UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

REGULAÇÃO DA RESPOSTA TRANSCRICIONAL A ESTRESSES AMBIENTAIS EM FUNGOS: ANÁLISE DE "MICROARRAYS" DE CDNAS DE *TRICHODERMA REESEI.*

ARI JOSÉ SCATTONE FERREIRA

TESE DE DOUTORADO

HAMZA EL-DORRY

SÃO PAULO

20 DE SETEMBRO DE 2005

"Esse não é o fim. Não é nem mesmo o início do fim. Mas, talvez, seja o fim do início." *Winston Churchill*

Aos mestres que me enriqueceram com seus ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao mestre que me ensino u muito sobre Bioquímica e Biologia Molecular e também sobre como ser um ser humano melhor, ainda que tenha que trilhar um longo caminho para me equiparar a ele. Infelizmente, o Professor Roberto Vicente Santelli não está mais conosco há alguns anos, mas nunca me esquecerei de suas "lições de vida" e serei sempre grato por ter tido o privilégio de conhecê-lo.

Devo ao Prof. Dr. Hamza El-Dorry minha intensa gratidão pela oportunidade de desenvolver vários projetos de pesquisa sob sua orientação durante os últimos oito anos nos quais pude aprender diferentes técnicas de Biologia Molecular e interagir com diversos tópicos de pesquisa, aperfeiçoando minha formação como pesquisador. Nunca me esquecerei de nossas famosas discussões sobre os mais variados assuntos e sob as mais variadas intensidades. Espero que continuemos como sempre: que da tormenta siga a calmaria e que as tempestades em copo d'água não se alastrem para além de suas bordas.

Agradeço enormemente a todos os meus amigos e colegas de laboratório sem os quais não poderia ter realizado os diversos projetos em que me envolvi durante todo o período da pós-graduação. Adriano, Augusto, Daniella, Eric, Felipe, Izaura, Luci, Marluce, Nathalie, Ribamar, Wilton e Zilda, não poderia ter esperado por melhores companheiros nessa empreitada. Agradeço igualmente aos mais recentes amigos do laboratório que me deram renomado ânimo nos últimos anos do doutorado: César, Erik, Estela e Fabiana.

O trabalho desenvolvido especificamente para essa tese foi realizado com a cooperação do grupo de pesquisadores responsável pelo laboratório CAGE – *Center for Analysis of Gene Expression* – do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Dedico a todos os participantes desse grupo meus mais sinceros agradecimentos pelo indispensável apoio que me deram, em especial aos Profs. Drs. Aline M. da Silva, Eduardo M. R. Reis, Gláucia M. Souza e Suely L. Gomes e aos alunos / pesquisadores Cristina Martinez, Flávia Rocha, Luciana Matzouranis, Paulo Zaini, Ricardo Vêncio, Sarah Cavalcanti e Tie Koide.

Existem aqueles que foram indispensáveis ao desenvolvimento desse trabalho por estarem presentes ao meu lado durante todo esse período me apoiando ou criticando, me entusiasmando ou consolando, mas principalmente sempre me ensinando e ouvindo.

Não acho ser possível descrever o quão grato sou a meus mestres "amigos do peito". Alexandra, Adriana, Augusto, Celize, Denise, Joice, João e Zilda, a cada um devo um pouco de minha vida e espero que esse débito possa crescer indefinidamente. A minha maior amiga e irmã, Ana Luiza, não há como agradecer por tudo o que fez por mim além de prometer que sempre poderá contar comigo incondicionalmente.

Os maiores mestres, entretanto, são aqueles que iniciaram sua tarefa em meu primeiro dia de vida. Muitas vezes só compreendi suas lições através duma reflexão após anos. Mesmo sabendo que seriam inicialmente incompreendidos, não vacilaram na aplicação de seus ensinamentos dia após dia. A meus pais, Aristides e Zenaide, sou eternamente grato por toda uma vida de lições. Espero nalgum dia ser capaz de compreendê-las totalmente e repassá-las tão bem quanto o fizeram. Aos dois, meu infindável amor.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.	i
LISTA DE TABELAS.	ii
Abreviaturas e Siglas.	iii
RESUMO.	iv
ABSTRACT.	vi
1 – Introdução.	1
2 – REVISÃO DA LITERATURA.	3
 2.1 A resposta comum a estresses. 2.2 Resposta ao choque térmico. 2.3 Resposta à presença de íons de cádmio. 2.4 Resposta à limitação de nutrientes. 2.5 O modelo celular <i>Trichoderma reesei</i>. 	3 7 10 12 14
3 – OBJETIVOS.	17
4 – Materiais e Métodos.	18
4.1 Microorganismos.4.2 Soluções e meios de cultura.4.3 Condições de cultivo de <i>T. reesei</i>.	18 18 19
4.3.1 Condições gerais. 4.3.2 Cultivos com sulfato de cádmio (II). 4.3.3 Cultivos de choque térmico. 4.3.4 Cultivos com limitação de fonte de nitrogênio. 4.3.5 Cultivos com limitação de fonte de carbono.	19 20 22 23 23
4.4 Técnicas Gerais de Biologia Molecular. 4.5 Produção de microarrays de <i>T. reesei</i> .	24 25
 4.5.1 Materiais e condições para a impressão de lâminas de microarray. 4.5.2 Síntese e marcação de cDNAs para hibridização de microarrays. 	25 28
4.5.3 Hibridização e leitura das lâminas de microarrays.	31
4.6 Extração e analise dos dados de microarrays.	32
4.6.1 Extração e normalização dos dados de fluorescência. 4.6.2 Determinação dos genes diferencialmente expressos. 4.6.3 Agrupamento dos genes diferencialmente expressos pelo perfil transcricional.	32 33 35
4.7 Validação dos resultados de microarray.4.8 Reanotação do banco de ESTs de <i>T. reesei</i>.	36 36

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Efeitos do choque térmico a 40°C sobre <i>T. reesei</i> .	39
 5.1.1 Efeito da temperatura de 40°C sobre o crescimento de T. reesei. 5.1.2 Resposta transcricional de T. reesei ao choque térmico a 40°C. 	39 41
5.2 Efeitos da presença de cádmio (II) no meio sobre T. reesei.	55
5.2.1 Efeito de cádmio (II) sobre o crescimento de T. reesei. 5.2.2 Resposta transcricional de T. reesei à adição de cádmio (II) ao meio.	55 60
5.3 Efeitos da ausência de fonte de nitrogênio, e sua reposição, sobre <i>T. reesei</i> .	69
 5.3.1 Efeito da ausência de fonte de nitrogênio sobre o crescimento de T. reesei. 5.3.2 Resposta transcricional de T. reesei à ausência de fonte de nitrogênio e a sua subseqüente reposição. 	69 70
5.4 Efeitos da ausência de fonte de carbono, e sua reposição, sobre <i>T. reesei</i> .	86
5.4.1 Efeito da ausência da fonte de carbono sobre o crescimento de T. reesei. 5.4.2 Resposta transcricional de T. reesei à ausência de fonte	87
de carbono e à sua subseqüente reposição.	90
5.5 Comparação entre as respostas transcricionais de <i>T. reesei</i> a diferentes estresses ambientais.	100
6 – Conclusão e Perspectivas	112
7 – BIBLIOGRAFIA	114
APÊNDICE	121

LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1: Eletroforese em gel de agarose de cDNAs amplificados e purificados para a confecção de microarrays de *T. reesei*.
- Figura 2: Limites de cortes locais dos valores de M em função de A a partir de dados de hibridizações homotípicas (*HT Self-Self*).
- Figura 3: Curva de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* nas temperaturas de 28 e 40°C.
- Figura 4: Velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* em meio completo a 28 e 40°C.
- Figura 5: Curva de crescimento de cultura de *T. reesei* submetida a choque térmico a 40°C para o estudo da resposta transcricional.
- Figura 6: Distribuição dos genes induzidos e dos reprimidos para cada condição de estudo do choque térmico a 40°C.
- Figura 7: Grupos de genes de *T. reesei* com perfis transcricionais semelhantes em resposta ao choque térmico a 40°C.
- Figura 8: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pelo choque térmico a 40°C.
- Figura 9: Crescimento de *T. reesei* em meio sólido na presença de CdSO₄.
- Figura 10: Curvas de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* na presença ou ausência de CdSO₄.
- Figura 11: Velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* em meio mínimo na presença ou ausência de CdSO₄.
- Figura 12: Curvas de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* na presença ou ausência de 250 **m**mol.L⁻¹ CdSO₄.
- Figura 13: Velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* na presença ou ausência de 250 **m**mol.L⁻¹ CdSO₄.
- Figura 14: Curva de crescimento da cultura de T. reesei submetida à adição de cádmio (II) ao meio para o estudo da resposta transcricional.
- Figura 15: Distribuição dos genes induzidos e dos reprimidos para cada condição de estudo da adição de cádmio (II) ao meio.
- Figura 16: Grupos de genes de *T. reesei* com perfis transcricionais semelhantes em resposta à adição de cádmio (II) ao meio.
- Figura 17: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pela adição de cádmio (II) ao meio.
- Figura 18: Curvas de crescimento e consumo de glicose para cultura de *T. reesei* em meio mínimo sem fonte de nitrogênio.
- Figura 19: Curva de crescimento da cultura de *T. reesei* submetida à ausência de fonte de nitrogênio para o estudo da resposta transcricional.
- Figura 20: Distribuição dos genes induzidos e dos reprimidos para cada condição de estudo da ausência e reposição de fonte de nitrogênio.
- Figura 21: Grupos de genes de *T. reesei* com perfis transcricionais semelhantes em resposta à ausência ou à reposição de fonte de nitrogênio.
- Figura 22: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pela ausência ou reposição de fonte de nitrogênio

Figura 23:	Curvas de crescimen	to e consumo de glicos	e para cultura de T.	reesei
	em meio mínimo na	presença ou ausência do	e fonte de carbono.	

