-B14D12	<i>Hypothetical Protein FG06558.1 Hypothetical Protein FG04401.1</i>
<u>Desconhecidos</u>	<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-A1023 TrEST-A113 TrEST-A1263 TrEST-A175 TrEST-A2139 TrEST-A2315 TrEST-A3717 TrEST-A546 TrEST-A719 TrEST-B06D11 TrEST-B07F07 TrEST-B08A03 TrEST-B08F12 TrEST-B19A09 TrEST-B20F02 TrEST-B21B07 TrEST-B24E06 TrEST-B24H05 TrEST-B25A06 TrEST-B36C11 TrEST-B41C09 TrEST-B41F06 TrEST-B41F11 TrEST-A1753 TrEST-B24E09	<i>Not Match Not Match Not Match No Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match No Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match Not Match</i>

Tabela 4: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi induzida significativamente pela mutação $\Delta Trbtf3$.

Função	Sub-Função	ID Clone	Identificação
<u>Defesa celular</u>	Detoxificação	TrEST-A3955	succinyl-coa:3-ketoacid-coa transferase precursor
		TrEST-A2590	antioxidant protein LsfA
	Resposta a estresse	TrEST-A696	Hsp70 Chaperone , Putative
		TrEST-A3124	related to DNAJ-like protein homolog
		TrEST-A191	stress response RCI peptide
		TrEST-A2341	Probable Dnaj-Like Heat-Shock Protein
<u>Divisão celular</u>	Ciclo celular	TrEST-A139	Related To Cell Cycle Regulation And Aging Protein
	Estrutura do cromossomo	TrEST-A933	Histone Chaperone , Putative
<u>Sinalização celular</u>	Transdutores intracelulares	TrEST-A1694	G protein alpha subunit
<u>Estrutura celular</u>	Citoesqueleto	TrEST-A3050	Tubulin Alpha-2 Chain
<u>Metabolismo</u>	Parede celular	TrEST-A2106	glycosyl transferase, putative
	Aminoácidos	TrEST-A127	S-Adenosylmethionine synthetase
		TrEST-A2008	chorismate synthase
		TrEST-A2908	Glycine cleavage system T protein
		TrEST-A4205	Probable glycine decarboxylase P subunit
	Cofactor	TrEST-A365	thiazole biosynthetic enzyme precursor
	Energia e ciclo de TCA	TrND4	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 4
		TrEST-A960	ATP-Citrate Synthase Subunit 1 -Lyase 1
		TrEST-A3975	Alternative oxidase precursor
		TrEST-A3931	probable electron transfer flavoprotein
	Lipídeos	TrEST-A2899	succinate dehydrogenase
		TrEST-A3734	Flavohemoglobin
		TrEST-A4222	short chain dehydrogenase/reductase family
		TrEST-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha
	Açúcares e glicólise	TrEST-A1302	Putative acyl-CoA dehydrogenase
		TrEST-A554	glycogen synthase
		TrEST-A2312	putative mannose-1-phosphate guanylttransferase
		TrEST-A1305	Fructose-1,6-biphosphate aldolase

Função	Sub-Função	ID Clone	Identificação
<u>Metabolismo</u>	Açúcares e glicólise	TrGAL1	Galactokinase
		TrTKL	Transketolase
		TrEST-A3059	Enolase
		TrEDGL4	Endoglucanase IV
		TrEST-B08D01	Pyruvate kinase
	Outros genes	TrGLYP	Sugar GLYP
<u>Síntese protéica</u>	Sinalizadores e modificações protéicas	TrEST-A1647	hnRNP arginine n-methyltransferase
		TrEST-A3985	Beta-Transducin
		TrEST-A862	Beta Transducin
	Degradação protéica	TrEST-A4172	related to endosomal Vps protein complex subunit
		TrEST-A4013	Serine-type carboxypeptidase homolog precursor
		TrEST-A4200	Subtilisin-like protease PR1D
		TrEST-A1193	putative aminopeptidase
		TrEST-A41	Vacuolar Protease A Precursor
		TrEST-A1821	Autophagy-related ubiquitin-like modifier Atg-8
	Proteínas ribossomais	TrEST-A3798	40S ribosomal protein S27
		TrEST-A1881	similar to ribosomal protein S24 isoform 3 isoform 1
		TrEST-A3628	Ribosomal Protein L2a
		TrEST-A632	40S ribosomal protein S9
		TrEST-A712	60S ribosomal protein L44
	Fator de tradução	TrEST-A521	Translation Initiation Factor eIF-2 Family
	Síntese / metabolismo de tRNA	TrEST-A134	Chain A, Aspartyl tRNA Synthetase
<u>Síntese RNA</u>	RNA polimerasa	TrEST-A3333	Probable DNA-Directed RNA Polymerase III Second-Largest Chain
	Processamento do RNA	TrEST-A3909	small nuclear ribonucleoprotein smd1
	Fator de transcrição	TrEST-A3522	related to the component Tra1 of the SAGA complex
<u>Outros genes</u>	Outros genes	TrEST-A4264	Related to ATROPHIN-1
		TrEST-A3405	Putative phosphoketolase
		TrEST-A1116	Nonribosomal peptide synthetase; NRPS
		TrEST-A1902	Aldo/keto reductase family oxidoreductase

Função	Sub-Função	ID Clone	Identificação
<u>Não classificados</u>	<i>Não classificados</i>	TrEST-A3338	<i>Putative Salicylate Hydroxylase</i>
		TrEST-A690	<i>Related to Tol Protein - N. crassa Emb[CAB98221.1]</i>
		TrEST-A79	<i>Ysa1 Protein</i>
	<i>Outros genes</i>	TrEST-A1890	<i>Related To PUTATIVE TARTRATE TRANSPORTER</i>
		TrEST-A896	<i>putative senescence-associated protein</i>
		TrEST-A1576	<i>conserved Hypothetical Protein</i>
<u>Desconhecidos</u>	<i>Relacionados a ORFs putativas</i>	TrEST-A1688	<i>Hypothetical Protein MG09211.4</i>
		TrEST-A522	<i>Predicted protein</i>
		TrEST-A2321	<i>Hypothetical Protein MG03691.4</i>
		TrEST-A1151	<i>Hypothetical Protein c12c2.03c</i>
		TrEST-A2597	<i>Hypothetical Protein FG00260.1</i>
		TrEST-A334	<i>Hypothetical Protein FG09552.1</i>
		TrEST-A2577	<i>Hypothetical Protein</i>
		TrEST-A2755	<i>Hypothetical Protein</i>
		TrEST-A802	<i>Predicted protein</i>
		TrEST-A854	<i>Hypothetical Protein MG05065.4</i>
		TrEST-A2618	<i>Hypothetical Protein FG01267.1</i>
		TrEST-A2593	<i>Predicted protein</i>
		TrEST-A3377	<i>Hypothetical Protein MG05574.4</i>
		TrEST-A3651	<i>Hypothetical Protein FG06162.1</i>
		TrEST-A2559	<i>conserved Hypothetical Protein</i>
<u>Desconhecidos</u>	<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-A2170	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3499	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3926	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3842	<i>Not Match</i>
		TrEST-A2897	<i>Not Match</i>
		TrEST-A4109	<i>No Match</i>
		TrEST-A3016	<i>Not Match</i>
		TrEST-A142	<i>Not Match</i>
		TrEST-A1795	<i>Not Match</i>

Função	Sub-Função	ID Clone	Identificação
<u>Desconhecidos</u>	<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-A760	<i>Not Match</i>
		TrEST-A2546	<i>Not Match</i>
		TrEST-A156	<i>Not Match</i>
		TrEST-A1083	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3612	<i>Not Match</i>
		TrEST-A1658	<i>Not Match</i>
		TrEST-A68	<i>Not Match</i>
		TrEST-A822	<i>No Match</i>
		TrEST-A2002	<i>No Match</i>
		TrEST-A3457	<i>Not Match</i>
		TrEST-A2578	<i>No Match</i>
		TrEST-A246	<i>Not Match</i>
		TrEST-A1805	<i>Not Match</i>
		TrEST-A1569	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3031	<i>Not Match</i>
		TrEST-A994	<i>Not Match</i>
		TrEST-A2326	<i>Not Match</i>
		TrEST-A2525	<i>No Match</i>
		TrEST-A1078	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3470	<i>Not Match</i>
		TrEST-A3752	<i>Not Match</i>
		TrEST-A2159	<i>Not Match</i>
		TrEST-A430	<i>Not Match</i>
		TrEST-A1077	<i>Not Match</i>

Tabela 6: Dados de expressão do experimento de choque térmico a 40°C da cepa selvagem QM9414 e o mutante $\Delta Trbtf3$ de *T. reesei*. Os clones de TrEST / genes de *T. reesei* estão agrupados segundo a função celular em que foram anotados . Os dados de anotação apresentados são a identificação do clone, o código de acesso para a sequência similar mais relevante e o organismo da qual proveio. Os dados de expressão são os valores de logaritmo, na base 2, da razão das fluorescências normalizadas (M). Para o selvagem (wt) e o mutante $\Delta Trbtf3$ (btf): 1 (referencia, a 28°C), 2 (15min. a 40°C), 3 (30min. a 40°C), 4 (60min. a 40°C) e 5 (60min. após o retorno a 28°C).

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
Defesa Celular												
Destoxificação	TrEST-A3343	Superoxide dismutase , mitochondrial precursor	0,00	0,45	0,68	0,10	0,82	0,00	0,25	1,21	1,88	2,33
	TrEST-A3699	Related To Phenol 2-Monooxygenase	0,00	-1,61	-1,82	-1,10	-1,21	0,00	-0,22	-1,39	-0,90	-0,14
	TrEST-A620	Related to glyoxal oxidase precursor	0,00	-0,21	-0,14	-0,70	1,60	0,00	-1,42	-1,53	-1,10	1,46
	TrEST-A4158	related to glyoxal oxidase precursor	0,00	-0,26	-0,68	-0,29	0,38	0,00	-1,14	-1,21	-1,27	-0,65
	TrEST-A1697	heavy metal ion transporter, putative	0,00	1,83	1,84	1,70	1,75	0,00	0,80	1,18	1,30	2,43
	TrEST-A307	Cytochrome P450	0,00	-0,02	-0,03	0,55	0,04	0,00	0,51	0,28	1,10	1,94
	TrEST-A2590	antioxidant protein LsfA	0,00	0,02	-0,27	-0,91	1,06	0,00	0,46	2,08	1,15	0,95
Resposta a estesse	TrEST-A2891	t-complex protein 1, eta subunit	0,00	-0,75	-0,01	-0,40	-0,60	0,00	0,13	0,96	1,35	-0,47
	TrEST-A191	stress response RCI peptide	0,00	0,95	1,10	0,73	0,89	0,00	6,07	3,27	3,92	0,54
	TrEST-B16D11	related to Hsp90 associated co-chaperone	0,00	1,47	1,27	0,95	-1,13	0,00	1,47	2,11	1,79	0,40
	TrEST-A3005	Related To DNAJ-Like Protein Homolog	0,00	0,21	0,21	0,14	0,55	0,00	1,49	0,82	1,02	0,64
	TrEST-A3124	related to DNAJ-like protein homolog	0,00	0,13	-0,15	0,00	-0,30	0,00	0,82	1,62	1,29	-0,26
	TrEST-A496	Probable Heat-Shock Protein Hsp60	0,00	1,17	1,10	0,44	-0,50	0,00	0,53	1,77	1,14	0,33
	TrEST-A2012	Probable DnaJ-like heat-shock protein	0,00	0,42	0,95	-0,06	-0,20	0,00	1,68	1,68	1,68	-0,56
	TrEST-A2341	Probable Dnaj-Like Heat-Shock Protein	0,00	0,97	0,96	0,91	-0,11	0,00	3,05	4,35	2,65	-0,07
	TrEST-A2428	Molecular chaperone Hsp90	0,00	2,39	2,01	0,80	0,08	0,00	3,10	2,49	1,49	1,50
	TrEST-A2568	Hypoxia-inducible gene 1	0,00	1,17	1,14	0,43	0,36	0,00	0,14	1,26	1,34	-0,31
	TrEST-A696	Hsp70 Chaperone , Putative	0,00	0,83	0,93	0,93	1,02	0,00	0,99	2,56	2,10	0,97
	TrEST-A4	Heat shock protein Hsp98	0,00	3,45	1,46	0,60	-0,12	0,00	4,84	2,18	2,39	-0,91
	TrEST-A1750	Heat Shock Protein HSP1	0,00	1,56	1,72	1,49	1,71	0,00	0,15	1,86	1,87	-0,06
	TrEST-A74	heat shock protein CLPA	0,00	0,37	0,41	0,15	-0,91	0,00	4,35	2,19	1,82	-0,81
	TrEST-A3968	Heat shock protein 70 kDa	0,00	1,06	0,04	0,01	1,14	0,00	2,44	3,77	3,09	1,16
	TrEST-A3340	30 kDa heat shock protein	0,00	1,81	2,00	2,24	1,16	0,00	6,11	3,21	3,84	0,50
	Divisão Celular											
Ciclo celular	TrEST-A139	Related To Cell Cycle Regulation And Aging Protein	0,00	0,50	0,46	0,69	1,59	0,00	-0,80	-1,15	-1,11	-0,03
	TrEST-A4187	hypothetical 36.8 KD protein C26A3.16 in chromosome I	0,00	0,45	0,89	0,05	-0,67	0,00	0,06	-1,98	-1,10	-0,05
	TrEST-A415	Cell Division Control Protein Cdc48	0,00	1,09	0,47	0,26	-1,29	0,00	-0,21	-1,09	-0,25	0,10
	TrEST-A423	TPA: checkpoint forkhead associated with RING 2	0,00	-0,47	-0,65	0,47	-0,19	0,00	-0,64	-0,13	-1,35	1,82
	TrEST-A1043	Septin B	0,00	-0,40	-0,98	-0,74	0,85	0,00	-0,80	-1,39	-1,14	0,01