- Figura 24: Velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* após o período de ausência de fonte de carbono.
- Figura 25: Curva de crescimento da cultura de *T. reesei* submetida à ausência de fonte de carbono para o estudo da resposta transcricional.
- Figura 26: Distribuição dos genes induzidos e dos reprimidos para cada condição de estudo da ausência e reposição de fonte de carbono.
- Figura 27: Grupos de genes de *T. reesei* com perfis transcricionais semelhantes em resposta à ausência ou à reposição de fonte de carbono.
- Figura 28: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pela ausência ou reposição de fonte de carbono.
- Figura 29: Grupos de genes de *T. reesei* com perfis transcricionais semelhantes em resposta tanto ao choque térmico quanto à adição de cádmio (II).
- Figura 30: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pelo choque térmico e pela adição de cádmio (II) ao meio
- Figura 31: Padrão de expressão gênica de alguns genes de *T. reesei* em função de diferentes estresses ambientais, analisado através de Northern blots.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Rendimento de marcação dos cDNAs para análise do perfil
	transcricional de T. reesei por microarray em resposta a estresses.
Tabela 2:	Número de genes para cada condição de estudo da análise da resposta
	transcricional ao choque térmico a 40°C.
Tabela 3:	Número de genes para cada condição de estudo da análise da resposta
	transcricional à adição de cádmio (II) ao meio.
Tabela 4:	Número de genes para cada condição de estudo da análise da resposta
	transcricional à ausência e à reposição de fonte de nitrogênio.
Tabela 5:	Número de genes para cada condição de estudo da análise da resposta
	transcricional à ausência e à reposição de fonte de carbono.
Tabela 6:	Distribuição das funções celulares dos genes de T. reesei cuja expressão
	foi alterada pelo choque térmico a 40°C e pela presença de cádmio (II)
Tabela 7:	Genes cuja expressão foi afetada pela adição de cádmio (II) ao meio, pelo
	choque térmico a 40°C e por hipóxia / anóxia transiente.
Tabela 8:	Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em
	resposta ao choque térmico a 40°C.
Tabela 9:	Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em
	resposta à adição de cádmio (II) ao meio.
Tabela 10	: Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em
	resposta à ausência ou à reposição de fonte de nitrogênio.
Tabela 11	: Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em
	resposta à ausência ou à reposição de fonte de carbono.

ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
ATP (seguido por nº)	Subunidade da ATP sintase
cAMP	AMP cíclico
cDNA	DNA complementar
CoA	Coenzima A
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGAD	The Expressed Gene Anatomy Database
EST	Expressed Sequence Tag
kb ou kpb	Quilo (pares de) bases
kDa	Quilo Dalton
mRNA	RNA mensageiro
NAD ou NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídio (oxidada e reduzida)
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Par(es) de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
rRNA	RNA ribossômico
SGD	Saccharomyces Genome Database
SOM	Mapas auto-organizáveis
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
tDNA	
IKINA	RNA transportador

RESUMO

A grande diversidade de organismos que hoje encontramos em nosso planeta se deve à adaptação às diferentes condições ambientais de cada nicho ecológico existente e à resposta adaptativa originária das mudanças dessas condições. Pode-se considerar que a etapa inicial do processo de adaptação seja a reprogramação da expressão gênica dum organismo como resposta imediata a uma nova condição ambiental. De fato parte do genoma de todos os organismos é dedicada à codificação de proteínas relacionadas ao controle dos efeitos nocivos criados por diferentes tipos de estresse como choque térmico, ou osmótico, estresse oxidativo, ou aqueles resultantes de altas concentrações de íons de metais pesados. De forma semelhante, a ausência, ou exaustão, de fontes de macronutrientes, como carbono, nitrogênio, fósforo ou enxofre, exige uma reorganização do padrão de expressão gênica para adequação às novas condições nutricionais, também sendo considerada um estresse ambiental.

Visto que a maioria dos estudos de análise da expressão gênica em resposta a estresses ambientais realizados em fungos se refere às leveduras unicelulares *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizossacharomyces pombe*, nos propusemos a estudar tal resposta no fungo filamentoso multicelular *Trichoderma reesei*. Dessa forma analisamos por meio da técnica de "microarrays" de cDNAs a expressão gênica de aproximadamente 2.000 transcritos desse organismo em resposta a choque térmico, à alta concentração de íons de cádmio II e à ausência de fonte de carbono, ou nitrogênio, por período de 2 horas.

Em geral, as respostas aos estresses se compuseram da regulação negativa da transcrição de genes envolvidos em processos com alta demanda de energia como a síntese protéica, evidenciada pela repressão da expressão de genes de proteínas ribossomais e do anabolismo. Em contrapartida, genes codificando proteínas relacionadas à defesa celular, como chaperonas, tiveram sua expressão induzida. As respostas ao choque térmico e ao tratamento com cádmio II se mostraram bastantes semelhantes, enquanto a ausência de fonte de nitrogênio também induziu a expressão de genes relacionados à degradação de proteínas e nucleotídeos. Genes relacionados à utilização de reservas lipídicas foram induzidos tanto na ausência de fonte de carbono quanto de nitrogênio. Foram identificados reguladores transcricionais e componentes de vias de sinalização celular com expressão

diferenciada frente a esses diferentes estresses ambientais. A maior parte dos genes cuja expressão se alterou em função dos diversos estresses ambientais estudados ainda não tem função celular conhecida, sendo essa observação, portanto, uma contribuição importante para sua anotação funcional.

Uma vez que o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* vem se tornando um organismo de valor biotecnológico por sua característica de alto poder de síntese e secreção de proteínas, esperamos que os dados apresentados forneçam um maior entendimento dos processos celulares desse organismo e possam subsidiar futuros projetos visando uma melhor adaptação do mesmo a ambientes industriais.

ABSTRACT

The diversity of organisms found today in our planet is due to their adaptation to different environmental conditions present in each ecological niche, and to the adaptative response originated from changes in those conditions. The first step in the adaptation process is considered to be the reprogramming of gene expression as an immediate response to a new environmental condition. A fraction of the genome from all living organisms is dedicated to encoding proteins related to the control of deleterious effects created by different types of stresses like heat or osmotic shock, oxidative stress, or by the presence of high concentrations of heavy metal ions. Similarly, the absence or exhaustion of macronutrients as carbon, nitrogen, phosphorous or sulphur sources demand new patterns of gene expression in order to the organisms survive in a limited nutritional condition, which is also considered an environmental stress.

Once the gene expression analyses in fungi as a response to environmental stresses have been widely studied in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizossacharomyces pombe*, we proposed to study such response in the multicellular filamentous fungus *Trichoderma reesei*. To this purpose, we have utilized the cDNA microarray technique to analyze the gene expression of approximately 2,000 *T. reesei* transcripts in response to heat shock, to high concentration of cadmium II ions and to a 2-hour absence of carbon or nitrogen source.

As a general response to the four studied stresses, we observed on one hand a negative transcriptional regulation of genes involved in processes that demand great amounts of energy, i.e. a negative regulation of protein synthesis, indicated by strong repression of ribosomal protein genes transcription, as well as a negative regulation of anabolism. On the other hand, genes that encode proteins associated with cellular defense, like chaperones, had their expression induced. The responses to heat shock and to cadmium poisoning were quite similar while nitrogen source absence also induced the expression of genes related to protein and nucleotide degradation. Genes implicated in the consumption of lipid reserves were induced in the absence of both carbon and nitrogen sources. We identified some transcription regulators as well as components of signal transduction pathways that have differential patterns of gene expression caused by these different

environmental stresses. Most of the genes that had their expression altered in response to the studied environmental stresses has no known function yet. Their expression patterns towards such stresses are therefore an important contribution to their functional annotation.