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Ciclo celular</i>	TrEST-A4267	cell division control protein 2	0.00	0.58	0.70	1.22	-0.62	0.00	-1.30	-1.35	-1.81	-1.40
	TrEST-B08B02	Putative nucleosome binding protein	0.00	-0.83	-0.18	-0.70	0.80	0.00	-0.15	-1.05	-1.02	1.29
<i>Estruturas dos cromossomos</i>	TrEST-A2090	Histone H2B	0.00	-0.62	-0.97	-0.52	0.83	0.00	-0.29	-1.54	-1.42	0.19
	TrEST-A2858	Histone H4	0.00	-0.98	-0.93	-0.84	0.25	0.00	-0.39	-1.07	-0.96	-0.51
	TrEST-A1561	Histone H3	0.00	0.51	-0.48	-0.99	-0.91	0.00	-0.65	-1.22	-1.07	-0.49
	TrEST-B07C05	histone H2A	0.00	-0.91	-0.99	-0.84	0.34	0.00	-1.03	-1.09	-0.87	-0.25
<u>Sinalização Celular</u>												
<i>Modificação proteica</i>	TrEST-A1661	Probable Dis1-Suppressing Protein Kinase Dsk1	0.00	2.40	0.76	1.77	0.38	0.00	0.62	2.44	1.35	0.29
	TrEST-A783	Related To Glc8 Protein Regulator)	0.00	1.81	1.22	0.50	0.21	0.00	0.58	1.08	1.09	-0.27
	TrEST-A2346	Ran1-like protein kinase	0.00	1.27	1.07	0.44	0.43	0.00	3.61	4.67	3.49	-0.19
	TrEST-A880	serine threonine protein kinase SNF1	0.00	0.64	0.85	0.02	-0.82	0.00	-1.12	-1.11	-1.26	-0.70
	TrEST-A194	RIM15 Is Glucose-Represe	0.00	0.42	1.12	0.64	-0.16	0.00	-0.78	-0.40	-1.18	-1.10
	TrEST-A475	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit	0.00	0.28	0.15	1.26	0.61	0.00	1.11	1.82	0.23	-0.85
	TrEST-A1058	Calnexin	0.00	-0.21	-0.19	-0.20	-0.44	0.00	0.09	1.18	2.05	0.05
	TrEST-A3568	putative histidine kinase M27Mp	0.00	-0.96	-1.17	-0.90	0.68	0.00	-0.44	-1.38	-1.19	0.80
	TrEST-A2774	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase	0.00	-1.92	-1.52	-1.93	-0.46	0.00	1.02	1.00	0.32	1.16
<i>Proteínas de transporte</i>	TrEST-A1513	Putative transport protein	0.00	1.02	0.82	1.15	1.10	0.00	1.22	1.89	1.56	-0.67
<u>Estrutura celular</u>												
<i>Parede celular</i>	TrEST-A2106	Putative glycosyl transferase	0.00	1.41	1.33	0.20	-0.31	0.00	1.28	1.03	0.34	0.58
	TrEST-A3142	N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase ,	0.00	1.17	0.75	0.47	0.01	0.00	1.07	1.06	1.06	-0.07
	TrHFB2	Hydrophobin II (Y11894) (T. reesei)	0.00	0.82	1.55	0.90	0.23	0.00	-1.09	-1.09	-0.64	1.07
	TrEST-A3472	Putative cell wall glucanase	0.00	0.71	2.04	1.03	-0.65	0.00	3.08	1.03	1.33	0.28
	TrEST-A3572	soluble cell wall protein	0.00	0.55	0.72	0.78	0.76	0.00	-0.33	-1.02	-1.10	0.88
	TrHFB1	HFB1	0.00	0.47	0.75	0.51	0.03	0.00	-0.61	-1.03	-0.86	-1.06
	TrEST-A1272	Hydrophobin II Precursor	0.00	0.17	-0.73	-1.69	-0.97	0.00	-1.17	-1.72	-1.94	0.14
<i>Citoesqueleto</i>	TrEST-B14C12	Actin	0.00	0.24	-0.15	-0.22	-0.36	0.00	1.22	1.08	0.13	0.56
	TrEST-B36H05	Tubulin Beta-2 Chain	0.00	-0.51	-0.26	-0.34	-0.53	0.00	-1.02	-1.67	-1.15	-0.36
<i>Ciclo celular</i>	TrEST-A4267	cell division control protein 2	0.00	0.58	0.70	1.22	-0.62	0.00	-1.30	-1.35	-1.81	-1.40
<u>Metabolismo</u>												
<i>Aminoácidos</i>	TrEST-A3986	probable carbamoyl-phosphate synthase N.crassa	0.00	2.65	0.88	-0.12	-0.28	0.00	1.43	2.25	3.08	-0.03
	TrEST-B33G12	Putative thiosulfate sulfurtransferase	0.00	2.01	1.95	0.56	1.93	0.00	-0.81	-1.63	-1.14	-0.19
	TrEST-A758	Probable glycine decarboxylase P subunit	0.00	0.54	1.11	0.82	-0.08	0.00	-2.07	-1.43	-0.79	-0.20
	TrEST-A2162	Putative aspartate transaminase	0.00	0.49	-0.52	-0.89	0.33	0.00	0.25	-1.05	-1.14	0.52
	TrEST-A2008	chorismate synthase	0.00	0.38	0.78	0.34	0.24	0.00	0.67	1.46	0.75	1.24
	TrEST-A1230	Putative serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial	0.00	0.30	0.21	0.05	0.29	0.00	-1.18	-1.01	-0.83	0.41

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Aminoácidos</i>	TrEST-A886	putative histidine biosynthesis bifunctional amidotransferase	0.00	0.25	0.11	0.56	-0.74	0.00	-1.08	-1.26	-0.10	-0.02
	TrEST-A1744	serine hydroxymethyltransferase	0.00	0.25	0.42	0.31	0.32	0.00	0.64	1.18	1.11	0.75
	TrEST-A2908	Glycine cleavage system T protein	0,00	-0,01	0,54	0,13	0,33	0,00	1,41	0,43	0,94	1,25
	TrEST-A206	putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate	0,00	-0,16	-0,43	-1,06	-1,11	0,00	0,68	1,19	0,63	1,44
	TrEST-A3669	2-Isopropylmalate synthase	0,00	-0,35	-0,20	-0,51	0,35	0,00	0,94	0,74	1,37	1,13
	TrEST-B21C05	Cobalamin-independent methionine synthase	0,00	-0,58	-0,73	-0,58	0,32	0,00	-0,46	-1,06	-1,04	-0,18
	TrEST-A61	probable branched-chain amino acids aminotransferase	0,00	-2,04	-2,38	-0,62	-1,55	0,00	-1,48	-0,94	-1,48	0,43
	TrEST-A4205	Probable glycine decarboxylase P subunit	0,00	-2,10	-1,04	-0,14	-0,41	0,00	-0,65	-1,01	-1,03	-0,27
<i>Cofactor</i>	TrEST-A3414	probable coproporphyrinogen III oxidase	0,00	0,67	0,63	0,59	-0,18	0,00	-0,38	-1,04	-1,53	0,95
	TrEST-A713	probable pyridoxamine 5'-phosphate oxidase - fission yeast	0,00	0,15	0,11	0,07	0,59	0,00	-0,28	-1,50	-2,72	-0,56
	TrEST-A231	Pyridoxine biosynthesis protein PDX1	0,00	-0,96	-1,01	-0,81	-0,92	0,00	0,63	1,04	1,08	1,15
<i>Energia e Ciclo de Krebs</i>	TrEST-A3975	Alternative oxidase precursor	0,00	0,92	0,18	0,60	-0,26	0,00	1,08	1,16	0,83	0,46
	TrKDH	Alpha Ketoglutarate Dehydrogenase	0,00	0,78	0,15	0,40	-0,59	0,00	1,08	1,41	0,37	-0,31
	TrMDH	Malate Dehydrogenase (T. reesei)	0,00	-0,65	-0,15	-0,01	0,96	0,00	1,09	1,10	0,78	-0,43
	TrEST-A169	Malate Dehydrogenase	0,00	-0,60	-0,64	0,01	-0,37	0,00	0,73	1,43	1,34	0,34
	TrEST-A2899	succinate dehydrogenase	0,00	0,59	0,54	0,55	1,56	0,00	0,58	1,05	2,78	-0,74
	TrEST-A3912	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0,00	0,54	0,01	0,01	-0,43	0,00	1,12	1,07	1,14	-0,30
	TrALD2	Aldehyde dehydrogenase 2	0,00	0,53	0,21	-0,01	0,33	0,00	1,09	1,30	0,04	0,24
	TrEST-B19C03	Cytochrome C Oxidase Polypeptide V Precursor	0,00	0,41	0,24	-0,01	-1,11	0,00	1,03	1,18	0,36	-0,20
	TrCOX2	Cytochrome C Oxidase 2	0,00	0,39	0,02	0,28	0,36	0,00	0,89	1,35	1,19	0,37
	TrEST-A3734	Flavohemoglobin	0,00	0,37	0,08	-0,14	-0,97	0,00	0,13	1,42	1,05	0,23
	TrFUM	Fumarase (T. reesei)	0,00	0,32	-0,99	-0,12	0,00	0,00	1,23	1,99	0,56	-0,90
	TrATP9	ATP Synthase Protein 9	0,00	0,32	0,14	0,03	0,24	0,00	0,87	1,18	1,63	-0,10
	TrACO	Aconitase	0,00	0,29	0,29	0,19	0,30	0,00	1,13	1,08	0,31	-0,56
	TrEST-A2977	Putative pyruvate decarboxylase	0,00	0,36	0,93	0,75	-0,19	0,00	0,23	1,04	0,95	1,28
	TrEST-A954	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing	0,00	-0,09	0,02	0,05	-1,09	0,00	0,49	1,56	1,30	0,50
	TrEST-A1190	Malate Dehydrogenase	0,00	-0,34	-0,39	-0,69	-0,82	0,00	1,14	1,17	0,63	0,23
	TrEST-A4311	ATP synthase protein 9	0,00	-0,46	-0,37	-0,41	1,33	0,00	0,25	2,47	0,13	0,13
	TrADH	Alcohol Dehydrogenase	0,00	-0,68	-0,42	-0,29	0,12	0,00	-0,61	-0,96	-1,04	-0,39
	TrEST-B18H08	Dihydrolipoamide Succinyltransferase	0,00	-1,14	-1,04	-1,12	0,63	0,00	0,49	0,96	1,03	-1,12
	TrEST-A857	2-methylcitrate synthase, mitochondrial precursor NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Chain 5 (AAL74165) (T. reesei)	0,00	-1,46	-1,09	-0,24	-1,21	0,00	1,01	0,73	0,96	0,01
	TrND5		0,00	-1,77	-0,42	-0,02	-0,66	0,00	1,09	1,45	1,25	0,48
	TrGND	6-Phosphogluconate Dehydrogenase	0,00	1,27	0,27	-0,01	0,36	0,00	0,86	1,62	1,24	-1,25
	TrPCK	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (T. reesei)	0,00	0,38	0,73	0,94	-0,13	0,00	1,17	1,43	0,94	0,30
<i>Lipídeos</i>	TrEST-A4303	Oleate delta-12 desaturase	0,00	1,56	1,52	0,81	-0,41	0,00	1,24	1,22	1,06	0,29
	TrEST-A2844	serine palmitoyltransferase 2	0,00	0,96	0,31	1,00	0,46	0,00	0,05	1,56	1,15	1,18
	TrEST-A3469	Eburicol 14 Alpha Demethylase	0,00	0,91	0,65	0,21	-0,37	0,00	1,35	2,69	0,19	0,03
	TrEST-A4057	related to SREBP cleavage activating protein	0,00	0,48	1,40	2,66	3,38	0,00	0,08	1,68	2,20	1,68

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Lipídeos</i>	TrEST-A1302	Putative acyl-CoA dehydrogenase	0,00	0,38	0,78	1,17	0,10	0,00	-0,76	-0,90	-1,20	-1,10
	TrEST-A4018	C-8 Sterol Isomerase	0,00	-0,36	-0,23	-1,73	-0,32	0,00	-0,76	-1,20	-1,64	-0,93
	TrEST-A4222	short chain dehydrogenase/reductase family	0,00	-0,52	-0,78	-0,22	-1,27	0,00	-1,39	-1,09	-0,56	-0,32
	TrEST-A4240	probable sphingosine-1-phosphate lyase	0,00	-0,61	-0,50	-0,01	-4,87	0,00	1,88	1,07	0,25	0,43
	TrEST-B22D08	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	0,00	-0,96	-1,06	-0,55	-0,67	0,00	1,10	1,10	0,73	-0,77
	TrEST-A4280	Sterol Delta 5,6-Desaturase ERG3	0,00	-1,30	-1,06	-0,41	-1,25	0,00	1,50	0,73	0,32	1,13
	TrEST-A1958	Related to sphingoid base-phosphate phosphatase	0,00	-1,41	-1,61	-1,51	-0,66	0,00	-1,01	-1,27	-1,54	-0,22
	TrEST-A3347	Phospholipase D	0,00	-1,49	-1,61	0,10	-0,19	0,00	2,44	1,72	1,77	0,24
	TrEST-A4229	Fox2 Protein	0,00	-1,93	-1,99	-1,27	-0,95	0,00	0,95	3,01	1,86	-0,33
<i>Nucleotídeos</i>	TrEST-A752	Uricase	0,00	2,01	3,34	0,44	-0,50	0,00	-1,01	-1,08	-0,66	-0,38
	TrEST-A2852	Allantoinase	0,00	-0,03	-0,48	-0,26	0,21	0,00	-0,59	-1,05	-1,50	-0,96
	TrEST-A3671	nucleoside diphosphate kinase	0,00	-0,70	-0,69	-0,19	-0,28	0,00	0,77	1,15	0,18	0,25
	TrEST-A3570	Adenylosuccinate lyase	0,00	-1,60	-1,58	-0,54	-0,65	0,00	1,05	1,58	0,55	-0,08
<i>Açúcares e glicólise</i>	TrEST-A3388	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	0,00	2,13	2,32	1,71	-0,27	0,00	1,57	1,79	1,68	0,43
	TrEST-A2534	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0,00	1,95	1,47	0,91	2,57	0,00	0,81	1,50	1,23	1,17
	TrEST-A4093	Probable transaldolase	0,00	1,49	2,04	0,67	-0,68	0,00	1,55	2,61	1,98	0,20
	TrH XK	Hexokinase	0,00	1,24	1,22	1,08	-0,51	0,00	0,22	1,20	1,09	-0,59
	TrEST-B08D01	Pyruvate kinaseSugar	0,00	1,22	1,37	0,89	1,72	0,00	1,27	1,11	0,62	1,09
	TrFBA	Fructose-1,6-Bisphosphate Aldolase (T. reesei)	0,00	1,04	0,08	0,11	-0,01	0,00	1,65	1,72	1,68	-0,61
	TrPDC3050	Pyruvate Decarboxylase	0,00	0,94	1,01	0,57	-0,38	0,00	1,53	1,08	0,52	0,21
	TrEST-A750	Xylosidase / arabinosidase	0,00	0,94	0,52	1,02	0,65	0,00	-1,00	-1,44	-0,31	-0,25
	TrEST-A420	probable mannosyl-oligosaccharide glucosidase	0,00	0,86	0,82	0,62	-0,01	0,00	0,54	2,80	1,67	-0,27
	TrPGDH	Phosphoglycerate Dehydrogenase (T. reesei)	0,00	0,86	0,83	0,35	-0,02	0,00	1,03	1,89	1,46	-1,19
	TrPFK	Phosphofructokinase	0,00	0,81	1,53	0,36	-0,18	0,00	0,65	1,05	0,42	-1,03
	TrEST-A2041	Probable transketolase	0,00	0,69	0,71	0,35	0,47	0,00	0,62	1,86	1,24	0,08
	TrEST-A3061	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	0,00	0,67	1,46	0,71	0,41	0,00	1,25	1,88	1,57	0,29
	TrGPD	Glycerophosphate Dehydrogenase (T. reesei)	0,00	0,61	0,94	0,75	-0,21	0,00	3,11	2,20	2,61	0,42
	TrEST-A1305	Fructose-1,6-biphosphate aldolase	0,00	0,58	1,02	1,10	0,04	0,00	2,12	2,44	2,28	0,16
	TrEST-A3059	Enolase	0,00	0,48	0,41	0,60	1,19	0,00	1,09	1,00	0,32	0,47
	TrEST-B09F02	6-Phosphogluconate dehydrogenase	0,00	0,44	-0,36	-0,31	0,02	0,00	1,01	0,19	0,05	0,56
	TrGUT	GUT	0,00	0,43	0,29	-0,80	0,01	0,00	0,80	1,10	1,40	-0,72
	TrPDA	Pyruvate Dehydrogenase (T. reesei)	0,00	0,36	0,23	-0,57	-0,36	0,00	1,06	1,10	0,86	0,53
	TrEST-A1935	NADP-dependent glycerol dehydrogenase	0,00	0,36	1,40	1,44	-0,47	0,00	1,92	2,00	1,96	0,49
	TrEST-A1895	Enolase	0,00	0,30	0,78	0,34	-0,61	0,00	1,18	1,02	0,50	0,61
	TrTAL	Transaldolase (T. reesei)	0,00	0,29	-0,06	-0,91	-1,64	0,00	1,35	2,19	1,46	-0,31
	TrEST-A3541	L-xylulose reductase	0,00	0,21	0,14	2,05	1,33	0,00	2,85	4,44	2,64	0,66
	TrEST-A554	glycogen synthase	0,00	0,01	0,56	1,51	0,94	0,00	0,45	1,26	1,62	-0,13
	TrEST-B23D11	Putative Polysaccharide Polymerization Protein	0,00	-0,05	0,05	-0,60	0,95	0,00	0,08	-2,14	-1,15	0,07
	TrEST-A613	Xylitol dehydrogenase	0,00	-0,08	-0,43	-1,59	1,81	0,00	-0,43	-2,09	-1,76	1,06