Since the filamentous fungus *Trichoderma reesei* has become a microorganism of biotechnological value for its high capacity of synthesis and secretion of proteins, we expect that the data presented on this work can provide a better understanding of its cellular processes and may support future projects for a better adaptation of this organism to industrial conditions.

1 – INTRODUÇÃO.

Um dos desafios permanentes encontrados por microorganismos dispersos nos diversos nichos ambientais da natureza é a manutenção da homeostase interna apesar de flutuações abruptas nas condições externas: mudanças repentinas no ambiente externo podem perturbar e desacoplar diversas funções celulares internas e prevenir o crescimento e desenvolvimento. Dessa forma, microorganismos devem se adaptar rapidamente à sua vizinhança por meio de um ajuste de seu meio interno para funcionar ante as novas condições. Ainda que já tenham sido realizados estudos sobre células crescendo em condições ótimas, o desenvolvimento das técnicas de análise genômica nos permite iniciar o entendimento da regulação e extensão das respostas a condições subótimas, condições essas que foram responsáveis pela evolução dos mais que diversos organismos hoje existentes.

Todas as células sentem e reagem a mudanças em seu meio ambiente. Microorganismos de vida livre, em particular, se deparam com flutuações nas concentrações de nutrientes, no pH, na temperatura e na osmolaridade externa, assim como, podem sofrer exposições à radiação ultravioleta e a uma grande diversidade de substâncias e compostos potencialmente tóxicos, como íons de metais pesados e xenobióticos. Respostas apropriadas a tais estresses ambientais devem, portanto, ser induzidas para a sua sobrevivência e contínua proliferação. Assim, a caracterização minuciosa das repostas, gerais e específicas, dos mecanismos envolvidos na percepção desses estresses e vias de tradução de sinal que a transmitem dentro das células, e as modificações compensatórias daí resultantes em termos de expressão gênica e de modificações fisiológicas são essenciais para um maior entendimento de como as células são capazes de se adaptar e sobreviver mesmo sob condições ambientais fora das ideais (Chen, Toone *et al.*, 2003).

A exposição a baixos níveis de um estresse normalmente dispara uma resposta adaptativa que acaba por resultar numa resistência transiente a níveis mais elevados do mesmo estresse. Essa adaptação a um estresse também pode levar a uma maior resistência a outros tipos de estresse, no que é denominado de proteção cruzada (Jamieson, 1992; Lee, Lin *et al.*, 1995; Moradas-Ferreira e Costa, 2000). As respostas adaptativas são temporárias e requerem a síntese de novas proteínas, o que indica que uma mudança no perfil geral de

1

transcrição é crítica para tal fim. O fenômeno de proteção cruzada ainda sugere que diferentes condições de estresse podem ativar mecanismos de defesa similares, ou que há uma resposta geral a estresses que confere de forma mais ampla um nível básico de proteção.

Uma característica recorrente das repostas em termos de expressão gênica a mudanças ambientais é que a maioria dessas respostas, com exceção das respostas a limitação de nutrientes, é transiente (Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Causton, Ren *et al.*, 2001). O período transiente de grandes mudanças na expressão gênica representa uma fase de adaptação, durante a qual as células ajustam seus sistemas internos para funcionarem sob a nova condição. Assim, existe uma correlação direta entre a magnitude da mudança ambiental e a duração da fase de adaptação (Gasch, Spellman *et al.*, 2000).

Sob condições que não permitam o crescimento celular, como limitação nutricional, as células entram em estado quiescente esperando uma transição para um ambiente contendo nutrientes (Werner-Washburne, Braun *et al.*, 1996). Nessa condição, as mudanças na expressão gênica não são transientes, mas persistem por longos períodos (Gasch, Spellman *et al.*, 2000). O padrão de proteínas traduzidas é essencialmente o mesmo do observado em células em divisão e respiração, apesar das diferenças na expressão gênica (Fuge, Braun *et al.*, 1994). Portanto, para células quiescentes, a regulação traducional é provavelmente um mecanismo importante no controle da síntese protéica.

Quando células crescendo em condições subótimas são devolvidas a condições mais apropriadas a seu crescimento, a maioria dos níveis dos transcritos é ajustada rapidamente ao programa necessário para o crescimento em condições ótimas (Gasch, Spellman *et al.*, 2000).

De forma contrastante, quando células quiescentes, sob limitação nutricional, são providas desses nutrientes, respondem com grandes mudanças transientes na expressão gênica dentro de 15 minutos da re-alimentação, ou seja, mudanças de 10 a 40 vezes na expressão gênica de alguns genes. As mudanças na expressão gênica durante a saída da fase estacionária são dinâmicas e envolvem uma grande parte do genoma. Tal transição é mais complicada do ponto de vista de desenvolvimento do que a transição de células em divisão entre duas condições ambientais diferent es.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.

2.1 A resposta comum a estresses.

A resposta geral a estresses foi postulada (Siderius, Rots *et al.*, 1997) para explicar a fenômeno de proteção cruzada, em que a exposição a uma dose subletal de um estresse pode proteger contra uma dose potencialmente letal de um estresse aparentemente não relacionado. A proteção cruzada varia dependendo do estresse e não é sempre recíproca. A resistência geral a estresses também está associada com células privadas de nutrientes, células em estado estacionário e esporos diferenciados.

Células de *S. cerevisiae* evoluíram para sobreviver a mudanças repentinas, geralmente drásticas e estressantes, em seu meio ambiente. Algumas condições estressantes têm sido bastante estudadas, incluindo o crescimento a temperaturas acima e abaixo de 25°C; crescimento em meio de alta osmolaridade e força iônica; exposição a agentes químicos tóxicos como metais pesados, agentes oxidantes e drogas que causam danos ao DNA; limitação para uma variedade de nutrientes; irradiação; dessecação e outras. Muitas dessas condições estressantes têm sido estudadas no contexto do uso industrial da levedura, como fermentação e panificação, já que tais processos são afetados pela resposta das células a altas temperaturas, congelamento, dessecação e oxidação (Attfield, 1997). A medida que melhorarmos nossa habilidade para estudar as respostas celulares a estímulos externos, espera-se identificar outras condições ambientais que sejam estressantes para a levedura, como cultivo misturado a outros micróbios, exposição a moléculas sinalizadoras microbianas, ou exposição a agentes químicos correntemente considerados como biologicamente inertes (Gasch e Werner-Washburne, 2002).

Em resposta a uma rápida mudança nas condições, as células de *S. cerevisiae* montam uma resposta multifacetada que envolve em geral uma pausa transiente dos processos celulares normais durante o período de reorganização do seu meio interno. Claramente todos os níveis de organização celular são envolvidos na resposta a estresses ambientais. Por exemplo, em resposta à Imitação de glicose, há proteínas da superfície celular que detectam a ausência desse açúcar e ativam vias de tradução de sinal em diferentes compartimentos celulares (Johnston, 1999; Estruch, 2000), que governam

mudanças na fosforilação, localização e atividade de proteínas (Macfarlane, Mckinnon *et al.*, 1999; Vincent, Townley *et al.*, 2001), mudanças na expressão gênica (Derisi, Iyer *et al.*, 1997; Gasch, Spellman *et al.*, 2000) e tradução (Fuge, Braun *et al.*, 1994; Ashe, De Long *et al.*, 2000; Kuhn, Derisi *et al.*, 2001), acúmulo de moléculas protetoras contra estresse (Francois e Parrou, 2001) e degradação de proteínas e RNA (Albig e Decker, 2001; Vasudevan e Peltz, 2001). Assim, para a célula responder efetivamente mudanças em todos os componentes celulares devem ser completamente integrados.

Com o advento da técnica de microarrays de DNA (Shalon, Smith et al., 1996), análises globais das mudanças da expressão gênica que acompanham diversas respostas a estresses têm sido realizadas (Gasch, Spellman et al., 2000; Causton, Ren et al., 2001; Chen, Toone et al., 2003). Estudos dos perfis transcricionais da reposta a estresses na levedura Saccharomyces cerevisiae (Gasch, Spellman et al., 2000; Causton, Ren et al., 2001) mostraram que de 10 a 14% dos genes desse microorganismo sofrem alteração no nível de expressão em resposta a uma grande variedade de estresses. Genes induzidos envolveram vários processos, dentre os quais metabolismo de carboidratos, destoxificação de espécies reativas de oxigênio, enovelamento e degradação protéicos, funções mitocondriais e vacuolares, autofagia e trans porte de metabólitos. Os genes reprimidos foram em geral aqueles envolvidos em processos de alta demanda energética e relacionados ao crescimento, incluindo processamento de RNA, transcrição e tradução e biossíntese de ribossomos e nucleotídeos. Essas mudanças estereotípicas, conhecidas como resposta a estresses ambientais (environmental stress response, ESR) (Gasch, Spellman et al., 2000), ou resposta comum a estresses ambientais (common environmental stress response, CER) (Causton, Ren et al., 2001), são temporárias e com diferentes gradações de acordo com o tipo e intensidade do estresse (Gasch e Werner-Washburne, 2002).