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
Açúcares e glicólise	TrEST-A2499	glycogen phosphorylase-like protein	0,00	-0,08	-0,14	-0,20	0,10	0,00	0,86	1,20	1,06	1,01
	TrEST-A4206	Triosephosphate isomerase	0,00	-0,43	0,03	0,96	-0,18	0,00	1,85	2,83	2,48	0,33
	TrEST-A4050	glucoamylase	0,00	-1,23	-0,95	-1,11	-0,11	0,00	-0,37	-1,08	-1,79	-0,71
	TrEST-A86	related to beta-1, 3 exoglucanase precursor	0,00	-1,74	-1,77	-3,21	1,56	0,00	-0,26	-1,39	-2,36	0,70
	TrEST-A75	Putative malate dehydrogenase	0,00	-2,26	-2,16	-0,66	-3,86	0,00	0,28	2,46	0,96	0,29
Transporte	TrEST-A1813	Related to Pall protein	0,00	2,21	2,22	0,78	-0,41	0,00	4,44	2,25	3,22	0,45
	TrEST-A2756	Putative MSF transporter	0,00	2,05	1,87	1,80	1,26	0,00	-0,06	-1,24	-1,07	-0,34
	TrEST-B15B11	probable YHM1	0,00	1,55	0,75	0,18	0,02	0,00	-1,05	0,12	0,43	-1,06
	TrEST-A3656	Putative transmembrane transporter	0,00	0,68	0,75	-0,56	2,59	0,00	-1,15	-1,18	-0,65	0,55
Transporte	TrEST-A3772	High-Affinity Iron Permease Caftr2	0,00	0,52	0,06	0,85	-0,25	0,00	1,06	2,61	0,14	1,02
	TrEST-A3556	Putative MFS transporter	0,00	0,52	0,92	0,72	1,06	0,00	-2,67	-3,68	-3,17	-1,77
	TrEST-A3961	proline-specific permease	0,00	0,47	0,25	0,38	-0,35	0,00	1,48	0,55	0,81	1,06
	TrEST-A87	Putative MFS transporter	0,00	0,27	-0,37	-0,97	-0,72	0,00	-0,88	-1,24	-1,06	-0,93
	TrEST-A714	HEX1	0,00	0,25	0,02	0,53	-0,13	0,00	0,95	0,11	1,22	1,14
	TrEST-A89	sugar transporter, putative	0,00	0,17	0,20	0,23	-1,48	0,00	-0,70	-1,39	-1,04	-0,55
	TrEST-A386	Potassium Transporter	0,00	-0,11	-0,44	-1,00	-1,35	0,00	-0,62	-2,64	-1,36	-0,64
	TrEST-A2463	outer mitochondrial membrane protein porin	0,00	-0,14	-0,01	-1,49	-0,56	0,00	0,47	-2,11	-1,62	-0,19
	TrEST-A798	putative carnitine/acylcarnitine translocase	0,00	-0,41	-0,43	-0,31	-0,96	0,00	1,02	1,45	0,81	0,00
	TrEST-A3927	Putative MFS transporter	0,00	-0,63	-0,23	-0,20	0,14	0,00	1,37	0,94	1,67	0,04
	TrEST-B06A05	MDR-Like ABC Transporter	0,00	-0,96	-1,09	-2,14	-0,67	0,00	-0,68	-2,12	-1,37	1,19
	TrPGR	PGR	0,00	1,38	0,63	1,44	-0,96	0,00	1,08	1,36	1,64	0,08
	TrEST-A3036	Acetate Kinase	0,00	-0,38	-0,54	-0,88	-1,30	0,00	0,39	1,49	1,09	0,44
<u>Síntese Protéica</u>												
Modificações pós-traducionais e endereçamento	TrEST-A2625	ubiquitin/S27a fusion protein - N. crassa	0,00	2,55	3,16	0,53	0,18	0,00	-0,53	-0,96	-1,14	-0,51
	TrEST-A636	Polyubiquitin 5	0,00	2,02	0,53	0,47	0,04	0,00	0,46	1,40	3,12	-0,07
	TrEST-B27H11	Hypothetical Protein	0,00	1,54	1,56	1,24	2,01	0,00	-0,82	-1,04	-1,05	-0,21
	TrEST-B20A07	Probable Guanosine-Diphosphatase	0,00	1,22	0,96	1,11	-0,35	0,00	-0,42	-1,09	-1,28	-0,21
	TrEST-A2457	Peptidylprolyl Isomerase A Precursor	0,00	1,06	0,92	0,95	0,62	0,00	-0,12	-0,94	-1,95	-1,09
	TrEST-A3704	Biotin--Protein Ligase	0,00	0,31	0,27	0,29	0,41	0,00	-0,35	-1,69	-1,02	-0,49
	TrEST-A3157	Protein transport protein Sec24, putative	0,00	0,02	0,33	0,64	0,32	0,00	0,07	1,91	2,06	0,81
	TrEST-A205	Nuclear transport factor 2	0,00	-0,03	-0,12	-0,07	0,74	0,00	-0,57	-1,00	-1,44	-0,48
	TrEST-A3488	Putative protein-vacuolar targeting-related protein	0,00	-0,11	-1,65	-0,45	-0,63	0,00	2,46	1,84	0,77	0,66
	TrEST-A3985	Beta-Transducin	0,00	-0,41	-1,17	-0,79	-0,32	0,00	0,68	1,03	0,93	1,16
	TrEST-A3474	NhRAD6	0,00	-1,12	-1,11	-1,11	-0,16	0,00	-1,02	-1,43	-1,23	-0,28
	TrEST-A862	Beta Transducin	0,00	-1,15	-1,01	-1,08	0,20	0,00	1,04	1,08	1,06	0,36
Degradação protéica	TrEST-A4172	related to endosomal Vps protein complex subunit	0,00	-0,60	-0,63	0,03	-0,97	0,00	1,05	1,20	1,10	-0,24
	TrEST-A41	Vacuolar Protease A Precursor	0,00	-0,82	-0,87	-0,37	-0,27	0,00	1,02	1,00	0,39	-0,11

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Degradação protéica</i>	TrEST-A4013	Serine-type carboxypeptidase homolog precursor	0,00	-0,96	-1,22	-0,83	0,05	0,00	0,95	1,49	1,06	1,26
	TrEST-A1193	putative aminopeptidase	0,00	1,08	0,92	1,25	0,21	0,00	0,44	1,04	1,29	0,50
	TrEST-A595	Subtilisin-like serine protease PR1H	0,00	-1,32	-1,12	0,02	0,33	0,00	0,90	2,11	2,11	2,05
	TrEST-B07H02	Serine protease 2	0,00	1,18	1,11	0,18	0,54	0,00	0,46	0,78	1,10	1,10
	TrEST-A519	Putative DER1 protein	0,00	-0,67	-0,74	-1,03	-0,94	0,00	0,44	2,58	1,66	0,26
	TrEST-A738	Putative methionine aminopeptidase, type I	0,00	-0,74	-0,63	-0,70	0,07	0,00	-0,24	-2,15	-1,54	0,05
	TrEST-A4128	Cell Division Control Protein Cdc48	0,00	-0,42	-0,54	-0,65	0,24	0,00	-0,30	-1,12	-1,86	-1,01
	TrEST-A3560	Aspartic protease	0,00	-0,24	-0,22	-0,84	0,49	0,00	-0,66	-2,20	-1,70	-0,31
<i>Proteínas ribossomais</i>	TrEST-A4225	Probable 60S ribosomal protein L26	0,00	2,29	2,11	0,24	1,02	0,00	-1,04	-1,63	-0,93	-0,80
	TrEST-A510	Mitochondrial ribosomal protein L2	0,00	1,38	1,30	0,35	0,93	0,00	1,32	1,46	1,60	-0,37
	TrEST-A3445	40S ribosomal protein S5	0,00	1,35	1,29	0,48	-0,26	0,00	-0,96	-1,38	-1,81	-0,83
	TrEST-A1881	similar to ribosomal protein S24 isoform 3 isoform 1	0,00	1,18	0,46	0,00	1,85	0,00	1,23	2,58	0,18	-0,54
	TrEST-A1638	60S ribosomal protein Srp1	0,00	1,11	0,80	0,40	0,66	0,00	-0,09	-1,10	-1,03	0,28
<i>Proteínas ribossomais</i>	TrEST-A712	60S ribosomal protein L44	0,00	1,06	1,50	0,90	0,25	0,00	-0,57	-1,19	-1,14	-0,79
	TrEST-A192	40S ribosomal protein S21	0,00	1,03	1,24	0,18	-0,16	0,00	-1,61	-1,34	-0,54	-0,75
	TrEST-A553	Probable 60S ribosomal protein L22	0,00	0,92	0,96	0,43	0,73	0,00	-0,95	-1,16	-1,33	-0,29
	TrEST-A4073	60S ribosomal protein L23-like protein	0,00	0,92	0,93	-0,38	-0,15	0,00	-0,67	-2,54	-1,56	-0,34
	TrEST-A2562	40S ribosomal protein S2-like protein	0,00	0,36	0,47	0,22	-0,11	0,00	4,40	2,81	1,22	-1,15
	TrEST-B07A04	Rat S25; S25E Family of Ribosomal Proteins; Rps25bp	0,00	0,31	0,46	1,19	0,46	0,00	-1,10	-1,39	-1,69	-1,06
	TrEST-A681	60S ribosomal protein L3	0,00	-0,04	-0,93	-1,62	-0,58	0,00	-0,20	-2,74	-2,06	-0,09
	TrEST-A2862	60S ribosomal protein L19	0,00	0,94	1,10	0,90	0,03	0,00	-1,07	-1,62	-0,80	-0,40
	TrEST-A2605	cytosolic large ribosomal subunit L11, putative	0,00	-0,19	-0,25	-0,11	0,39	0,00	0,95	0,94	2,23	1,41
	TrEST-A1100	60S ribosomal protein L17	0,00	-0,32	-0,36	-0,81	-0,12	0,00	-0,67	-2,36	-1,72	-0,44
	TrEST-A1150	probable 40s ribosomal protein S6.e, cytosolic	0,00	-0,45	-0,36	-0,87	-0,77	0,00	-0,95	-2,33	-1,90	-0,64
	TrEST-B20B05	Ribosomal Protein L30-Like Protein	0,00	-0,55	-0,58	-0,57	0,10	0,00	-0,82	-1,37	-1,92	-0,77
	TrEST-B15D12	60S ribosomal protein L27	0,00	-0,64	-0,67	-0,40	-0,37	0,00	2,39	1,39	0,84	0,03
	TrEST-B33G02	40S ribosomal protein S24	0,00	-0,95	-1,38	-1,56	-0,36	0,00	-0,20	-2,29	-2,09	-0,12
	TrEST-B06A02	Cytosolic small ribosomal subunit S15	0,00	-1,45	-1,02	-1,27	-0,68	0,00	1,44	2,21	1,85	3,24
	TrEST-B08A11	40S ribosomal protein S7	0,00	-1,53	-0,89	-0,70	-0,51	0,00	-1,40	-3,03	-2,21	-1,10
	TrEST-B22F11	40S Ribosomal Protein S7	0,00	-1,73	-1,30	-0,96	-0,80	0,00	-1,05	-1,03	-0,73	-0,32
	TrEST-B17D10	60S ribosomal protein L5	0,00	-1,92	-1,14	-0,74	0,44	0,00	-0,50	-1,03	-0,87	0,54
	TrEST-B16E02	40S ribosomal protein S26E	0,00	-1,94	-2,97	-0,96	0,35	0,00	-0,58	-1,09	-1,07	-0,42
<i>Fatores de tradução</i>	TrEST-B17H05	Similarity To Elongation Factor 1 Gamma Subunit	0,00	0,94	1,61	0,82	0,04	0,00	-1,02	-1,02	-0,84	-0,19
	TrEST-A1781	eIF3 subunit 6 interacting protein-like protein	0,00	1,55	1,35	0,73	0,95	0,00	-1,80	-1,83	-1,66	-1,35
	TrEST-B15B07	Translation Initiation Factor 3 Subunit 7 Homolog	0,00	0,28	0,47	0,42	-0,05	0,00	-0,55	-1,01	-1,02	0,33
	TrEST-A2966	Elongation Factor 1-Beta	0,00	0,57	0,46	0,35	-0,15	0,00	1,16	0,15	-0,36	0,53
	TrEST-A630	Translation Initiation Factor 3 Subunit 2	0,00	0,51	0,24	0,12	0,94	0,00	-1,02	-1,27	-0,09	-0,20
	TrEST-B23G07	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1	0,00	0,02	0,24	0,45	0,32	0,00	-0,96	-1,05	-1,00	-0,54
	TrEST-A1154	Related to eIF3 subunit	0,00	0,20	0,21	0,00	-0,41	0,00	-0,02	-0,96	-1,24	-0,51

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Fatores de tradução</i>	TrEST-A3417	Translation Initiation Factor Eif1	0,00	0,06	0,17	0,70	1,94	0,00	1,41	1,57	0,49	0,31
	TrEST-A3737	Eukaryotic translation initiation factor 6	0,00	0,00	-0,18	-0,95	-0,92	0,00	-1,13	-1,04	-0,30	-0,91
	TrEST-A1025	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit EifCe	0,00	-0,19	-0,30	-0,41	-0,48	0,00	-1,71	-1,23	-1,61	-0,73
	TrEST-A3815	Translation Elongation factor 2	0,00	-0,91	-1,10	-0,07	0,31	0,00	0,47	2,61	1,82	-0,38
	TrEST-B22C11	Hypusine Containg Protein	0,00	-0,96	-1,13	-1,40	-1,46	0,00	-0,69	-1,16	-1,63	-0,60
	TrEST-A436	Initiation Factor 4a-Like Protein C1f5.10	0,00	-1,39	-1,68	-1,54	-0,16	0,00	1,11	1,04	1,07	-0,20
<i>Síntese e metabolismo de tRNA</i>	TrEST-A265	putative lysyl-trna synthetase	0,00	0,09	0,60	1,11	0,43	0,00	-0,72	-1,74	-1,11	-1,28
	TrEST-A3740	Related to mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase	0,00	-1,02	-0,22	-0,08	-0,67	0,00	1,63	2,27	0,94	0,02
	TrEST-A2485	putative tryptophanyl-trna synthetase	0,00	-0,29	-0,35	-0,32	0,28	0,00	0,77	1,03	1,30	0,13
	TrEST-B19F04	Trna-Splicing Endonuclease Subunit	0,00	-0,55	-0,72	-0,85	-1,61	0,00	0,24	-1,05	-0,69	0,17
	TrEST-A134	Chain A, Aspartyl tRNA Synthetase	0,00	-0,83	-0,88	-1,63	-1,53	0,00	1,15	1,05	0,42	-0,10
	TrEST-A3843	Leucyl-Trna Synthetase, Mitochondrial Precursor	0,00	-1,08	-1,31	-0,76	0,95	0,00	1,29	1,07	1,15	1,07
<u>Síntese de RNAs</u>												
<i>RNA polimerase</i>	TrEST-A3333	Probable DNA-Directed RNA Polymerase III	0,00	0,18	0,46	-0,33	-0,31	0,00	0,68	1,30	1,92	-0,26
<i>Fatores transcrionais</i>	TrEST-A3522	related to the component Tra1 of the SAGA complex	0,00	-0,31	-1,18	-1,34	-1,50	0,00	1,04	1,38	2,09	0,38
	TrEST-A638	Putative C2H2 finger domain protein	0,00	0,31	0,18	0,57	-0,71	0,00	1,32	2,11	0,95	0,30
	TrEST-A314	related to cyclic-amp-dependent transcription factor atf-2	0,00	-0,61	-0,24	0,65	0,60	0,00	0,75	1,56	0,59	1,62
	TrEST-A3454	Transcription factor HACI	0,00	0,55	0,50	-1,08	-1,22	0,00	0,50	1,37	1,84	0,50
	TrEST-A3600	Transcription factor	0,00	-0,30	-0,36	-0,68	0,59	0,00	-0,40	-2,30	-1,47	-0,13
	TrEST-A4080	Transcription factor PacC	0,00	-1,00	-1,06	-1,11	-1,26	0,00	-0,59	-1,09	-2,41	1,13
	TrEST-A13	Transcription Factor , Putative	0,00	0,09	-0,65	-0,28	-0,65	0,00	-1,71	-1,95	-1,83	-1,22
<u>Não classificada</u>												
<i>Outros genes</i>	TrEST-A1576	conserved Hypothetical Protein	0,00	0,90	0,58	0,74	-0,21	0,00	0,80	1,38	1,15	1,05
	TrEST-B16G02	sulfite reductase chain MET10 - yeast	0,00	0,11	0,15	0,81	-0,23	0,00	1,25	1,86	0,89	0,70
	TrEST-A310	Dj591c20.4.1	0,00	2,28	2,14	0,94	1,13	0,00	0,78	1,05	1,30	-0,35
	TrEST-A3724	Cyanovirin-N-Like Protein	0,00	0,85	0,42	0,17	0,39	0,00	0,38	1,36	1,51	1,39
	TrEST-A700	Related To Tol Protein	0,00	-0,29	-0,37	-0,33	0,31	0,00	-0,65	-1,10	-1,54	0,13
	TrEST-A2853	predicted protein	0,00	-0,31	-0,25	-1,72	1,37	0,00	-1,09	-1,22	-0,71	0,35
	TrEST-B33C03	Chitin Synthase B	0,00	1,87	1,94	0,32	0,29	0,00	0,81	1,05	1,37	-0,25
	TrEST-B23B04	Homology To Rat L29; Rpl29p	0,00	0,94	0,75	1,04	0,38	0,00	-0,75	-1,02	-1,30	-1,06
	TrEST-A2701	NifS-like protein; Nfs1p	0,00	0,93	1,49	0,44	0,61	0,00	-1,16	-1,02	-0,59	-2,32
	TrEST-B41C03	Pherophorin-S - Volvox carteri	0,00	0,79	0,68	0,36	-0,33	0,00	0,29	1,22	1,09	0,53
	TrEST-A4185	Amino Acid Permease Family Protein, Putative	0,00	0,61	-0,02	-0,02	-0,49	0,00	0,51	1,65	1,65	1,12
	TrEST-A1273	14-3-3 protein homolog	0,00	0,41	0,13	0,33	1,11	0,00	1,02	1,47	0,95	1,04
	TrEST-A3821	Integral Membrane Protein, Mpv17/PMP22 Family	0,00	0,35	0,32	0,96	-1,04	0,00	2,59	1,06	1,10	-0,70
	TrEST-A160	putative sulfite reductase	0,00	0,32	0,36	0,83	-0,14	0,00	0,14	1,49	1,15	-0,10
	TrEST-A2601	Related To Phenol 2-Monooxygenase	0,00	0,15	1,06	0,83	1,58	0,00	1,77	1,10	1,15	1,02

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
Outros genes	TrEST-A3338	Putative Salicylate Hydroxylase	0,00	0,15	0,09	1,51	-0,17	0,00	1,26	5,38	0,93	-0,50
	TrEST-A3492	Putative Oxidoreductase	0,00	-0,12	0,18	0,21	0,56	0,00	-0,53	-1,09	-1,66	-0,45
	TrEST-A3409	Mdm10	0,00	-0,58	-0,30	-1,04	-0,63	0,00	-0,96	-2,19	-1,19	-0,58
	TrEST-B13D11	Molybdopterin Binding Domain Protein	0,00	-0,61	-0,71	-0,68	-0,21	0,00	-1,16	-1,42	-0,69	0,26
	TrEST-A3750	haloacid dehalogenase-like hydrolase	0,00	-1,12	-1,19	-0,75	-0,55	0,00	1,61	2,20	2,79	-0,63
	TrEST-A4002	related to membrane protein	0,00	2,28	2,43	1,61	0,72	0,00	-0,44	-1,33	-0,64	-1,27
	TrEST-B06D08	Aminotransferase class V	0,00	1,16	0,75	0,70	1,96	0,00	-0,60	-1,16	-1,30	-0,44
	TrEST-A3687	Related to rasp f 7 allergen	0,00	1,07	1,29	1,18	0,38	0,00	-2,08	-1,69	-1,88	-0,32
	TrEST-A3592	stomatin-like protein	0,00	0,69	0,51	-0,10	0,35	0,00	-0,04	-2,18	-1,35	0,08
	TrEST-A3112	thioredoxin, putative	0,00	0,66	0,51	1,46	0,50	0,00	1,39	1,26	1,32	-0,32
	TrEST-A4193	R3H and G-patch domain protein, putative	0,00	0,56	0,35	0,10	-0,63	0,00	1,01	0,72	2,84	-0,16
	TrEST-A1116	Nonribosomal peptide synthetase; NRPS	0,00	0,43	0,82	1,11	1,05	0,00	1,07	1,30	1,29	1,19
	TrEST-A824	ras protein	0,00	0,02	0,33	1,15	-0,87	0,00	-1,30	-0,02	-0,16	1,01
	TrEST-A1904	Integral membrane protein	0,00	-0,02	-0,31	-0,17	-0,79	0,00	0,91	3,22	1,37	0,46
	TrEST-A2501	DUF895 domain membrane protein	0,00	-0,21	0,14	0,47	0,91	0,00	-0,02	-1,24	-1,26	0,60
	TrEST-A358	repressed by TUP1 protein 2; Rbt2p	0,00	-0,27	-0,40	0,14	-0,72	0,00	-2,27	-0,22	-0,66	1,96
	TrEST-A3021	Ypt-interacting protein yop-1	0,00	-0,38	-0,31	0,69	-0,08	0,00	1,09	1,15	0,44	-0,37
	TrEST-B33F12	Probable membrane protein YMR292w	0,00	-0,88	-1,00	-0,87	-0,31	0,00	-0,48	-2,39	-2,04	-0,47
	TrEST-A3941	Putative mitochondrial DNA replication protein	0,00	-0,95	-0,54	-0,09	0,32	0,00	-1,11	-1,93	-0,37	1,14
	TrEST-A728	EsdC protein, required for sexual development	0,00	-1,36	-0,55	-1,06	-2,47	0,00	0,50	1,08	2,10	0,26
	TrEST-A2617	Integral membrane protein	0,00	-1,67	-1,61	-1,15	-0,38	0,00	4,37	1,61	0,96	1,37
<u>Desconhecida</u>												
Relacionados a ORFs previstas	TrEST-B06C07	Hypothetical Protein FG05637.1	0,00	0,66	0,94	0,63	1,34	0,00	-1,05	-0,94	-0,35	2,30
	TrEST-A992	Hypothetical Protein MG07696.4	0,00	1,80	1,79	1,14	1,42	0,00	1,05	1,85	1,76	2,17
	TrEST-A2651	Hypothetical Protein FG04780.1	0,00	-0,32	-0,11	-0,60	0,09	0,00	-1,27	-1,99	-0,94	1,90
	TrEST-A2566	Hypothetical Protein FG09308.1	0,00	-0,32	-0,39	-0,06	2,85	0,00	0,45	0,90	1,78	1,88
	TrEST-A2006	Hypothetical Protein FG05186.1	0,00	-1,00	-1,10	-0,60	-0,74	0,00	1,50	1,36	1,63	1,71
	TrEST-A1982	Hypothetical Protein FG09617.1	0,00	0,57	0,56	0,76	0,96	0,00	0,81	1,10	0,95	1,67
	TrEST-A2918	Hypothetical Protein AN2628.2	0,00	-0,58	-0,40	-0,41	0,29	0,00	0,36	0,79	2,21	1,54
	TrEST-A4108	Hypothetical Protein FG08506.1	0,00	0,49	0,26	0,79	0,18	0,00	1,47	2,42	1,24	1,49
	TrEST-A2755	Hypothetical Protein	0,00	0,06	1,01	0,26	0,58	0,00	0,17	1,88	0,88	1,43
	TrEST-A3311	Hypothetical Protein	0,00	-0,55	-0,14	0,03	-0,34	0,00	0,82	1,26	1,05	1,40
	TrEST-A3946	Hypothetical Protein FG10202.1	0,00	-0,51	-0,32	-1,22	-0,27	0,00	2,70	2,47	1,82	1,28
	TrEST-A678	Hypothetical Protein FG00793.1	0,00	0,83	0,61	0,19	0,15	0,00	0,38	0,73	1,49	1,27
	TrEST-A1028	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	0,88	0,85	1,22	0,43	0,00	1,74	2,34	2,04	1,17
	TrEST-A1360	Hypothetical Protein 8D4.230 - N. crassa	0,00	0,42	0,24	0,51	0,26	0,00	-1,03	-1,01	-0,78	1,14
	TrEST-A3680	Predicted protein	0,00	0,40	1,49	0,29	0,57	0,00	-0,28	-1,00	-1,87	1,09
	TrEST-A3619	Hypothetical Protein	0,00	-0,39	-0,27	-0,11	-0,25	0,00	0,49	1,19	1,46	1,06

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
Relacionados a ORFs previstas	TrEST-A3646	Hypothetical Protein FG08365.1	0,00	0,18	0,16	0,14	0,08	0,00	0,70	1,44	2,26	1,05
	TrEST-A889	Hypothetical Protein FG00314.1	0,00	-0,83	-0,65	-0,63	-0,94	0,00	0,06	1,07	0,75	1,02
	TrEST-A1578	Hypothetical Protein MG08808.4	0,00	-0,20	-0,14	-0,01	0,30	0,00	1,03	1,29	0,55	0,87
	TrEST-A4130	Hypothetical Protein FG01026.1	0,00	-0,33	-0,21	-0,54	-0,65	0,00	0,15	1,19	1,17	0,81
	TrEST-A684	Hypothetical Protein FG06846.1	0,00	0,68	0,34	-0,06	-0,58	0,00	1,48	1,04	1,17	0,81
	TrEST-A3747	Hypothetical Protein FG07160.1	0,00	0,02	0,29	0,15	0,93	0,00	2,18	2,27	2,22	0,77
	TrEST-A2618	Hypothetical Protein FG01267.1	0,00	-0,12	0,16	0,42	-1,97	0,00	5,27	3,45	3,08	0,70
	TrEST-A3377	Hypothetical Protein MG05574.4	0,00	0,94	0,68	0,18	0,13	0,00	2,84	1,80	2,26	0,60
	TrEST-A522	Predicted protein	0,00	0,06	0,19	1,67	0,45	0,00	0,19	1,03	1,09	0,60
	TrEST-B40F10	Hypothetical Protein	0,00	-0,92	-0,90	-0,22	0,12	0,00	1,37	1,83	1,28	0,59
	TrEST-A1094	Hypothetical Protein FG06539.1	0,00	0,78	0,18	0,59	-0,56	0,00	2,19	1,29	1,79	0,58
	TrEST-A606	Hypothetical Protein	0,00	-0,76	-0,24	-0,73	-0,62	0,00	1,48	1,39	1,29	0,58
	TrEST-A897	Hypothetical Protein FG07275.1	0,00	-0,79	-0,69	-0,96	-1,06	0,00	0,78	1,78	2,78	0,53
	TrEST-A1020	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	0,28	0,44	0,80	0,64	0,00	1,32	2,47	1,89	0,53
	TrEST-A435	Hypothetical Protein	0,00	0,41	0,41	0,42	1,06	0,00	1,25	1,28	1,11	0,51
	TrEST-A3477	Hypothetical Protein	0,00	0,45	0,33	1,19	-0,76	0,00	-0,07	-2,72	-1,75	0,48
	TrEST-A1084	Hypothetical Protein MG01625.4	0,00	-0,26	-0,71	-0,60	-1,03	0,00	0,36	1,11	1,62	0,45
	TrEST-B15F03	Hypothetical Protein	0,00	1,33	1,18	1,48	1,44	0,00	0,50	1,08	1,12	0,43
	TrEST-A831	Hypothetical Protein MG01070.4	0,00	-0,93	-0,69	-0,52	-0,94	0,00	0,72	1,24	1,04	0,41
	TrEST-A398	Hypothetical Protein FG00415.1	0,00	0,44	0,25	0,07	0,68	0,00	-0,35	-1,82	-1,64	0,40
	TrEST-A2606	Hypothetical Protein MG07328.4	0,00	0,58	0,40	0,28	1,13	0,00	4,58	4,22	2,43	0,37
	TrEST-A860	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	-0,38	-0,15	-1,28	-1,63	0,00	1,49	2,96	1,87	0,37
	TrEST-A525	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	0,38	0,50	0,93	1,10	0,00	1,85	2,90	1,64	0,37
	TrEST-A2321	Hypothetical Protein MG03691.4	0,00	0,60	0,54	0,87	1,14	0,00	0,84	2,04	2,10	0,26
	TrEST-A3486	Hypothetical Protein MG02711.4	0,00	-0,54	-0,77	-0,46	-0,70	0,00	0,08	1,85	1,33	0,24
	TrEST-A3117	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	-0,96	-1,30	-1,26	-2,00	0,00	1,44	0,10	1,37	0,22
	TrEST-A3491	Hypothetical Protein FG04478.1	0,00	-3,86	-3,80	-4,36	-4,38	0,00	1,03	1,02	0,22	0,22
	TrEST-A3651	Hypothetical Protein FG06162.1	0,00	-1,09	-1,04	-0,24	0,69	0,00	1,37	1,39	1,42	0,21
	TrEST-A2091	Hypothetical Protein FG01222.1	0,00	0,91	0,33	0,93	0,79	0,00	3,58	3,81	1,32	0,21
	TrEST-A317	Putative protein	0,00	0,45	-0,49	-1,10	-0,14	0,00	1,10	0,96	0,79	0,19
	TrEST-A2062	Hypothetical Protein MG00505.4	0,00	-0,40	-0,02	0,73	-0,76	0,00	-0,76	-3,75	-2,63	0,17
	TrEST-A1907	Hypothetical Protein MG00625.4	0,00	-2,19	-1,50	-2,88	-3,39	0,00	1,59	2,47	0,95	0,15
	TrEST-A2559	conserved Hypothetical Protein	0,00	-1,05	-0,73	-0,89	-1,29	0,00	1,85	4,56	1,49	0,15
	TrEST-A411	Hypothetical Protein MG05213.4	0,00	-1,02	-0,85	-0,10	-0,15	0,00	-0,84	-1,10	-1,48	0,14
	TrEST-A3191	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	0,94	1,20	0,23	-0,37	0,00	1,74	2,31	2,03	0,14
	TrEST-A526	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	-0,68	-0,76	-0,47	0,31	0,00	1,55	2,47	2,16	0,08
	TrEST-A2588	Hypothetical Protein	0,00	-0,80	-0,72	-0,88	-0,73	0,00	1,24	1,23	0,39	0,08
	TrEST-A1000	Hypothetical Protein	0,00	-0,39	-0,62	-0,95	-0,26	0,00	-1,16	-2,20	-2,53	0,07
	TrEST-A834	Predicted protein	0,00	1,22	1,23	0,17	-0,41	0,00	1,93	3,00	2,46	0,04