A resposta a estresses ambientais (ESR) é iniciada de forma a ser sensível ao grau de estresse celular envolvido com a transição, de forma que as repostas na expressão gênica devido à ESR sejam proporcionais à magnitude da mudança ambiental pela qual a célula está sendo sujeitada. Tal correlação foi identificada em experimentos de dosagem em que condições mais severas de estresse criaram mudanças muito maiores na expressão gênica relacionada à ESR do que aquelas observadas em condições mais sutis (Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Jelinsky, Estep *et al.*, 2000). O retorno às condições ambientais ótimas para o

crescimento e desenvolvimento do microorganismo é acompanhado com uma resposta recíproca na expressão dos genes ESR, indicando que a resposta a condições estressantes é rapidamente aliviada (Gasch, Spellman *et al.*, 2000). Com base na sensitividade da ESR e nas funções descritas para genes caracterizados dessa resposta, propôs-se que a ESR protege processos celulares críticos durante o período de estresse (Gasch, Spellman *et al.*, 2000).

Mais de 70% dos genes caracterizados cuja expressão é reprimida como parte da ESR estão envolvidos na síntese protéica (Ashburner, Ball *et al.*, 2000; Ball, Dolinski *et al.*, 2000), incluindo aqueles necessários para a biogênese dos ribossomos, a transcrição dependente das RNA polimerases I e III, e tradução protéica. A síntese reduzida desses transcritos e, conseqüentemente de seus produtos, pode ajudar na conservação de energia enquanto a célula se adapta às novas condições, papel proposto para a expressão reduzida dos genes que codificam as proteínas ribossomais (Warner, 1999).

Em contraste com a relação funcional entre os genes reprimidos na ESR, os genes induzidos estão envolvidos numa variedade muito mais abrangente de processos celulares, incluindo, dentre outros, metabolismo de carboidratos, enovelamento e degradação protéica, defesa a estresse oxidativo, autofagia, reorganização do citoesqueleto, reparo de danos ao DNA. As funções desses genes seria a de proteger aspectos críticos do meio intracelular como reservas energéticas, balanço osmótico, potencial oxidoredutor e a integridade de estruturas celulares, além de moléculas vitais como certas proteínas e o DNA. Essa proteção provavelmente contribui para a resistência cruzada a estresses múltiplos observada em células de levedura.

A regulação da expressão dos genes de ESR é específica às condições e controlada em vários níveis (Gasch e Werner-Washburne, 2002). Fatores de transcrição como Hsf1p, Hot1p e Yap1p afetam independentemente a expressão de subconjuntos dos genes de ESR, respectivamente em resposta a choque térmico, choque osmótico e estresse oxidativo, mas não estão envolvidos na regulação da expressão dos mesmos genes em condições diferentes das específicas para cada fator (Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Amoros e Estruch, 2001). Os chamados fatores transcricionais gerais para estresses, Msn2p e Msn4p, tem sido implicados na regulação de muitos dos genes induzidos pela ESR (Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Causton, Ren *et al.*, 2001), embora seus papéis também variem sob condições diversas (Garreau, Hasan *et al.*, 2000; Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Rep, Krantz *et al.*, 2000; Amoros e Estruch, 2001). Certas vias de sinalização específicas a determinadas condições de estresse têm sido implicadas na mediação da expressão coordenada da indução e repressão dos genes de ESR, entre elas: a via de MAP quinase da proteína quinase C, para defeitos de secreção e dano à parede celular (Li, Moir *et al.*, 2000), a via MEC1 após danos ao DNA (Gasch, Huang *et al.*, 2001), e tanto as vias dependentes de Ssk1p/Ste11p quanto a da MAP quinase Hog1p em resposta a estresse osmótico (Posas, Chambers *et al.*, 2000; Rep, Krantz *et al.*, 2000). Algumas vias que suprimem a ESR, como a via TOR e a da proteína quinase A, também já foram implicadas na regulação da expressão desses genes, embora as condições específicas nas quais elas agem sobre tal resposta ainda não **e**nham sido definidas. Assim, apesar da iniciação da ESR ser comum aos diversos estresses, seu programa é regulado por mecanismos que são específicos a cada condição, dando à célula a possibilidade de ativar a ESR como resposta geral a diversos sinais e ao mesmo tempo de manter uma especificidade sobre como detectar e responder a cada novo ambiente.

Em *S. pombe* a reposta comum a estresses (*common environmental stress response*, CESR) é regulada primariamente pela via da MAPK Sty1p. Além dessa resposta, as células iniciam programas de expressão gênica mais específicos para cada estresse que podem envolver Sty1p e/ou outros fatores de regulação específicos. Foram identificados aproximadamente 140 genes induzidos e 100 genes reprimidos que proporcionam uma amostra representativa da resposta geral a estresses. As funções dos genes CESR indicam que as células sob estresse acabam por seletivamente modificar uma ampla gama de atividades, como o metabolismo de carboidratos, a síntese protéica e outras atividades metabólicas, possivelmente para economizar energia pela limitação de atividades relacionadas ao crescimento celular e para sintetizar moléculas ou cofatores que as protejam do estresse. Os genes CESR podem ser controlados por reguladores que sejam eles próprios parte da resposta CESR. Foi verificada uma sobreposição significante entre a CESR de *S. cerevisiae*, que indica que a reposta geral a estresses deve ser evolutivamente conservada, em contraste com os genes induzidos durante a diferenciação meiótica, por exemplo (Mata, Lyne *et al.*, 2002).

Os diversos programas de expressão em escala genômica disparados pelas diferentes mudanças ambientais também apresentam distinções características na cinética de cada resposta, sendo algumas reações imediatas, em termos de minutos, enquanto outras só sejam detectadas após período de tempo mais longo. O choque térmico, que causa a desnaturação de proteínas rapidamente, resulta numa mudança de expressão gênica em poucos minutos após o início do estresse (Werner-Washburne e Craig, 1989; Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Causton, Ren *et al.*, 2001). Já a resposta a drogas que previnem a secreção de proteínas através do retículo endoplasmático induz inicialmente um pequeno número de genes (relacionados à resposta a proteínas desenoveladas, *unfolded protein response* – UPR), enquanto a maioria das mudanças na expressão gênica observada só ocorre horas após a exposição à droga (Gasch, Spellman *et al.*, 2000; Travers, Patil *et al.*, 2000).

A maioria das mudanças ambientais estudadas apresenta desafios pleiotrópicos às células. Quando células são expostas a duas mudanças simultâneas nas condições ambientais, o programa global de expressão gênica se aproxima muito do que seria a soma das respostas específicas observadas para cada uma das mudanças individuais (Gasch, Spellman *et al.*, 2000).

2.2 Resposta ao choque térmico.

Quando há uma elevação brusca e repentina na temperatura do ambiente, as células, das bacterianas às humanas, modificam sua expressão gênica e protéica de modo a se adaptar aos efeitos nocivos de tal mudança, principalmente à perda da conformação nativa (desnaturação) de muitas de suas proteínas. Essa resposta universal das células é denominada resposta ao choque térmico e tem como característica principal a indução da expressão de um conjunto de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSPs) (Lindquist e Craig, 1988; Craig, Gambill *et al.*, 1993), que podem ser divididas em duas classes funcionais principais: chaperones moleculares e proteases.

A maioria das proteínas de choque térmico também pode ser classificada em famílias protéicas de acordo com seu peso molecular. Aquelas com funções de chaperonas moleculares podem ser classificadas em 4 famílias: a de proteínas de alto peso molecular

(Hsp90), entre 83 e 90 kDa; a família das HSP70, entre 66 e 78 kDa; a família das HSP60, que têm sido chamadas de chaperoninas (Hemmingsen, Woolford *et al.*, 1988); e as proteínas de baixo peso molecular, entre 15 e 40 kDa. Uma família de peso molecular ente 100 e 110 kDa compõe o grupo de proteínas de choque térmico com função de proteases (Subjeck, Shyy *et al.*, 1983; Shyy, Subjeck *et al.*, 1986).

A obtenção de uma conformação tridimensional funcional de um polipeptídeo a partir de sua estrutura primária / secundária é um processo denominado enovelamento protéico, e pode ocorrer de forma espontânea para algumas proteínas. Entretanto, o enovelamento correto de muitas proteínas e a montagem de complexos oligoméricos depende de complexos protéicos denominados Sistemas de Chaperones Moleculares (Ellis, 1987). Assim, as chaperones moleculares interagem com polipeptídeos nascentes, ou recém-translocados, e proteínas não-enoveladas e os ajudam 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 chaperones é essencial para a manutenção da homeostase celular (Beissinger e Buchner, 1998).

A função geral das chaperonas moleculares foi desvendada a partir do estudo das proteínas HSP70 e das chaperoninas HSP60 e HSP10. Inicialmente identificadas pelo aumento de sua expressão em células submetidas a choque térmico, essas proteínas mostraram-se essenciais na renaturação de polipeptídeos desnaturados em conseqüência do aumento da temperatura (Pelham, 1986; Hightower, 1991) e atuantes na prevenção da agregação de polipeptídeos recém-sintetizados, participando de seu enovelamento às custas da hidrólise de ATP (Frydman, Nimmesgern *et al.*, 1994).

HSP70 e suas co-chaperones (HSP40 e GRPE) participam do enovelamento e montagem de intermediários recém-sintetizados no citosol, retículo endoplasmático (RE) e em bactérias (Beckmann, Mizzen *et al.*, 1990), enquanto HSP60 e sua co-chperone HSP10 têm papel fundamental na biogênese de proteínas importadas pelas mitocôndrias e cloroplastos, ou de proteínas bacterianas (Hemmingsen, Woolford *et al.*, 1988). O complexo HSP60/HSP10 (GROEL/GROES) (Bukau e Horwich, 1998) exerce função fundamental nas célula, sendo essenciais à viabilidade celular, visto que uma grande variedade de proteína recém-sintetizadas ou translocadas dependem do ambiente

hidrofóbico da cavidade central do complexo para alcançarem sua estrutura nativa (Fenton e Horwich, 1997). HSP90 liga-se a polipeptídeos desenovelados, silenciando sua função ou endereçando-os para seu compartimento celular adequado. Seus substratos preferenciais são proteínas de tradução de sinal, como membros das famílias das tirosina-quinases, das serina/treonina-quinases e dos fatores de transcrição (Pratt, 1997; Richter e Buchner, 2001).

O mecanismo de resposta ao choque térmico desenvolvido pelas células eucarióticas é altamente conservado, sendo seu aspecto mais importante a indução da transcrição dos genes que codificam as proteínas de choque térmico. Tal indução é mediada pelos fatores de transcrição de choque térmico (*heat shock factor* –HSF) que se ligam a sítios no DNA denominados elementos de choque térmico (*heat shock elements* – HSE), similares em todos os eucariotos, encontrados nos promotores dos genes das proteínas de choque térmico e formados por repetições da seqüência pentamérica "nGAAn", em sentido direto e invertido (Amin, Ananthan *et al.*, 1988).

O consenso mínimo para o HSE (cHSE) é determinado pela seqüência "nGAAnnTTCnnGAAn" (Fernandes, Xiao *et al.*, 1994). Entretanto, outras variações de seqüência para o HSE foram descritas, sendo chamadas de ncHSE (HSE não consenso). Entre elas a seqüência "nTCCnnGAA-(5 pb)-nGAGn" presente no promotor do gene CUP1 de *S. cerevisiae* (Liu e Thiele, 1996; Santoro, Johansson *et al.*, 1998) e elementos similares que regulam a expressão dos genes HSP82 e HSC82 (homólogos de Hsp70 em *S. cerevisiae*, induzido e constitutivo, respectivamente; (Borkovich, Farrelly *et al.*, 1989; Erkine, Szent-Gyorgyi *et al.*, 1995).

O HSF é codificado por um único gene em leveduras e em *Drosophila melanogaster*, enquanto há dois a três diferentes HSFs em células de plantas, aves e mamíferos (Sistonen, Sarge *et al.*, 1994). Além de ser essencial à indução dos genes de choque térmico, o HSF também desempenha um papel determinante durante o crescimento de células eucarióticas sob condições fisiológicas (Gallo, Prentice *et al.*, 1993). Em *S. pombe* e eucariotos superiores, como resposta ao choque térmico, o HSF é acumulado no núcleo, onde forma então um complexo trimérico que ativa a transcrição dos genes de choque térmico (Westwood, Clos *et al.*, 1991). Já em *S. cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, o HSF permanece constitutivamente na forma trimérica e é essencial para a viabilidade celular por sua função na expressão basal dos genes de choque térmico, que são induzidos pelas modificações pós-traducionais desse fator quando do advento desse estresse (Jakobsen e Pelham, 1988; Sorger e Pelham, 1988; Hoj e Jakobsen, 1994).

Em células humanas, a superexpressão da proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CAMKII) aumenta a fosforilação de uma serina do domínio regulatório do HSF-1 humano e o potencial de transativação desse fator (Holmberg, Hietakangas *et al.*, 2001). Em *S. pombe*, deleções na porção C-terminal do HSF indicaram que certa mutação aumentava a sensibilidade do fator à presença de íons de cádmio no meio, embora sem efeito sobre a sensibilidade ao choque térmico, enquanto outra mutação tinha efeito inverso. A análise dos mutantes demonstrou que tais deleções estavam relacionadas à modificação da capacidade de HSF ativar promotores específicos para a resposta a tais estresses e não à diferença na distinção do tipo do estresse (Saltsman, Prentice *et al.*, 1999).

2.3 Resposta à presença de íons de cádmio.

A presença de metais pesados em concentrações elevadas no meio ambiente provoca severos danos ambientais além de ser um motivador de problemas de saúde humana no caso da absorção e acúmulo dos mesmos através da ingestão de água ou alimentos contaminados. A poluição do solo com íons do metal cádmio é corriqueira, mesmo em áreas agrícolas, sendo suas principais fontes rejeitos industriais, pesticidas, fungicidas e até mesmo fertilizantes fosfatados. Íons de cádmio são altamente tóxicos a todos os organismos uma vez que causam danos celulares pela inativação ou desnaturação de proteínas através da ligação com grupos sulfidris livres; pela substituição de outros íons metálicos em uma variedade de proteínas nas quais tais óns têm papel de cofatores como enzimas e fatores de transcrição; e pela geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Liao, Dong *et al.*, 2002), criando estresse oxidativo, particularmente peroxidação lipídica (Howlett e Avery, 1997). Em humanos há indícios de que mesmo baixas concentrações de cádmio sejam carcinogênicas.

Para tolerar o efeito tóxico dos íons de metais pesados em geral, os organismos devem manter permanentemente a homeostase dos mesmos, ou desenvolver mecanismos alternativos para o controle das concentrações intracelulares deles, desenvolvendo dessa forma resistência aos íons metálicos (Perego e Howell, 1997). O mecanismo para a diminuição do influxo dos íons nas células baseia-se na repressão da expressão do gene do transportador pelos íons metálicos intracelulares (Zhao e Eide, 1996) ou na proteólise do transportador (Liu e Culotta, 1999). Já o mecanismo geral de destoxificação de íons de metais pesados envolve a complexação por ligantes e compartimentalização do complexo íon-ligante em vacúolos (Vatamaniuk, Bucher *et al.*, 2001). As principais moléculas responsáveis pela complexação desses íons são a glutationa (γ -Glu-Cis-Gli; GSH), as fitoquelatinas [(γ -Glu-Cis)_nGly; PC] e as metalotioneínas (pequenas proteínas ricas em cisteína; MT) (Cobbett, 2000). A compartimentalização dos íons nos vacúolos por meio de transportadores também foi verificada (Li, Lu *et al.*, 1997).

No caso da presença de íons cádmio (II) vários mecanismos de destoxificação foram elucidados em diferentes organismos. Nos animais os principais ligantes são as metalotioneínas (MT) (Clemens, Schroeder *et al.*, 2001), enquanto nas plantas tal papel é atribuído às fitoquelatinas (PC) (Clemens, Kim *et al.*, 1999; Ha, Smith *et al.*, 1999), pois as MTs são responsáveis pela homeostase dos metais pesados em geral (Zhou e Goldsbrough, 1994). Em *S. pombe* um transportador da família ABC (*ATP-binding cassette*) realiza o transporte dos complexos PC-Cd²⁺ para o vacúolo (Ortiz, Ruscitti *et al.*, 1995). Em *S. cerevisiae* o transporte de complexos Cd²⁺-bisglutationato é feito por um transportador ABC similar a proteínas de resistência múltipla a drogas (Ycf1) (Szczypka, Wemmie *et al.*, 1994; Li, Lu *et al.*, 1997). Em plantas foi demonstrada a troca de íons Cd²⁺ por prótons do vacúolo através do transportador antiporte de Ca²⁺/H⁺ (CAX2) (Hirschi, Korenkov *et al.*, 2000). Em termos de extrusão dos íons de cádmio (II) para o meio ambiente, foram identificadas ATPases do tipo P que transportam íons de metais pesados (ATPases do tipo CPx) como CAD2 de *S. cerevisiae* (Shiraishi, Inouhe *et al.*, 2000).