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Relacionados a ORFs previstas</i>	TrEST-A437	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	-0,09	0,08	0,79	-0,20	0,00	1,57	2,60	1,34	0,04
	TrEST-A3573	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	0,85	0,65	-0,35	0,36	0,00	0,94	1,74	1,34	0,03
	TrEST-B23E02	Hypothetical Protein	0,00	-0,88	-0,69	-0,56	0,15	0,00	-1,08	-1,57	-0,04	0,02
	TrEST-A788	Hypothetical Protein FG10744.1	0,00	-0,56	-0,59	-0,58	-1,13	0,00	1,05	1,38	0,14	0,02
	TrEST-B20G09	Hypothetical Protein FG02071.1	0,00	-2,07	-1,13	-0,30	0,07	0,00	-0,70	-1,08	-1,32	-0,01
	TrEST-A2143	Predicted protein	0,00	-0,41	-0,52	-0,82	-1,18	0,00	1,02	0,96	0,95	-0,02
	TrEST-B35G01	Hypothetical Protein FG05089.1	0,00	0,79	1,32	0,18	0,70	0,00	-1,09	-1,38	-0,51	-0,03
	TrEST-A1762	Hypothetical Protein MG00847.4	0,00	0,36	0,46	1,01	1,02	0,00	-1,77	-1,08	-0,53	-0,05
	TrEST-A115	Hypothetical Protein FG08440.1	0,00	0,85	0,44	0,26	0,94	0,00	-1,08	-0,88	-1,38	-0,07
	TrEST-A2336	Hypothetical Protein MG00602.4	0,00	0,72	0,93	0,22	0,74	0,00	-1,13	-0,95	-0,96	-0,08
	TrEST-A729	Hypothetical Protein PA1024	0,00	0,24	0,05	0,15	-1,40	0,00	-0,04	-1,02	-1,60	-0,09
	TrEST-B24A08	Hypothetical Protein	0,00	-1,25	-0,95	-1,48	0,32	0,00	1,05	1,21	0,80	-0,11
	TrEST-A1181	Hypothetical Protein FG09906.1	0,00	1,54	1,22	1,94	0,38	0,00	1,33	2,10	1,71	-0,12
	TrEST-A390	Hypothetical Protein FG00686.1	0,00	-1,35	-1,15	-0,47	-0,54	0,00	0,66	1,52	1,37	-0,14
	TrEST-A1688	Hypothetical Protein MG09211.4	0,00	-0,04	-0,42	-1,30	1,35	0,00	0,54	1,34	1,07	-0,18
	TrEST-A1238	Hypothetical Protein FG09906.1	0,00	1,14	0,25	0,44	0,18	0,00	1,66	2,39	2,03	-0,19
	TrEST-B08A02	Hypothetical Protein B11B22.30 - N. crassa	0,00	-0,10	-0,60	-1,40	-0,15	0,00	-0,53	-1,10	-1,67	-0,25
	TrEST-B21F04	Hypothetical Protein MG01852.4	0,00	0,53	0,71	0,23	-0,13	0,00	-0,15	-2,23	-1,12	-0,27
	TrEST-A3825	Hypothetical Protein FG08885.1	0,00	-0,57	-0,61	-0,39	-0,95	0,00	0,61	1,09	2,18	-0,31
	TrEST-A955	Hypothetical Protein	0,00	-2,49	-1,87	-1,89	-2,75	0,00	1,04	1,12	1,77	-0,31
	TrEST-A1591	Hypothetical Protein FG02512.1	0,00	0,42	0,40	1,38	3,10	0,00	-0,31	-1,18	-1,08	-0,39
	TrEST-B34D05	Hypothetical Protein AN2200.2	0,00	1,31	0,86	0,92	1,09	0,00	-0,52	-1,23	-1,07	-0,42
	TrEST-A3685	Hypothetical Protein	0,00	1,90	2,16	1,64	0,52	0,00	-1,02	-0,96	-0,37	-0,44
	TrEST-A1748	Hypothetical Protein MG04965.4	0,00	0,50	0,18	-0,14	0,97	0,00	-0,34	-2,05	-3,12	-0,45
	TrEST-A694	Hypothetical Protein FG09552.1	0,00	1,60	1,58	0,91	1,82	0,00	-1,02	-1,04	-0,56	-0,46
	TrEST-A2854	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	-0,79	-0,38	-0,12	0,09	0,00	-0,03	-2,33	-1,59	-0,47
	TrEST-A555	Hypothetical Protein MG00777.4	0,00	0,31	0,43	0,32	1,55	0,00	-0,58	-1,14	-1,14	-0,51
	TrEST-B11E08	Hypothetical Protein	0,00	1,40	1,46	0,31	0,28	0,00	-1,65	-1,06	-0,11	-0,57
	TrEST-A4283	Hypothetical Protein	0,00	0,93	1,21	0,25	0,25	0,00	-1,48	-1,06	-0,93	-0,58
	TrEST-A847	Hypothetical Protein MG04330.4	0,00	0,15	0,32	0,24	-0,85	0,00	-0,09	-1,23	-1,19	-0,59
	TrEST-A2035	Predicted protein	0,00	0,40	0,09	0,25	-0,43	0,00	0,68	1,36	1,02	-0,71
	TrEST-A1903	Hypothetical Protein	0,00	-1,86	-1,68	-0,85	-0,20	0,00	-0,49	-1,14	-1,78	-0,75
	TrEST-A4047	Hypothetical Protein FG08805.1	0,00	0,86	0,92	0,89	0,66	0,00	-0,94	-2,60	-1,79	-0,78
	TrEST-A4094	Hypothetical Protein	0,00	1,00	2,10	0,27	1,40	0,00	-1,70	-1,16	-0,16	-0,79
	TrEST-A2511	Hypothetical Protein MG03940.4	0,00	-0,87	-1,05	-0,49	-0,11	0,00	-0,58	-1,95	-1,27	-0,81
	TrEST-A3998	Hypothetical Protein FG09950.1	0,00	0,48	0,37	0,43	-0,39	0,00	-0,96	-1,13	-1,30	-0,90
	TrEST-B16C03	Hypothetical Protein MG10586.4	0,00	-0,65	-0,87	-0,37	0,55	0,00	-1,74	-1,65	-0,91	-1,04
	TrEST-A88	Hypothetical Protein FG01059.1	0,00	0,64	0,57	0,77	-0,64	0,00	-0,41	-1,26	-1,18	-1,07
	TrEST-A3667	Hypothetical Protein MG09372.4	0,00	0,44	0,54	1,20	0,19	0,00	-1,00	-0,63	-0,24	-1,07

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Relacionados a ORFs previstas</i>	TrEST-A787	Hypothetical Protein FG09308.1	0,00	0,96	1,09	0,40	-1,01	0,00	1,23	0,82	1,23	-1,12
	TrEST-A927	Hypothetical Protein MG03520.4	0,00	-1,00	-1,13	-1,25	-1,65	0,00	-1,29	-0,95	2,30	-1,16
	TrEST-A1957	Hypothetical Protein MG07225.4	0,00	-0,15	-0,19	-0,23	-0,37	0,00	-1,93	-1,28	-1,60	-1,34
	TrEST-A52	Predicted Protein	0,00	1,31	1,15	1,44	0,71	0,00	0,76	2,15	1,32	1,08
	TrEST-A421	probable membrane protein	0,00	1,14	0,42	0,35	0,05	0,00	1,02	0,94	1,17	0,47
	TrEST-A245	Predicted Protein	0,00	-1,27	-1,27	-0,05	-0,61	0,00	0,95	1,52	1,11	0,01
	TrEST-A3077	Predicted Protein	0,00	-0,08	0,11	0,24	-0,25	0,00	1,04	0,80	1,12	-0,01
	TrEST-A4183	Predicted Protein	0,00	-0,29	-0,90	-2,16	-0,58	0,00	0,39	-2,63	-1,68	-0,21
	TrEST-A2432	Predicted Protein	0,00	-1,66	-1,70	-1,71	-1,22	0,00	-0,94	-1,44	-1,90	-0,31
	TrEST-A840	putative dolichol kinase	0,00	0,10	0,07	0,08	-0,79	0,00	-0,42	-1,18	-1,94	-0,61
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-B09F01	Predicted Protein	0,00	-0,14	-0,25	-0,37	0,19	0,00	-1,11	-1,44	-1,77	-1,34
	TrEST-A1537	Not Match	0,00	-0,81	-1,26	-0,82	-1,16	0,00	0,34	0,94	1,04	2,27
	TrEST-A571	No Match	0,00	-1,89	-1,47	-0,54	0,14	0,00	0,45	1,77	0,38	2,04
	TrEST-A3695	No Match	0,00	1,14	0,23	1,19	0,71	0,00	-1,19	-0,86	-1,09	1,96
	TrEST-A930	No Match	0,00	0,94	1,35	2,43	-0,27	0,00	1,85	1,26	0,67	1,58
	TrEST-A2408	Not Match	0,00	0,49	0,20	-0,38	0,59	0,00	0,45	1,35	1,38	1,40
	TrEST-B41D08	No Match	0,00	0,07	0,10	0,04	1,24	0,00	-0,45	-1,10	-1,12	1,38
	TrEST-A2814	Not Match	0,00	0,89	0,94	0,64	0,82	0,00	0,11	1,18	0,92	1,33
	TrEST-B40C06	Not Match	0,00	-0,04	-0,25	-1,52	-1,19	0,00	0,65	1,09	0,52	1,25
	TrEST-A1569	Not Match	0,00	-0,81	-0,51	-1,10	0,49	0,00	0,01	1,17	1,36	1,18
	TrEST-A2332	No Match	0,00	1,03	1,03	1,03	-0,28	0,00	0,82	2,14	3,47	1,17
	TrEST-A2514	No Match	0,00	-0,41	-0,25	-0,95	-0,14	0,00	-1,67	-1,19	-0,45	1,16
	TrEST-A637	No Match	0,00	-0,96	-0,82	-1,08	-1,07	0,00	1,12	1,10	1,38	1,15
	TrEST-A2931	Not Match	0,00	0,03	-0,02	0,49	0,59	0,00	0,75	0,72	1,07	1,15
	TrEST-A2398	No Match	0,00	-0,29	-0,27	-0,29	-0,02	0,00	0,24	1,07	0,72	1,11
	TrEST-B40A05	Not Match	0,00	-0,33	-0,28	-0,23	0,96	0,00	0,38	1,03	1,27	1,10
	TrEST-B08A08	No Match	0,00	-2,29	-1,45	-0,83	0,51	0,00	-0,66	-1,24	-0,50	1,08
	TrEST-A3869	Not Match	0,00	-0,67	-0,79	-1,03	-0,45	0,00	0,12	1,06	1,19	1,06
	TrEST-B33G01	Not Match	0,00	-0,29	-0,20	-1,10	1,24	0,00	0,64	1,25	1,09	1,05
	TrEST-A2846	Not Match	0,00	0,43	0,16	-0,17	0,34	0,00	-0,09	-2,05	-1,55	1,04
	TrEST-A1829	Not Match	0,00	0,16	-0,41	-1,26	0,60	0,00	0,15	-2,07	-1,66	1,02
	TrEST-A594	Not Match	0,00	0,14	0,59	1,04	-0,52	0,00	-0,90	-0,96	-1,10	1,01
	TrEST-A601	Not Match	0,00	0,82	0,72	1,50	0,48	0,00	3,46	2,32	1,18	1,01
	TrEST-A1670	No Match	0,00	1,47	1,75	0,19	2,42	0,00	-0,43	-1,96	-1,00	0,96
	TrEST-A846	Not Match	0,00	-0,19	-0,91	-0,02	-0,96	0,00	1,27	1,64	2,22	0,93
	TrEST-A760	Not Match	0,00	-1,54	-1,75	-1,00	-1,57	0,00	1,18	1,05	0,78	0,82
	TrEST-B18G02	No Match	0,00	1,04	1,48	0,17	1,36	0,00	1,24	1,10	1,48	0,75
	TrEST-A2897	Not Match	0,00	-0,58	-0,61	-0,08	-0,78	0,00	0,69	1,74	2,23	0,72
	TrEST-A2583	Not Match	0,00	-1,15	-0,93	0,07	0,06	0,00	1,55	2,31	0,65	0,70

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-B37C08	Not Match	0,00	0,46	0,51	0,39	0,30	0,00	-1,01	-1,10	-0,80	0,69
	TrEST-A2753	Not Match	0,00	0,02	-0,07	-0,91	-0,62	0,00	1,29	1,57	0,38	0,68
	TrEST-B12C02	No Match	0,00	1,33	1,46	1,40	1,79	0,00	-1,19	-1,00	-0,82	0,65
	TrEST-A1788	No Match	0,00	-0,02	-0,39	0,10	-0,91	0,00	2,85	1,80	0,88	0,63
	TrEST-A3013	No Match	0,00	-0,50	-0,62	-0,43	-0,74	0,00	1,17	1,16	1,15	0,57
	TrEST-A4181	Not Match	0,00	-2,76	-2,73	-0,72	-1,01	0,00	0,67	1,05	1,19	0,55
	TrEST-A1077	Not Match	0,00	-0,23	0,19	0,54	1,26	0,00	0,69	1,16	1,47	0,55
	TrEST-B21B03	Not Match	0,00	-0,15	-0,26	-0,47	0,04	0,00	0,44	0,96	1,19	0,55
	TrEST-A2943	Not Match	0,00	0,52	0,34	0,32	0,75	0,00	0,06	-1,08	-1,19	0,49
	TrEST-A1632	No Match	0,00	0,20	-0,30	-0,43	0,43	0,00	-0,04	-1,76	-1,41	0,48
	TrEST-A2894	Not Match	0,00	-0,09	-0,18	-0,26	0,97	0,00	0,86	0,96	1,14	0,47
	TrEST-A3520	No Match	0,00	0,07	0,25	1,14	-0,51	0,00	0,41	1,07	2,84	0,47
	TrEST-A385	Not Match	0,00	-1,15	-1,51	-0,72	-0,88	0,00	0,42	1,04	1,50	0,47
	TrEST-A994	Not Match	0,00	0,42	1,18	1,94	0,61	0,00	1,57	2,34	0,70	0,47
	TrEST-A1580	Not Match	0,00	-1,25	-1,43	-0,25	-1,11	0,00	1,08	1,00	0,95	0,46
	TrEST-A4210	Not Match	0,00	-0,28	-0,82	-0,65	-0,68	0,00	-0,15	-2,89	-2,18	0,45
	TrEST-A444	No Match	0,00	-0,45	-0,27	0,00	-0,13	0,00	1,14	1,10	1,07	0,45
	TrEST-B19A09	Not Match	0,00	-0,89	-0,30	-0,50	-0,84	0,00	-0,06	-2,26	-1,69	0,44
	TrEST-A2993	Not Match	0,00	-0,29	-0,29	-0,37	0,29	0,00	1,32	1,12	0,93	0,44
	TrEST-A2448	Not Match	0,00	1,08	1,06	1,10	0,54	0,00	-1,05	-0,96	-0,59	0,43
	TrEST-B18H10	Not Match	0,00	-0,44	-0,66	-0,54	-0,66	0,00	1,02	1,08	1,13	0,42
	TrEST-A2210	No Match	0,00	0,31	0,31	1,21	2,13	0,00	1,33	1,48	0,48	0,40
	TrEST-A2763	Not Match	0,00	-0,15	-0,37	0,14	-0,31	0,00	1,39	2,66	0,65	0,40
	TrEST-A3165	Not Match	0,00	-1,25	-1,14	-0,18	-0,02	0,00	1,15	1,47	0,11	0,36
	TrEST-B33H08	Not Match	0,00	0,51	0,30	-0,21	0,45	0,00	1,13	1,14	1,14	0,35
	TrEST-A2609	No Match	0,00	2,06	2,27	0,80	-2,54	0,00	1,27	1,08	1,71	0,35
	TrEST-B18F09	No Match	0,00	-1,51	-0,78	-0,37	-0,57	0,00	0,15	1,48	1,03	0,34
	TrEST-B08A03	No Match	0,00	-1,52	-1,42	-2,05	-0,72	0,00	-0,31	-1,18	-1,06	0,34
	TrEST-A3132	No Match	0,00	-0,71	-0,41	-0,46	-0,68	0,00	0,75	1,36	1,05	0,34
	TrEST-A1802	No Match	0,00	-0,45	-0,80	0,26	-0,07	0,00	0,43	1,94	3,32	0,33
	TrEST-B20H02	Not Match	0,00	0,46	0,11	0,57	-0,64	0,00	-0,34	-1,67	-1,23	0,32
	TrEST-B06D11	Not Match	0,00	-0,92	-0,78	-0,28	0,60	0,00	-0,20	-1,13	-1,05	0,32
	TrEST-B10D03	Not Match	0,00	-0,47	-0,92	-1,00	-1,01	0,00	1,06	1,04	1,03	0,30
	TrEST-A2961	No Match	0,00	0,02	0,15	0,85	-0,47	0,00	1,63	2,01	1,82	0,30
	TrEST-A695	Not Match	0,00	1,16	0,82	0,06	0,17	0,00	0,17	1,15	1,16	0,29
	TrEST-B07F07	Not Match	0,00	-1,46	-0,62	-1,23	-1,20	0,00	-2,03	-0,95	-0,08	0,28
	TrEST-B08A04	Not Match	0,00	-0,20	-0,60	-0,24	0,39	0,00	0,43	-1,80	-1,23	0,28
	TrEST-A3905	No Match	0,00	0,94	0,68	0,16	-0,36	0,00	-1,49	-1,03	0,00	0,27
	TrEST-A2449	Not Match	0,00	-0,40	-0,38	-0,39	-0,75	0,00	0,97	1,68	1,83	0,27

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-B23A05	Not Match	0,00	-1,25	-1,34	-0,96	-1,29	0,00	-0,08	-0,16	-1,15	0,26
	TrEST-B09E01	No Match	0,00	-1,43	-1,73	-1,32	-2,69	0,00	1,37	1,33	1,47	0,26
	TrEST-A289	Not Match	0,00	-0,17	-0,35	-0,42	-0,66	0,00	0,31	2,35	0,09	0,25
	TrEST-A3016	Not Match	0,00	0,78	0,78	0,09	0,05	0,00	0,10	1,20	1,03	0,24
	TrEST-A3316	Not Match	0,00	1,19	1,21	0,88	0,40	0,00	-0,53	-1,05	-1,56	0,23
	TrEST-A58	Not Match	0,00	-0,15	-0,20	-0,25	-0,06	0,00	0,74	1,11	1,47	0,23
	TrEST-B23F08	No Match	0,00	-1,59	-1,25	-1,02	-1,17	0,00	1,03	1,05	0,73	0,23
	TrEST-A1342	Not Match	0,00	-0,37	-0,46	-0,28	-0,47	0,00	0,27	2,31	1,40	0,20
	TrEST-A3172	Not Match	0,00	0,85	1,07	1,30	1,11	0,00	-0,48	-1,27	-1,03	0,20
	TrEST-A2578	No Match	0,00	1,01	1,56	1,83	0,63	0,00	0,12	1,52	1,23	0,19
	TrEST-A3918	Not Match	0,00	-0,92	-0,90	-0,66	-0,55	0,00	0,87	1,22	1,58	0,18
	TrEST-B17F09	Not Match	0,00	0,21	-0,02	0,02	0,13	0,00	-0,16	-2,00	-1,09	0,14
	TrEST-B09D12	Not Match	0,00	-1,30	-1,13	-0,42	-1,40	0,00	0,75	1,34	1,05	0,14
	TrEST-A3612	Not Match	0,00	0,84	0,81	0,42	1,18	0,00	0,87	1,19	1,27	0,13
	TrEST-A1588	Not Match	0,00	1,22	0,96	1,53	0,47	0,00	2,02	1,53	1,03	0,12
	TrEST-A3991	Not Match	0,00	0,63	0,20	0,49	-0,61	0,00	1,20	2,63	0,05	0,11
	TrEST-A488	Not Match	0,00	1,25	1,34	0,61	0,82	0,00	-1,05	-1,16	-0,31	0,11
	TrEST-A1869	Not Match	0,00	0,81	0,65	0,33	0,41	0,00	-0,18	-1,61	-1,70	0,11
	TrEST-A612	Not Match	0,00	-0,19	-0,03	-0,48	-0,24	0,00	0,29	1,14	1,44	0,11
	TrEST-A68	Not Match	0,00	-1,78	-2,23	-0,83	0,54	0,00	-0,16	-1,02	-1,40	0,10
	TrEST-A2628	Not Match	0,00	-1,78	-1,51	-1,56	-0,08	0,00	-0,02	1,06	0,95	0,10
	TrEST-A629	No Match	0,00	0,58	0,48	0,70	0,64	0,00	1,50	1,58	1,89	0,10
	TrEST-A222	Not Match	0,00	-0,50	-0,57	-0,37	-0,07	0,00	0,86	1,02	1,18	0,09
	TrEST-A495	Not Match	0,00	0,57	0,32	1,38	0,74	0,00	1,42	1,09	1,31	0,09
	TrEST-A406	Not Match	0,00	-1,20	-0,94	-1,50	-1,97	0,00	-1,03	-1,05	-0,97	0,08
	TrEST-A1752	No Match	0,00	-1,81	-1,82	-0,24	-0,12	0,00	1,19	1,13	1,06	0,07
	TrEST-A190	Not Match	0,00	1,48	1,42	1,33	0,83	0,00	0,44	1,12	1,38	0,07
	TrEST-B22D06	Not Match	0,00	0,63	0,47	0,55	-0,33	0,00	-0,22	-1,40	-1,19	0,07
	TrEST-B07H11	No Match	0,00	0,04	0,30	0,57	0,86	0,00	-0,80	-1,20	-1,60	0,07
	TrEST-A1805	Not Match	0,00	-1,11	-1,36	-0,76	-1,62	0,00	0,40	1,07	1,15	0,06
	TrEST-A175	No Match	0,00	0,16	1,23	0,32	0,36	0,00	-1,54	-1,61	-1,58	0,05
	TrEST-A2558	Not Match	0,00	0,74	0,73	0,96	0,76	0,00	1,09	1,32	1,55	0,05
	TrEST-A549	Not Match	0,00	-0,18	-0,09	-0,75	-0,94	0,00	1,01	2,62	0,62	0,04
	TrEST-A3499	Not Match	0,00	-0,10	-0,29	-0,67	1,14	0,00	1,04	0,96	0,31	0,04
	TrEST-A3996	No Match	0,00	-0,82	0,86	2,11	-0,79	0,00	0,25	1,05	1,13	0,04
	TrEST-A4179	Not Match	0,00	0,95	1,31	1,01	0,11	0,00	0,24	0,96	1,50	0,03
	TrEST-A225	No Match	0,00	-0,29	-0,14	-0,60	0,26	0,00	1,69	0,18	0,53	0,02
	TrEST-A319	Not Match	0,00	-1,40	-1,81	-0,96	-2,02	0,00	1,07	2,25	1,61	0,01
	TrEST-A1327	No Match	0,00	1,19	1,65	1,38	1,48	0,00	2,57	1,71	0,84	0,00

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-B16E09	Not Match	0,00	1,36	1,05	0,69	0,96	0,00	-0,35	-1,09	-1,27	0,00
	TrEST-A731	No Match	0,00	0,88	0,95	0,59	0,38	0,00	1,86	1,41	1,19	0,00
	TrEST-A3962	Not Match	0,00	0,50	0,74	0,62	0,17	0,00	-0,30	-1,32	-1,18	-0,02
	TrEST-A77	Not Match	0,00	-0,28	-0,47	-0,66	-1,64	0,00	0,55	1,07	2,15	-0,02
	TrEST-A3144	Not Match	0,00	0,31	0,38	0,95	0,23	0,00	-0,75	-1,02	-1,29	-0,03
	TrEST-A1265	No Match	0,00	1,82	0,85	1,21	1,20	0,00	1,55	1,09	0,61	-0,03
	TrEST-A545	Not Match	0,00	0,88	0,95	0,91	-0,32	0,00	0,03	1,19	2,35	-0,03
	TrEST-B39F01	Not Match	0,00	0,74	1,38	0,51	-1,03	0,00	-0,96	-0,72	-1,18	-0,03
	TrEST-A3907	Not Match	0,00	0,13	0,16	0,45	-0,30	0,00	0,01	1,23	1,13	-0,04
	TrEST-A572	No Match	0,00	0,33	0,06	-0,79	0,92	0,00	-0,41	-2,12	-1,53	-0,05
	TrEST-A3055	Not Match	0,00	-0,08	0,62	0,93	1,31	0,00	0,72	1,18	2,21	-0,05
	TrEST-A2546	Not Match	0,00	-0,16	0,37	1,59	-0,76	0,00	0,19	2,76	3,57	-0,06
	TrEST-A2803	Not Match	0,00	-0,32	-0,10	-0,05	1,60	0,00	0,32	1,11	1,05	-0,06
	TrEST-B41F06	Not Match	0,00	-1,01	-1,20	-1,57	-0,54	0,00	-1,02	-1,08	-0,11	-0,07
	TrEST-A1449	Not Match	0,00	1,23	0,77	0,90	-0,10	0,00	0,32	4,47	2,60	-0,07
	TrEST-B38F03	Not Match	0,00	-0,43	0,07	-0,43	-0,94	0,00	1,07	1,08	0,40	-0,08
	TrEST-B41D11	Not Match	0,00	0,41	0,04	0,11	-0,02	0,00	-0,65	-1,82	-0,96	-0,08
	TrEST-A739	No Match	0,00	1,05	1,16	0,45	-0,61	0,00	1,17	0,83	1,74	-0,09
	TrEST-B21B07	Not Match	0,00	-0,77	-0,89	-0,78	0,34	0,00	-1,35	-1,14	-0,24	-0,10
	TrEST-A3090	Not Match	0,00	1,66	1,43	0,44	0,35	0,00	0,74	2,51	1,43	-0,10
	TrEST-A919	Not Match	0,00	-0,94	-1,41	-1,71	-1,63	0,00	0,12	1,10	1,21	-0,12
	TrEST-A3752	Not Match	0,00	0,65	0,85	0,75	0,55	0,00	-1,29	-1,20	-1,23	-0,13
	TrEST-A3844	Not Match	0,00	0,90	0,57	0,74	-0,04	0,00	-0,35	-4,07	-7,79	-0,14
	TrEST-A2525	No Match	0,00	0,26	0,06	0,29	-0,94	0,00	1,19	1,07	0,91	-0,14
	TrEST-A3655	Not Match	0,00	1,00	1,14	2,96	0,49	0,00	0,42	1,18	2,26	-0,15
	TrEST-B41D07	No Match	0,00	-1,63	-1,49	-1,08	-0,32	0,00	-0,36	-1,02	-1,36	-0,16
	TrEST-A3594	Not Match	0,00	1,18	0,63	1,18	1,33	0,00	-0,49	-0,43	-1,08	-0,16
	TrEST-A3539	Not Match	0,00	1,43	1,71	0,81	1,63	0,00	-0,63	-1,03	-1,42	-0,16
	TrEST-A4300	Not Match	0,00	0,01	0,03	0,05	-0,27	0,00	-0,73	-1,06	-1,26	-0,17
	TrEST-B33G09	Not Match	0,00	-0,28	-0,29	-0,37	-0,11	0,00	-0,27	-2,31	-1,38	-0,18
	TrEST-A4215	No Match	0,00	0,68	0,68	0,48	-1,04	0,00	-0,25	-1,76	-1,07	-0,19
	TrEST-A727	No Match	0,00	-1,52	-1,16	-0,45	-0,92	0,00	0,96	1,08	0,44	-0,19
	TrEST-B41A10	Not Match	0,00	-0,22	-1,29	-0,81	-0,54	0,00	-0,69	-1,68	-1,18	-0,20
	TrEST-A999	Not Match	0,00	-1,79	-1,50	-0,74	-0,64	0,00	1,12	1,24	3,15	-0,21
	TrEST-B07F08	Not Match	0,00	-1,07	-0,68	-0,35	-0,36	0,00	-0,82	-1,64	-1,20	-0,21
	TrEST-A1667	No Match	0,00	1,31	1,24	1,98	0,10	0,00	1,93	1,44	0,96	-0,24
	TrEST-B36E08	Not Match	0,00	-1,52	-1,04	-0,16	0,10	0,00	0,14	1,03	0,23	-0,24
	TrEST-B41B08	Not Match	0,00	-1,44	-1,55	-0,94	0,74	0,00	-0,22	-1,02	-1,25	-0,24
	TrEST-A2998	No Match	0,00	-1,04	-1,04	-1,18	0,18	0,00	-1,54	-1,04	-0,14	-0,24