Como parte da resposta de *S. cerevisiae* à presença de íons de cádmio no meio, enzimas da via de biossíntese de aminoácidos sulfurados e de glutationa tiveram sua expressão induzida (Vido, Spector *et al.*, 2001), sendo que a rápida resposta transcricional é regulada pela dissociação da proteína MET30, relacionada ao complexo da ubiquitina ligase, do transativador Met4 (Barbey, Baudouin-Cornu *et al.*, 2005). Demonstrou-se também que, como resposta á presença de íons de cádmio no meio, quando da existência de isozimas com diferentes conteúdos de aminoácidos sulfurados, a expressão das cujo teor é baixo é induzida enquanto há a repressão daquelas ricas em enxofre (Fauchon, Lagniel *et*

al., 2002). Assim, os aminoácidos sulfurados sintetizados em função da resposta à presença de íons de cádmio são direcionados para a síntese de glutationa, fitoquelatinas (Jamieson, 2002). Além de MET4, parte da resposta transcricional também é dependente do transativador YAP1, enquanto que o fator transcricional SKN7 promove certa regulação negativa dos genes induzidos por cádmio (Vido, Spector *et al.*, 2001). Em *S. pombe*, um mecanismo similar de regulação da indução de genes frente à presença de íons de cádmio no meio também foi descrito (Harrison, Katayama *et al.*, 2005).

2.4 Resposta à limitação de nutrientes.

A limitação, ou ausência, de nutrientes, embora comum, é um estresse bastante complexo para os microorganismos. A limitação de nutrientes específicos provê dados em termos de desenvolvimento entre os fungos. Por exemplo, a limitação de fonte de nitrogênio é freqüentemente associada ao desenvolvimento sexual e conjugação em leveduras (Nelson e Metzenberg, 1992; Alspaugh, Perfect *et al.*, 1997; Wang, Perfect *et al.*, 2000). A limitação de fonte de carbono é um indicativo para culturas de levedura, tanto haplóide quanto diplóide, entrarem em fase estacionária (Werner-Washburne, Braun *et al.*, 1996) e, sob certas condições, para células haplóides crescerem de forma invasiva (Cullen e Sprague, 2000). Na presença de fontes de carbono pobres, a limitação de fonte de nitrogênio induz a esporulação, enquanto na presença de fontes de carbono ricas estimula o crescimento em pseudo-hifas (Pan, Chen *et al.*, 2000; Zaragoza e Gancedo, 2000). Células sob ausência de fonte de nitrogênio não entram em estado quiescente (Granot e Snyder, 1993), mas a base para as diferenças na parada do crescimento celular entre a falta de fontes de nitrogênio ou de carbono ainda não é conhecida.

O processo de entrada na fase estacionária, mais estudado em *S. cerevisiae* em meio rico (2% glicose) e a 30°C, exibe diversas fases distintas: fase *lag*, exponencial, a transição de fontes de carbono (*diauxic shift*), e a fase após essa transição. Por fim as células entram na fase estacionária quando as fontes de carbono são exauridas e a densidade celular pára de aumenta. Na transição de fontes de carbono (*diauxic shift*) a célula modifica a expressão de milhares de genes enquanto inicia a ESR (Derisi, Iyer *et al.*, 1997; Gasch, Spellman *et al.*, 2000), incluindo a repressão de muitos genes envolvidos em secreção, na síntese da

membrana e da parede celular, no metabolismo de aminoácidos, na progressão do ciclo celular e em outros processos necessários para o crescimento e divisão celular. Uma mudança grande na expressão gênica ocorre tardiamente na fase estacionária. Um subgrupo de genes é induzido na fase estacionária, indicando que as mudanças na expressão gênica ocorrem em resposta à limitação de nutrientes e pode ser importante para a sobrevivência celular sobre essas condições (Braun, Fuge *et al.*, 1996; Padilla, Fuge *et al.*, 1998).

Em *S. cerevisiae*, a privação de fonte de carbono resulta numa grande redução na expressão gênica que é essencial para a manutenção da viabilidade celular. Dentre os genes cuja expressão é induzida se encontram os pertencentes ao TCA e ao ciclo do glioxilato, evidenciando a utilização dos intermediários provenientes da beta-oxidação de lipídeos e da degradação protéica e de aminoácidos (Wu, Zhang *et al.*, 2004).

Em *Neurospora crassa* a limitação de glicose levou à redução da transcrição de genes relacionados aos processos biossintéticos em geral, incluindo a síntese de lipídeos e aminoácidos, em contraponto à indução de genes relacionados à degradação desses substratos e à utilização de fontes alternativas de carbono (Xie, Wilkinson *et al.*, 2004). A expressão de genes do TCA, ciclo do glioxilato e da gliconeogênese foi altamente induzida, assim como genes envolvidos com a degradação protéica e a de aminoácidos. Genes relacionados com a síntese da parede celular e ciclo celular foram reprimidos.

A análise comparativa da resposta celular a longos períodos de limitação de fonte de nitrogênio em meio sintético e progressão para o estado estacionário em meio rico, por um período de 5 dias, tem sido importante para o entendimento da dinâmica desses processos em *S. cerevisiae* (Gasch, Spellman *et al.*, 2000). Quando células são transferidas para meio sintético contendo fonte de nitrogênio limitada (sem aminoácidos), elas rapidamente induzem a expressão de genes envolvidos na biossíntese de aminoácidos e na utilização de alantoína, e iniciam a ESR. Em poucas horas as fontes externas de nitrogênio são exauridas e a expressão de muitos genes é induzida, incluindo a daqueles envolvidos na respiração e no metabolismo de carbono, na esporulação, no crescimento pseudo-hífico assim como a de muitos genes cujos produtos não estão caracterizados (Gasch, Spellman *et al.*, 2000). As células sofrendo limitação de nitrogênio passam eventualmente a sofrer também limitação de carbono, e algumas diferenças na expressão gênica podem ser devidas aos efeitos combinados de ambas as limitações. Comparativamente, a resposta CESR de *S. pombe* é

ativada durante a ausência de fonte de nitrogênio e alguns genes CESR também foram induzidos durante a esporulação (Mata, Lyne *et al.*, 2002).

2.5 O modelo celular Trichoderma reesei.

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

Por terem se desenvolvido em um ambiente nutricionalmente pobre (Wainwright, 1993), essas espécies 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, 1996) e na hidrólise de celulose e outros polissacarídeos (Beguin e Aubert, 1994; Biely, 1998).

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

crescimento vegetal (Chang, 1986; Walsh, Power *et al.*, 1993; Samuels, 1996; Harman G E, 1998; Altomare, Norvell *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, Woo *et al.*, 1998; Bolar, 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 e Reese, 1957). Este isolado ganhou reputação pela produção de celulases em grandes quantidades e é o único precursor de várias cepas hiper-produtoras, exploradas industrialmente hoje em dia (Kuhls, Lieckfeldt *et al.*, 1996; Mantyla, 1998). Segundo o banco de dados taxonômicos do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) do *National Health Institutes* (NIH) dos EUA (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Taxonomy), *T. reesei* tem a seguinte classificação:

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

A cariotipagem molecular, realizada por meio de eletroforese de campo pulsado, já foi empregada para caracterização do genoma de diferentes espécies de *Trichoderma*. Nas cepas QM6a e QM9414 de *T. reesei* verificou-se a presença de 6 a 7 cromossomos com tamanhos variando entre 2,8 e 6,9 Mb e estima-se que todo o genoma tenha cerca de 33 Mb (Mantyla, Rossi *et al.*, 1992; Herrera-Estrella, Goldman *et al.*, 1993).

Seu ciclo de vida é assexuado, com geração de esporos elipsóides $(3,0-4,5 \times 2,3-3,0 \mu m)$ de coloração verde pálida. A germinação destes esporos dá origem a filamentos de 20 μm ramificados denominados hifas, formadas por células dispostas em seqüência e separadas por septos (Samuels, 1996; Gams, 1998).

A forma de vida assexuada de um fungo é também chamada de anamórfica, enquanto a sexuada (que recombina-se por meiose) é denominada teleomórfica (Kuhls, Lieckfeldt *et al.*, 1996). Anamorfos e teleomorfos de uma mesma espécie apresentam características morfológicas diferentes. Assim, as duas formas de uma mesma espécie podem receber 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 (Kuhls, Lieckfeldt *et al.*, 1996; Klein, 1998).

As diversas espécies do gênero *Trichoderma* têm sido utilizadas como modelo no estudo de diferentes fenômenos biológicos. *T. reesei*, em particular, se destacou no estudo do catabolismo de celulose e outros polissacarídeos. 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, 1993; Nidetzky, Steiner *et al.*, 1994). Seu sistema celulolítico é provavelmente um dos mais estudados em diversos aspectos, tais como o mecanismo de ação das celulases e a regulação da expressão de seus genes (El-Gogary, Leite *et al.*, 1989; Abrahao-Neto, Rossini *et al.*, 1995; Henrique-Silva, El-Gogary *et al.*, 1996; Carle-Urioste, Escobar-Vera *et al.*, 1997; Ilmen, Saloheimo *et al.*, 1997).