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-B28C09	No Match	0,00	0,04	0,21	0,12	0,31	0,00	-1,91	-1,16	-0,42	-0,25
	TrEST-B19E10	No Match	0,00	0,06	0,07	0,07	-0,84	0,00	1,07	1,25	0,47	-0,27
	TrEST-A3457	Not Match	0,00	-0,52	-0,74	-0,51	1,06	0,00	0,93	1,27	1,03	-0,28
	TrEST-A850	Not Match	0,00	0,18	0,59	1,46	-1,28	0,00	-0,30	2,52	-1,17	-0,28
	TrEST-A78	Not Match	0,00	-0,60	-1,04	-0,43	-1,14	0,00	-0,11	-1,32	-2,35	-0,30
	TrEST-B28A02	Not Match	0,00	0,54	0,38	0,46	-0,04	0,00	-1,06	-0,93	-1,37	-0,30
	TrEST-A1559	Not Match	0,00	-1,85	-0,84	-1,88	-1,29	0,00	-0,19	-1,01	-1,16	-0,33
	TrEST-A2616	Not Match	0,00	0,79	1,20	1,17	0,62	0,00	-0,49	3,97	-0,26	-0,33
	TrEST-A4095	Not Match	0,00	0,26	0,38	0,50	1,30	0,00	-0,04	-1,08	-1,50	-0,33
	TrEST-B35D08	Not Match	0,00	0,81	1,25	0,19	0,49	0,00	-1,11	-1,06	-0,62	-0,33
	TrEST-B08C07	No Match	0,00	0,07	0,68	0,83	1,15	0,00	-1,11	-1,08	-0,96	-0,34
	TrEST-A1083	Not Match	0,00	-0,55	-0,67	-0,44	-1,12	0,00	1,01	1,07	0,71	-0,35
	TrEST-A2747	Not Match	0,00	-0,44	-0,46	-0,76	-0,52	0,00	0,96	1,19	1,26	-0,43
	TrEST-A2170	Not Match	0,00	-0,94	-1,47	-0,41	-0,38	0,00	-1,02	-1,19	-0,80	-0,44
	TrEST-A3684	No Match	0,00	-1,55	-1,53	-0,94	-1,02	0,00	1,26	1,02	1,03	-0,45
	TrEST-A573	Not Match	0,00	-0,49	-0,46	-3,53	-0,93	0,00	-0,47	-2,17	-1,11	-0,45
	TrEST-A1222	Not Match	0,00	-0,06	-0,64	-0,32	0,89	0,00	0,42	1,09	0,96	-0,45
	TrEST-B24E06	Not Match	0,00	-0,54	-0,73	-1,48	0,25	0,00	1,29	0,91	1,10	-0,46
	TrEST-B08A06	Not Match	0,00	-0,29	-0,67	-0,08	0,09	0,00	-0,55	-1,79	-1,33	-0,47
	TrEST-B19E06	Not Match	0,00	-1,53	-1,03	-0,76	-0,82	0,00	-0,37	-1,49	-1,24	-0,49
	TrEST-B12H02	No Match	0,00	0,39	0,27	0,93	0,55	0,00	-0,65	-1,19	-1,10	-0,51
	TrEST-A3956	No Match	0,00	1,36	1,23	0,78	0,19	0,00	-1,26	-0,94	-1,19	-0,56
	TrEST-B07A12	Not Match	0,00	-0,39	-0,20	-1,06	-1,04	0,00	-0,89	-1,01	-1,08	-0,56
	TrEST-B26C07	Not Match	0,00	0,48	0,57	1,39	-0,50	0,00	-1,06	-1,09	-0,34	-0,56
	TrEST-A514	Not Match	0,00	0,20	0,66	0,43	0,35	0,00	0,46	1,59	2,72	-0,57
	TrEST-A759	Not Match	0,00	0,96	1,60	1,28	0,11	0,00	-0,53	-1,02	-1,01	-0,58
	TrEST-A646	Not Match	0,00	-1,61	-1,80	-1,06	-0,56	0,00	-0,75	-1,03	-1,36	-0,58
	TrEST-B41A04	Not Match	0,00	-0,51	-0,86	-0,87	0,17	0,00	-0,44	-1,00	-1,28	-0,60
	TrEST-B14C02	Not Match	0,00	-1,20	-1,54	-0,63	-0,82	0,00	1,41	1,09	1,25	-0,63
	TrEST-A1952	Not Match	0,00	0,46	0,29	0,13	0,05	0,00	-0,68	-1,42	-1,28	-0,65
	TrEST-A2548	No Match	0,00	1,91	2,24	0,92	-0,32	0,00	1,51	1,17	0,84	-0,67
	TrEST-B33E01	No Match	0,00	-1,82	-1,54	-0,73	-0,49	0,00	-1,27	-1,13	-1,32	-0,70
	TrEST-B41B09	Not Match	0,00	0,65	0,32	0,49	-0,95	0,00	-1,07	-1,30	-1,53	-0,70
	TrEST-A567	Not Match	0,00	-0,94	-1,33	-1,13	-0,21	0,00	-0,31	-1,07	-1,20	-0,73
	TrEST-B16D08	Not Match	0,00	0,13	0,38	0,25	0,13	0,00	-1,69	-1,05	-1,37	-0,75
	TrEST-A66	No Match	0,00	1,50	1,21	0,22	0,09	0,00	4,92	1,60	1,03	-0,75
	TrEST-B27G10	No Match	0,00	1,19	0,93	0,14	-0,93	0,00	3,82	1,10	0,22	-0,76
	TrEST-A3164	Not Match	0,00	0,74	0,51	0,39	-0,20	0,00	-1,09	-0,94	-0,96	-0,77
	TrEST-A3383	Not Match	0,00	0,95	1,18	0,59	1,21	0,00	-0,95	-1,29	-1,59	-0,82

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-B19G03	Not Match	0,00	-2,33	-2,21	-2,25	-3,24	0,00	-1,36	-1,06	-0,58	-0,83
	TrEST-A3470	Not Match	0,00	-0,42	-0,64	-0,65	-0,10	0,00	-0,71	-1,01	-1,32	-0,85
	TrEST-A4027	Not Match	0,00	1,64	1,72	1,21	1,77	0,00	-0,85	-2,58	-1,24	-0,85
	TrEST-A822	No Match	0,00	0,87	0,75	0,52	-0,47	0,00	-1,82	-1,70	-1,59	-0,85
	TrEST-A3580	No Match	0,00	-0,70	-1,23	-0,96	0,05	0,00	-1,07	-1,26	-1,46	-0,87
	TrEST-B33H12	No Match	0,00	0,06	0,19	0,12	-0,17	0,00	-1,26	-1,42	-1,58	-0,87
	TrEST-B16B07	Not Match	0,00	0,79	0,32	0,54	-0,53	0,00	-1,20	-1,03	-0,14	-0,87
	TrEST-A1716	Not Match	0,00	-0,40	-0,78	-0,59	-0,95	0,00	0,21	2,24	1,23	-0,91
	TrEST-A915	Not Match	0,00	-0,26	-0,22	-0,83	-0,58	0,00	-1,02	-0,93	-1,11	-0,94
	TrEST-A4253	Not Match	0,00	-0,19	-0,71	-0,59	-0,94	0,00	-1,11	-1,25	-1,48	-0,95
	TrEST-A3444	Not Match	0,00	-0,12	-0,76	-0,32	0,80	0,00	-1,49	-0,71	-0,56	-1,01
	TrEST-B08F12	Not Match	0,00	-0,66	-0,68	-0,55	-0,52	0,00	-0,54	-1,11	-1,23	-1,02
	TrEST-A2645	Not Match	0,00	0,67	0,58	0,55	0,79	0,00	-0,24	-1,06	-1,08	-1,04
	TrEST-B18C09	Not Match	0,00	-1,02	-1,25	-0,02	-0,17	0,00	-1,07	-1,56	-0,77	-1,04
	TrEST-A3623	Not Match	0,00	0,91	0,87	0,04	0,94	0,00	-0,43	-1,14	-1,02	-1,07
	TrEST-A3894	No Match	0,00	1,30	1,15	2,23	0,27	0,00	-0,69	-0,96	-1,10	-1,08
	TrEST-A3046	Not Match	0,00	0,92	0,94	0,35	0,50	0,00	-1,18	-1,12	-1,03	-1,10
	TrEST-A3031	Not Match	0,00	1,15	1,85	1,50	-0,27	0,00	-1,11	-1,55	-2,00	-1,10
	TrEST-A3331	Not Match	0,00	-0,35	-0,23	-0,29	1,09	0,00	0,60	2,75	4,90	-1,11
	TrEST-A581	No Match	0,00	1,05	1,04	0,19	-0,13	0,00	-1,19	-0,62	-0,69	-1,12
	TrEST-A1509	Not Match	0,00	0,28	0,26	0,27	0,16	0,00	0,35	1,62	1,04	-1,17
	TrEST-A3926	Not Match	0,00	-0,91	-0,27	-0,30	-0,31	0,00	0,88	1,04	1,21	-1,18
	TrEST-A392	Not Match	0,00	1,09	0,95	0,36	-0,03	0,00	-0,43	-1,07	-1,72	-1,19
	TrEST-A616	Not Match	0,00	0,78	0,58	0,68	-0,95	0,00	-0,80	-1,08	-1,34	-1,21
	TrEST-A3184	Not Match	0,00	0,71	0,53	0,49	-0,43	0,00	-0,60	-1,12	-1,64	-1,21
	TrEST-A55	Not Match	0,00	0,45	0,74	0,73	0,87	0,00	-0,63	-1,20	-1,77	-1,23
	TrEST-A4278	Not Match	0,00	0,82	1,10	0,36	1,76	0,00	-0,90	-1,45	-1,99	-1,33
	TrEST-A3511	Not Match	0,00	2,27	2,47	2,00	2,03	0,00	-1,55	-1,54	-1,34	-1,36
	TrEST-A45	Not Match	0,00	1,32	1,53	1,43	-0,70	0,00	-1,60	-1,81	-1,70	-1,37
	TrEST-A592	Not Match	0,00	1,18	1,54	1,38	0,54	0,00	-2,67	-1,03	-0,69	-1,38
	TrEST-A2570	Not Match	0,00	1,54	0,80	1,17	-0,35	0,00	-1,75	-1,80	-1,24	-1,62
	TrEST-A336	Not Match	0,00	1,48	0,82	1,15	0,93	0,00	-2,52	-4,22	-2,97	-2,31
	TrEST-A3145	Not Match	0,00	0,43	0,12	0,52	1,28	0,00	-2,94	-3,90	-3,02	-3,08

Tabela 7: Genes de *T. reesei* cuja expressão gênica foi induzida/reprimida significativamente na cepa selvagem QM9414 de *T. reesei* e que não apresentaram mudanças significativas no mutante nocaute $\Delta Trbtf3$ segundo critérios de seleção, na condição do experimento de choque térmico após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas. Os dados de expressão são os valores de logaritmo, na base 2, da razão das fluorescências normalizadas (M). Para o selvagem (wt) e o mutante $\Delta Trbtf3$ (btf): 1 (referencia, a 28°C), 2 (15min. a 40°C), 3 (30min. a 40°C), 4 (60min. a 40°C) e 5 (60min. após o retorno a 28°C).

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5	
<u>Defesa celular</u>													
Detoxificação	TrEST-A3955	succinyl-coa:3-ketoacid-coa transferase precursor	0	1,71	1,23	0,06	-0,85	0	-0,19	-0,41	-0,12	-0,69	
<u>Divisão celular</u>													
Estrutura dos cromossomos	TrEST-A933	Histone Chaperone , Putative	0	-1,76	-1,58	-0,91	-1,62	0	0,45	0,48	0,31	0,23	
<u>Sinalização celular</u>													
Tradutores intracelulares	TrEST-A3867	Rho3 Protein	0	-1,98	-2,13	-1,74	0,97	0	-0,50	-0,99	-0,32	-0,70	
<u>Estrutura celular</u>													
Parede celular	TrEST-A3360	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel2	0	-0,88	-1,05	-1,07	-1,64	0	-0,75	-1,10	-0,84	0,60	
	TrEST-A2479	Homolog To Sporulation Specific Protein Sps2	0	1,10	1,11	0,71	0,59	0	0,17	0,52	0,31	0,45	
Citoesqueleto	TrEST-A2668	Alp11 Protein	0	-1,59	-1,83	-0,22	-0,74	0	0,35	0,44	0,07	-0,11	
<u>Metabolismo</u>													
Transporte	TrEST-B21B12	Related To Triose Phosphate/3-Phosphoglycerate/Phosphate Translocator	0	-1,66	-1,72	-0,28	-1,01	0	-0,37	-0,02	-0,08	0,44	
Açúcares e glicólise	TrEST-A2532	Putative 2-Hydroxyacid Dehydrogenase	0	1,28	0,42	0,13	0,09	0	0,41	0,06	0,57	-0,84	
	TrEST-A46	Beta Glucanosyltransferase Gel3p	0	1,24	1,58	0,38	-0,09	0	-0,50	-0,38	-0,08	0,52	
	TrEST-A705	L-xylulose reductase	0	0,94	1,24	1,31	1,66	0	-0,16	0,00	-0,42	-0,15	
Lipídeos	TrEST-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha	0	-1,67	-1,61	-1,35	-1,84	0	0,33	-0,20	-0,39	-0,18	
	TrEST-A439	Epoxide hydrolase	0	1,86	0,89	1,37	0,74	0	-0,16	-0,98	-0,57	0,50	
	TrEST-A1896	Related to acyl-CoA thiolesterase	0	1,50	1,23	1,09	1,38	0	-0,55	-0,06	-0,09	-0,31	
	TrEST-A2365	phospholipase d2	0	-0,72	-1,41	-2,52	-1,09	0	-0,28	-0,12	-0,62	-0,39	
	TrEST-B25G04	Citrate Synthase	0	-1,73	-1,49	-1,91	-0,86	0	0,00	-0,23	-0,16	0,02	
Energia e ciclo de Krebs	TrND3	NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Chain 3 (AAL74165) (T. reesei)	0	0,27	-1,63	-0,12	1,70	0	-0,15	-0,06	-0,50	0,28	
	TrND2	NADH: Ubiquinone Oxidoreductase Chain 2 (AAL74165) (T. reesei)	0	-0,17	-1,38	-1,14	1,17	0	0,44	0,44	0,19	0,84	
	TrEST-B27G05	NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit	0	-1,11	-1,36	-0,58	-0,20	0	-0,11	-0,12	0,57	0,09	
	TrEST-B06H05	citrate synthase, mitochondrial - Neurospora crassa	0	-1,17	-1,24	-1,54	-0,26	0	0,14	-0,98	-0,64	-0,10	
	TrEST-A2353	Acetyl-coenzyme A synthetase	0	-1,20	-0,91	-1,21	0,01	0	-0,77	-0,73	-0,15	-0,56	
	TrEST-A2339	Probable Aldehyde Dehydrogenase	0	-1,22	-1,44	-0,80	-1,12	0	0,12	0,19	0,01	0,27	
	TrEST-B36B09	ATP synthase D chain, mitochondrial	0	-1,35	-0,84	-1,10	-0,88	0	-0,31	-0,46	-0,61	0,12	
	TrEST-B14A01	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor	0	-2,08	-1,70	-0,79	-1,18	0	0,24	0,70	0,29	0,63	
	Aminoácidos	TrEST-A4078	Homocitrate Synthase, Mitochondrial Precursor	0	-1,14	-1,23	-0,72	-1,02	0	-0,11	-0,58	-0,30	-0,04

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Aminoácidos</i>	TrMANN	MANN	0	0,87	1,12	1,57	0,54	0	0,02	0,01	0,77	-0,33
	TrEDGL	EDGL	0	-0,48	-1,01	-0,38	-1,28	0	0,17	0,33	0,66	0,27
<i>Síntese protéica</i>												
<i>Proteínas ribossomais</i>	TrEST-A3798	40S ribosomal protein S27	0	1,64	1,09	0,74	-0,72	0	-0,45	-0,10	-0,46	-0,02
	TrEST-A2187	60S ribosomal protein L39	0	1,94	1,79	1,17	0,49	0	-0,21	-0,14	-0,75	-0,34
	TrEST-A4260	60S ribosomal protein L15	0	1,43	1,05	0,40	0,67	0	0,10	0,31	0,57	0,28
	TrEST-B14D09	Mitochondrial Ribosomal Protein S24	0	0,04	0,54	1,05	1,37	0	-0,36	-0,10	-0,09	-0,26
	TrEST-B14D06	60S Ribosomal Protein L27a	0	-0,51	-0,59	-1,18	-1,03	0	0,10	0,12	0,22	0,05
	TrEST-A1422	60s Ribosomal Protein L15	0	-0,73	-1,02	-1,26	-1,41	0	0,51	-0,08	-0,89	-0,71
	TrEST-B37B02	60S ribosomal protein L36	0	-3,10	-2,07	-2,30	-1,82	0	-0,56	-0,29	-0,29	-0,41
	TrEST-A4200	Subtilisin-like protease PR1D	0	1,45	1,13	0,04	-0,21	0	-0,42	-0,98	-0,81	-0,93
	TrEST-A4209	26S proteasome regulatory subunit-like protein	0	-1,03	-1,01	-0,78	-0,72	0	0,78	0,02	0,40	-0,06
	TrEST-A2933	ubiquitin C-terminal hydrolase L3	0	-1,16	-0,97	-1,29	0,15	0	-0,53	-0,27	-0,81	-0,58
	TrEST-B17F07	probable phosphomannomutase	0	-1,97	-2,16	-1,27	-0,72	0	-0,24	-0,37	-0,21	0,14
<i>Síntese de RNAs</i>												
<i>Fatores de transcrição</i>	TrEST-A1599	Sulfur metabolite repression control protein	0	1,06	1,41	1,24	0,43	0	-0,49	-0,59	-0,66	-0,06
	TrEST-A128	ATP-binding protein Fet5	0	0,24	1,05	0,39	-1,24	0	-0,21	-0,08	-0,24	-0,33
	TrEST-A1643	probable TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR TFIID	0	-1,10	-1,24	-1,68	-0,40	0	-0,31	-0,43	-0,51	-0,23
<i>Não classificados</i>												
<i>Outros genes</i>	TrEST-A3497	putative protein transport protein	0	-1,20	-1,06	-0,82	-0,60	0	-0,49	-0,44	-0,75	-0,66
	TrEST-A2688	Ctr1 Suppressor Protein	0	0,88	1,11	1,03	0,20	0	0,46	0,13	0,40	-0,40
	TrEST-B14B06	GTP-Binding Nuclear Protein Spi1	0	0,83	1,34	0,79	1,63	0	0,36	0,21	0,48	-0,29
	TrEST-A808	Ran/Spi1 Binding Protein	0	-1,67	-2,07	-2,57	-2,35	0	0,04	0,41	0,77	0,29
	TrEST-A355	Erv2 Protein Precursor	0	-1,62	-2,01	-1,64	-0,45	0	-0,71	-0,65	-0,05	0,55
	TrEST-A76	ER Membrane Protein , Putative	0	0,02	0,28	0,55	-1,59	0	-0,41	-0,33	-0,49	-0,27
	TrEST-A1902	Aldo/keto reductase family oxidoreductase	0	1,80	1,28	0,96	-0,19	0	-0,52	-0,63	-0,42	-0,22
	TrEST-A690	Related to Tol Protein - N. crassa Emb[CAB98221.1]	0	-2,24	-2,68	-1,79	-2,43	0	0,30	0,38	0,24	0,72
	TrEST-A2513	Squalene Epoxidas	0	-1,00	-0,92	-1,08	-1,17	0	0,15	0,60	0,62	0,21
<i>Desconhecida</i>												
<i>Relacionados a ORFs previstas</i>	TrEST-A566	Hypothetical Protein	0	3,01	3,04	2,71	2,44	0	-0,17	-0,53	-0,10	-0,10
	TrEST-A2415	Conserved Hypothetical Protein	0	2,25	1,54	0,22	0,19	0	-0,30	-0,60	-0,29	-0,66
	TrEST-A277	Hypothetical Protein	0	2,21	2,26	3,36	1,19	0	-0,80	-0,13	-0,86	-0,10
	TrEST-A2675	Hypothetical Protein	0	2,01	1,62	1,69	2,34	0	0,69	0,18	0,13	0,45
	TrEST-A4005	Hypothetical Protein MG01306.4	0	1,86	1,65	1,13	0,88	0	0,67	0,51	0,28	0,18

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
Relacionados a ORFs previstas	TrEST-A3494	Hypothetical Protein	0	1,77	1,36	2,43	2,39	0	-0,32	-0,13	-0,41	0,31
	TrEST-B08A05	Hypothetical Protein MG00373.4	0	1,65	1,41	1,53	0,89	0	-0,33	-0,59	-0,89	0,09
	TrEST-A2264	Hypothetical Protein MG01070.4	0	1,57	1,26	0,43	-0,59	0	-0,01	-0,41	-0,44	-0,62
	TrEST-B18F01	Putative Protein	0	1,41	1,65	0,84	0,48	0	-0,16	-0,98	-0,57	0,29
	TrEST-A1185	Hypothetical Protein FG06189.1	0	1,28	0,92	1,39	-0,04	0	-0,31	-0,01	-0,45	-0,10
	TrEST-A459	Hypothetical Protein FG08467.1	0	1,10	1,30	0,55	-0,77	0	0,22	-0,57	-0,11	-0,78
	TrEST-A3858	Hypothetical Protein MG07737.4	0	1,08	1,07	0,53	0,18	0	-0,04	-0,29	-0,76	-0,97
	TrEST-B17E02	Hypothetical Protein MG00978.4	0	1,06	1,03	0,87	-0,88	0	-0,46	-0,28	-0,64	-0,31
	TrEST-A461	Hypothetical Protein	0	1,04	1,12	1,36	1,29	0	-0,21	-0,30	-0,38	-0,50
	TrEST-A1994	Predicted Protein	0	0,82	1,09	1,06	-0,16	0	-0,94	-0,13	-0,05	-0,45
	TrEST-B07C01	Hypothetical Protein MG02477.4	0	0,76	0,72	1,72	4,04	0	-0,60	-0,85	-0,45	-0,21
	TrEST-A2637	Hypothetical Protein FG08396.1	0	-0,03	-1,11	-1,69	-0,62	0	0,70	0,21	0,43	0,82
	TrEST-A1738	Hypothetical Protein FG02244.1	0	-0,13	-1,01	-1,03	0,79	0	0,46	-0,16	-0,33	-0,16
	TrEST-A3561	conserved Hypothetical Protein	0	-0,85	-0,92	-1,30	-1,62	0	-0,34	-0,96	-0,87	-0,78
	TrEST-B34A02	Predicted protein	0	-0,97	-1,57	-1,14	-0,75	0	-0,22	-0,06	-0,44	-0,16
	TrEST-B09A05	Hypothetical Protein MG02687.4	0	-0,97	-1,51	-1,26	-0,31	0	-0,47	-0,57	-0,59	-0,02
	TrEST-A1872	Hypothetical Protein FG08535.1	0	-1,03	-1,40	-0,41	-0,27	0	-0,22	-0,03	-0,14	0,57
	TrEST-A4134	Hypothetical Protein MG10844.4	0	-1,10	-1,28	-1,73	-1,88	0	-0,53	-0,55	-0,05	-0,36
	TrEST-A2386	Hypothetical Protein FG04031.1	0	-1,12	-1,19	-0,37	-0,52	0	0,30	0,09	0,39	-0,32
	TrEST-A173	Hypothetical Protein MG02767.4	0	-1,13	-0,98	-1,65	0,54	0	0,95	0,73	0,83	0,12
	TrEST-A326	Hypothetical Protein FG09503.1	0	-1,16	-1,44	-0,34	-1,07	0	0,36	0,13	0,12	-0,41
	TrEST-A4221	Hypothetical Protein FG03903.1	0	-1,28	-1,59	-0,98	-1,28	0	0,21	0,13	0,36	-0,18
	TrEST-A4163	Hypothetical Protein MG01717.4	0	-1,30	-1,22	-1,86	-0,93	0	-0,46	-0,98	-0,72	-0,10
	TrEST-A2526	Hypothetical Protein MG01985.4	0	-1,37	-1,15	-1,20	-1,13	0	-0,25	-0,44	-0,64	-0,19
	TrEST-B38G12	Hypothetical Protein	0	-1,49	-1,37	-1,29	-2,25	0	0,10	0,29	0,55	0,27
	TrEST-A40	Hypothetical Protein MG00515.4	0	-1,54	-1,25	-0,34	-0,63	0	0,06	0,59	0,99	0,38
	TrEST-A2257	Hypothetical Protein	0	-1,55	-1,37	-2,22	-2,22	0	0,22	0,64	0,05	0,44
	TrEST-A440	Hypothetical Protein	0	-1,75	-2,00	-1,23	-0,31	0	-0,25	-0,61	-0,97	-0,02
	TrEST-B20D08	Hypothetical Protein	0	-2,23	-1,64	-1,55	0,22	0	-0,79	-0,28	-0,35	-0,28
	TrEST-B24A06	Hypothetical Protein MG04622.4	0	-2,42	-2,25	-2,12	-1,97	0	-0,12	-0,93	-0,52	0,15
	TrEST-A1723	Predicted Protein	0	1,73	2,20	2,14	1,06	0	-0,30	-0,07	0,03	0,12
	TrEST-A935	Predicted Protein	0	-0,92	-1,13	-1,06	-1,04	0	-0,27	-0,44	-0,41	-0,15
	TrEST-A3354	prohibitin	0	-1,01	-1,35	-1,23	3,09	0	0,36	-0,99	-0,26	-0,01
	TrEST-A4092	Predicted Protein	0	-1,03	-1,07	-1,12	-1,64	0	0,26	0,78	0,03	0,20
	TrEST-B24E01	Predicted Protein	0	-1,29	-1,57	-0,62	-0,35	0	0,57	0,57	0,79	-0,01
Sem sequência similar	TrEST-A3	Not Match	0	2,11	1,37	0,14	0,73	0	0,03	0,69	0,39	-0,24
	TrEST-B11G10	Not Match	0	2,08	2,06	2,82	4,18	0	0,34	0,15	0,08	0,84
	TrEST-A2607	Not Match	0	2,02	1,39	0,20	-0,35	0	-0,87	-0,55	-0,56	-0,40
	TrEST-A2902	Not Match	0	1,71	2,06	1,82	1,29	0	-0,17	-0,10	-0,01	-0,20

Função	Clone ID & Identificação		wt1	wt2	wt3	wt4	wt5	btf1	btf2	btf3	btf4	btf5
<i>Sem sequência similar</i>	TrEST-A1775	Not Match	0	-1,40	-1,51	-1,01	-1,48	0	0,40	-0,20	-0,27	-0,51
	TrEST-A879	Not Match	0	-1,42	-1,18	-0,02	-0,60	0	-0,52	-0,06	-0,25	-0,40
	TrEST-B12A04	Not Match	0	-1,46	-1,69	-1,49	-0,56	0	0,10	-0,28	-0,95	-0,55
	TrEST-B25F06	Not Match	0	-1,59	-1,92	-0,99	-0,86	0	0,25	0,47	0,56	0,30
	TrEST-A2951	Not Match	0	-1,61	-0,78	-0,28	2,10	0	0,05	0,27	0,67	-0,02
	TrEST-B41F03	Not Match	0	-1,63	-1,20	-0,55	-0,57	0	-0,78	-0,77	-0,06	0,37
	TrEST-A977	Not Match	0	-1,63	-1,55	-1,25	-1,39	0	-0,49	-0,21	-0,38	-0,48
	TrEST-A4281	Not Match	0	-1,76	-1,18	-1,03	-1,47	0	-0,51	-0,25	-0,16	0,22
	TrEST-A2765	Not Match	0	-1,77	-1,25	-0,92	-0,12	0	0,25	-0,51	-0,39	0,12
	TrEST-B36E11	Not Match	0	-1,78	-0,97	-1,09	0,02	0	-0,99	-0,76	-0,80	-0,69
	TrEST-B08G12	Not Match	0	-1,80	-1,36	-0,77	-0,63	0	0,19	0,48	0,23	0,32
	TrEST-A2686	Not Match	0	-1,82	-1,83	-0,35	-0,30	0	0,42	0,85	0,63	-0,16
	TrEST-A814	Not Match	0	-1,83	-1,73	-0,70	-0,83	0	-0,03	-0,70	-0,36	0,02
	TrEST-A1822	No Match	0	-1,88	-1,72	0,00	-0,58	0	-0,04	-0,23	-0,18	-0,35
	TrEST-B27B11	Not Match	0	-1,89	-0,98	-3,49	-1,23	0	-0,39	-0,45	-0,18	-0,14
	TrEST-B24F05	Not Match	0	-1,99	-1,95	-1,54	-1,21	0	-0,61	-0,46	-0,48	-0,62
	TrEST-B16D12	Not Match	0	-2,04	-1,14	-0,48	-0,22	0	-0,26	0,05	-0,04	0,26
	TrEST-B10B09	Not Match	0	-2,16	-0,94	-0,54	-0,68	0	0,45	0,29	0,26	-0,46
	TrEST-A3026	Not Match	0	-2,37	-1,18	-2,03	-1,14	0	0,10	0,09	0,47	-0,39
	TrEST-B20G08	Not Match	0	-2,84	-1,84	-1,58	-2,34	0	-0,47	-0,32	-0,26	-0,37
	TrEST-A3267	Not Match	0	-3,09	-2,97	-2,70	-4,33	0	0,11	0,87	0,49	-0,46

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Erik Cendel Saenz Tejada

Local e Data de Nascimento: Lima-Peru, 08 de setembro de 1974.

EDUCAÇÃO

➤ ESCOLAR

Colégio “Barboncitos 3042”. Lima-Peru. 1986

Colégio “Fé y Alegría”. Lima-Peru. 1991.

➤ GRADUAÇÃO

Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima-Perú. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Bacharel em Biologia. Lima-Peru, 2000.

Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima-Perú. Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas. Licenciado em Biologia. Lima-Peru, 2003.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

- New Approaches in Drug Design. Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo, 2005.
- Principles of Gene Regulation in Bacteria. Instituto de Ciências Biomédicas de São Paulo, 2005.
- Curso de Bioinformática: Investigando seqüências de DNA e Proteínas. Instituto de Biociências de Botucatu –Unesp, 2002.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, FAPESP, 2006.

EVENTOS CIENTÍFICOS

- **SAENZ, E.C.T., FERREIRA, A.J., VENCIO, R.Z.N., DORRY, H.F.** GLOBAL TRANSCRIPTIONAL RESPONSE OF THE FILAMENTOUS FUNGI *Trichoderma reesei* TO HEAT SHOCK STRESS. X PABMB Congress. Reunião Anual da Sociedade Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Águas de Lindóia-SP, Brasil, Julho, 2006.
- **SAENZ, E.C.T., BONACCORSI, E.D., DORRY, H. F.** SEQUENCING AND CHARACTERIZATION OF THE SREBP CLEAVAGE-ACTIVATING PROTEIN (SCAP) OF *Trichoderma reesei*. Reunião de Genética de Microrganismos – REGEM. São Pedro-SP, Brasil, Março, 2005.
- **SAENZ, E.C.T., RAMOS, A., DORRY, H.F.** THE EFFECT OF DISRUPTION OF RNA-POLYMERASE B TRANSCRIPTION FACTOR 3 (BTF3) ON THE EXPRESSION OF INDUCIBLE GENES IN THE FILAMENTOUS FUNGUS *Trichoderma reesei*. X PABMB Congress. Panamerican Association for Biochemistry and Molecular Biology. Buenos Aires. Argentina. Dezembro 2005. Apresentação oral.
- **SAENZ, E.C.T., DORRY, H. F.** SEQUENCING AND DISRUPTION OF THE RNA POLYMERASE B TRANSCRIPTION FACTOR 3 (BTF3) OF *Trichoderma reesei*. Reunião Anual da Sociedade Brasileiro de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq. Águas de Lindóia-SP, Brasil, Julho, 2005. Apresentação oral.
- **SAENZ, E.C.T., BORDA, C.C., GUTARRA, L., PRIOU, S.** DETERMINAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE *Ralstonia solanasearum* NA SEMENTE VERDADEIRA DA BATATA (TPS) E SEMENTE DE TOMATE. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Uberlândia-MG, Brasil, agosto 2003
- **SAENZ, E.C.T., BORDA, C.C., GUTARRA, L., PRIOU, S.** DEVELOPMENT OF A DIAGNOSTIC TEST BASED ON THE POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) TO DETECTED *Ralstonia solanasearum* AND TUBERCULO-SEED AND INFECTED SOIL. XXXVI Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Uberlândia-MG, Brasil, agosto 2003