Até o inicio de 2002 o GenBank (banco de seqüências do NCBI) contava com apenas 109 seqüências de genes de *T. reesei*. Nos últimos anos, as pesquisas a respeito deste fungo ganharam uma contribuição que ao me smo 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, Bonaccorsi *et al.*, 2002). Empregando estas seqüências e o uso de *microarrays* de DNA, foi analisado o perfil da expressão gênica de *T. reesei* durante o consumo de glicose e elucidado o programa temporal de expressão de genes envolvidos nas vias de seu metabolismo primário, nesta condição (Chambergo, Bonaccorsi *et al.*, 2002). Recentemente, o número de ESTs no banco de dados foi aumentado para quase 2000 seqüências únicas e análises de *microarrays* foram utilizadas para estudar o perfil transcricional de genes de *T. reesei* sob diferentes condições de disponibilidade de oxigênio (Bonaccorsi, 2003, Bonaccorsi, 2005 #195). Para a realização dos trabalhos aqui apresentados, também foram utilizadas tais ferramentas.

3 – Objetivos.

O principal objetivo desse trabalho foi identificar os genes do fungo filamentoso *Trichoderma reesei* cuja expressão foi alterada em resposta a diferentes estresses ambientais. Dentro da vasta gama de estresses a que esse organismo pode ser submetido tanto em seu habitat natural quanto em cultivo industrial, foram escolhidos as seguintes condições: choque térmico à temperatura de 40°C, presença de íons do metal pesado cádmio no meio de cultura, e limitações nutricionais em função da disponibilidade de uma boa fonte de carbono ou de nitrogênio.

Uma vez que já foi descrita para as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizossacharomyces pombe* uma resposta comum a vários estresses ambientais, pretendeuse identificar genes cuja expressão fosse coordenada em mais de um dos estresses estudados e iniciar uma comparação com a resposta à hipóxia / anóxia transiente, descrita anteriormente para *T. reesei*.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Microorganismo.

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

4.2 Soluções e meios de cultura

<u>Meio completo para *T. reesei*</u> (composição por litro): 11,810 g KH₂PO₄ (Sigma), 3,013 g K₂HPO₄ (Sigma), 1,400 g (NH₄)₂SO₄ (Sigma), 300 mg MgSO₄•7H₂O (Sigma), 300 mg Uréia (Sigma), 2,000 g Proteose Peptona (Difco), 1,00 mL solução estéril de metais de transição, 1,00 mL solução estoque 2,00 mol/L CaCb (filtrada através de filtros PVDB 0,22 μ m – Millex®, Millipore), adicionado ao meio já autoclavado e resfriado à temperatura ambiente; pH 6,0.

<u>Meio mínimo para *T. reesei*</u> (composição por litro): 11,810 g KH₂PO₄ (Sigma), 3,013 g K₂HPO₄ (Sigma), 2,000 g (NH₄)₂SO₄ (Sigma), 300 mg MgSO₄•7H₂O (Sigma), 1,00 mL solução estéril de metais de transição, 1,00 mL solução estoque estéril 2,00 mol/L CaC_b (filtrada através de filtros PVDB 0,22 μ m – Millex®, Millipore), adicionado ao meio já autoclavado e resfriado à temperatura ambiente; pH 6,0.

<u>Solução de metais de transição</u> (composição por litro): 5,000 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,600 g $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,600 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 2,000 g $CoC_{\underline{b}}$, dissolvidos em solução 28 mmol/L HCl (Merck). Filtrada através de filtro 0,22 μ m PVDB (Millex® - Millipore).

TE: 10,0 mmol/L Tris-HCl (Sigma), pH 7,5; 1,00 mmol/L EDTA (Sigma), pH 8,0.

<u>Tampão de Purificação de fragmentos de DNA amplificados e de cDNAs</u>: 7,00 mol/L Hidrocloreto de guanidina (Gibco), 200 mmol/L MES (Sigma), pH 5,6. Filtrada através de filtro 0,22 µm PVDB (Millex® - Millipore).

4.3 Condições de cultivo de T. reesei.

4.3.1 Condições gerais.

T. reesei foi cultivado em meio sólido PDA (Potato Dextrose Agar – Difco) por cerca de sete dias (dois dias em estufa a 28°C, sem iluminação, e os subseqüentes à temperatura ambiente, sob iluminação natural), em placas de Petri (\emptyset 10 cm) para a obtenção de esporos, que então foram suspensos em solução isotônica de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%. As suspensões foram quantificadas em câmara de Neubauer, resultando em concentrações sempre próximas a 1,0 x 10⁸ esporos / mL.

Os cultivos em meio líquido foram realizados com meio de cultura completo ou mínimo (*Soluções e meios de cultura*) em frascos *erlenmeyer* de volume pelo menos cinco vezes o do inicial de meio. A não ser no caso específico do experimento de choque térmico, os frascos foram incubados em agitador orbital a 28°C sob rotação de 200 rpm (New Brunswick, Inc.).

Para o inóculo de todos os cultivos em meio líquido, utilizou-se volume acertado de suspensão de esporos de *T. reesei* em solução isotônica de NaCl 0,9% para a obtenção de uma concentração de 1,0 x 10^6 esporos / mL de meio de cultura.

Desde que não diferentemente mencionado, para todos os experimentos foram realizadas pré-culturas em meio completo, utilizando glicose a 2,0% (111 mmol/L) como principal fonte de carbono, durante 14 a 16 horas para a obtenção de massa micelial. Passado esse período, realizou-se uma substituição do meio de cultura para a realização dos experimentos em meio fresco sem a carência de qualquer micro, ou macro-nutriente. A cultura foi centrifugada a 10.000 rpm (rotor GSA, em centrífuga RC5C, Sorvall Instruments) por 20 minutos a 4°C. O meio sobrenadante foi descartado e o micélio foi então lavado pela adição de volume de meio suficiente para sua dispersão em vórtex, seguida de nova centrifugação (10.000 rpm, 10 minutos, 4°C). Suspendeu-se o micélio lavado em meio apropriado a cada experimento por dispersão em vórtex e, quando necessário, dividiu-se a suspensão em mais de um frasco *erlenmeyer*. O meio de lavagem sempre correspondeu ao meio final no qual o micélio foi ressuspenso. Esperaram-se 2,0

horas após a ressuspensão com o intuito de adequação do fungo às novas condições de meio para se iniciarem os tratamentos específicos de cada experimento.

Todas as soluções adicionadas aos meios de cultura foram previamente esterilizadas por filtração através de filtro 0,22 µm PVDB (Millex® - Millipore).

A determinação da concentração celular das culturas foi realizada através de massa seca, segundo o seguinte protocolo. Após terem sido desidratados em forno microondas por 5 minutos, a 20% da potência total, e resfriarem no interior de dessecador, filtros de 0,45 µm PVDB (Millex® - Millipore) foram utilizados para a filtração a vácuo de um volume determinado de cultura. O filtro com a massa micelial foi então submetido à secagem em forno microondas por 15 minutos, a 20% da potência total, e guardados em dessecador até serem pesados em balança analítica.

As concentrações de glicose no meio de cultura foram verificadas através de glicosímetros digitais portáteis (Advantage®, Roche) e por medidas espectrofotométricas, através de kits de determinação enzimática (SERA-PAK® Glucose, Bayer e LabTest).

Para obtenção de RNA, as amostras de micélio foram filtradas a vácuo sobre papel 3M (Whatman), rapidamente embaladas em papel alumínio e congeladas sob nitrogênio líquido, para ser então guardadas em ultrafreezer (-70°C) até o momento da extração do RNA.

4.3.2 Cultivos com sulfato de cádmio (II).

Para a adição de sulfato de cádmio (II) (CdSO₄ – Fluka) aos meios de cultura sólido e líquido, uma solução estoque 1,00 mol/L CdSO₄ foi preparada com água destilada, e deionizada, e mantida a 4°C. A partir dessa solução estoque, foram preparadas, imediatamente antes da adição, soluções de trabalho mais diluídas (10,0 mmol/L e 1,00 mmol/L). Também foram preparadas soluções de sulfato de sódio (Na₂SO₄ – Sigma) nas mesmas concentrações para adição aos meios de cultura com a finalidade de obter a mesma força iônica dos meios suplementados com as soluções de CdSO₄.

Para o cultivo em meio sólido, volumes específicos das soluções de trabalho de ambos os sais foram adicionados a 5,00 mL de PDA dissolvido (T $\sim 40^{\circ}$ C) para a obtenção de concentrações finais na faixa de 10 a 10^{3} µmol/L CdSO₄ / Na₂SO₄. Desses 5,00 mL de

PDA complementados com sais, 3,00 mL foram aplicados a um de seis reservatórios (\emptyset 4,0 cm) de placas de cultura. Após a solidificação do meio, 10,0 µL de suspensão de esporos em concentração de aproximadamente 1,0 x 10⁸ esporos / mL NaCl 0,9% foram aplicados no centro de cada reservatório. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa a 28°C sem iluminação e subseqüentemente mantidas a temperatura ambiente sob iluminação natural. Fotografias das placas foram realizadas após 36,0 horas do inóculo.

Para os cultivos em meio líquido, foram realizadas pré-culturas em meio mínimo, ao invés de completo (*Soluções e meios de cultura*), com glicose a 2,0% como fonte de carbono, por 24 horas para o estabelecimento de uma condição de ausência de substâncias contendo grupos tiol que não aquelas produzidas pelo próprio fungo. Seguiu-se à substituição do meio de cultura e após a lavagem, a suspensão de micélio foi dividida, da forma mais equitativa possível em termos de massa, em frascos *erlenmeyer* distintos para o prolongamento dos experimentos.

Para o experimento inicial de avaliação da influência da concentração de cádmio (II) sobre o crescimento de *T. reesei*, os micélios de duas pré-culturas de 400 mL iniciais de meio em frascos *erlenmeyer* de 2,0 L foram ajuntados, após a primeira centrifugação do processo de substituição de meio, e homogeneizados por agitação em vórtex. Após a lavagem, a massa micelial homogênea foi ressuspensa em 600 mL de meio mínimo com glicose a 2,0% por agitação em vórtex e aproximadamente 200 mL da suspensão foi pesada e dispensada em três frascos *erlenmeyer* de 2,0 L já contendo outros 200 mL de meio mínimo com glicose a 2,0%. Foram retiradas alíquotas iniciais para determinação da massa seca e da concentração de glicose dos três cultivos paralelos e adicionou-se a um deles 200,0 µL de solução estéril 100 mmol/L CdSO₄, para concentração final de 50 µmol/L, e a outro 2,00 mL da mesma solução, para concentração de 200 rpm. A partir de então a cada 2,0 horas, até 20,0 horas de tratamento, foram retiradas alíquotas para o acompanhamento do crescimento do fungo por massa seca e da concentração de glicose. Ainda foram obtidas alíquotas depois de 24,0, 40,0 e 44,0 horas de tratamento.

Para o segundo experimento de avaliação da influência da concentração de cádmio (II) sobre o crescimento de *T. reesei*, seguiu-se procedimento semelhante ao anterior. Foi realizada uma pré-cultura em 400 mL de meio mínimo com glicose a 2,0% por 24 horas. O

meio foi substituído e o micélio ressuspenso em 200 mL de meio mínimo com glicose a 2,0%. Dividiu-se a suspensão em dois frascos *erlenmeyer* contendo outros 100 mL de meio, aos quais foi, ou não, adicionado 1,00 mL de solução estéril 100 mmol/L CdSO₄ para concentração final de 250 µmol/L CdSO₄. Os frascos foram incubados em agitador orbital a 28°C sob agitação de 200 rpm. Alíquotas das culturas para as determinações de massa seca e concentração de glicose no meio filtrado foram retiradas após 2,5, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0, 13,0, 15,0 e 17,0 horas de tratamento.

Para os experimentos de descrição da influência da presença de cádmio (II) no perfil transcricional de *T. reesei*, seguiu-se procedimento similar ao do segundo experimento de avaliação da influência da concentração de cádmio (II) sobre o crescimento de *T. reesei*. Realizou-se uma pré-cultura em 400 mL de meio mínimo com glicose a 2,0% por 24 horas para a obtenção de massa micelial. Seguiu-se a etapa de substituição de meio para novo meio mínimo com glicose a 2,0%, sendo o micélio dividido em dois frascos *erlenmeyer* de 2,0 L contendo 200,0 mL finais de meio cada. Para se assegurar de que as mudanças transcricionais observadas seriam decorrentes somente da adição de cádmio (II) e não de qualquer resposta à etapa de mudança de meio, as culturas foram incubadas a 28°C sob agitação de 200 rpm por 4,0 horas, antes de então serem adicionados, a uma das culturas, 20,0 mL de solução estéril 1,00 mmol/L CdSO₄ e, a outra, 20,0 mL de solução 1,00 mmol/L Na₂SO₄. Alíquotas das culturas para as determinações de massa seca e concentração de glicose foram retiradas logo após a ressuspensão do micélio, logo antes da adição dos sais, 1,0 e 2,0 horas após a adição. Amostras de micélio para a extração de RNA foram retiradas antes da adição dos sais e após 0,5, 1,0 e 2,0 horas da adição.

4.3.3 Cultivos de choque térmico.

Como mencionado anteriormente, foi realizada uma pré-cultura padrão com inóculo de 1,0 x 10^6 esporos / mL de 400 mL de meio completo contendo glicose a 2,0% como fonte de carbono em frasco *erlenmeyer* de 2,0 L por 16,0 horas a 28°C sob agitação de 200 rpm em agitador orbital. Seguindo a substituição do meio por um novo meio completo com glicose a 2%, a ressuspensão do micélio (400 mL) foi dividida equitativamente em quatro frascos *erlenmeyer* de 1,0 L já contendo 100,0 mL de meio completo com glicose a 2%

cada. As quatro culturas foram incubadas durante 5,0 horas a 28°C sob agitação de 200 rpm 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. Foram retiradas alíquotas das quatro culturas, para determinação de massa seca e concentração de glicose, 1,0, 3,0 e 5,0 horas após a mudança de meio, e 1,0, 2,0, 4,0 e 6,0 horas após o início do choque térmico.

Para os experimentos de descrição da resposta transcricional de *T. reesei* a choque térmico, com o intuito de ter maior controle sobre a temperatura e de criar uma mudança brusca na mesma, as culturas foram realizadas em banhos termostatizados com prateleira de agitação orbital (New Brunswick, Inc.) no laboratório da Profa. Dra. Suely L. Gomes (IQ – USP). 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, em 400 mL de meio contidos em frasco erlenmeyer de 2,0 L, sob condições padrões acima descritas, ocorreu a substituição do meio por novo meio 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 rpm. Ao final de 2,0 horas nessa condição, uma das culturas foi repassada para um banho termostatizado similar ao anterior préaquecido 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 e concentração de glicose 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.

4.3.4 Cultivos com limitação de fonte de nitrogênio

Foram realizadas duas pré-culturas em 200 mL de meio completo contidas em frascos erlenmeyer de 1,0 L por 16 horas. A partir delas foram retiradas alíquotas para determinações de massa seca e concentração de glicose e para a extração de RNA, como amostra controle em meio rico em fonte de nitrogênio Soluções e meios de cultura). Seguiu-se a substituição do meio completo pelo meio sem fonte de nitrogênio, com duas lavagens com meio sem fonte de nitrogênio e ressuspensão final do micélio de cada précultura em 200 mL do meio sem fonte de nitrogênio. As culturas voltaram então a serem incubadas sob as condições gerais de cultivo, permanecendo o fungo na ausência de fonte de nitrogênio pelo período de 3,5 horas. Ao final desse intervalo de tempo, foram adicionados 3,20 mL de solução estéril 1,00 mol/L (NH₄)₂SO₄, repondo a concentração de amônio àquela presente no meio mínimo de T. reesei (16,0 mmol/L). As culturas foram então incubadas nas condições gerais de cultivo por mais 2,0 horas. Alíquotas da cultura para determinações de massa seca e concentração de glicose, e amostras de micélio, para a extração de RNA, foram retiradas das culturas 2,0 e 3,5 horas após o início da incubação com meio sem fonte de nitrogênio, e 0,5, 1,0 e 2,0 horas após a reposição da fonte de nitrogênio pelo pulso de $(NH_4)_2SO_4$.

4.3.5 Cultivos com limitação de fonte de carbono.

Foram realizadas duas pré-culturas em 200 mL de meio completo com glicose a 2,0% contidas em frascos erlenmeyer de 1,0 L segundo as condições gerais de cultivo. Seguiu-se a substituição do meio com a ressuspensão do micélio de cada pré-cultura em 400 mL de meio mínimo contendo glicose a 1,0% contidos em frasco erlenmeyer de 2,0 L. Essas culturas foram incubadas em condições gerais de cultivo por 2 horas, após as quais foi realizada nova substituição de meio. Uma metade do micélio de cada cultura foi ressuspensa em meio mínimo contendo glicose a 1,0%, enquanto a outra metade foi

ressuspensa em meio mínimo sem fonte de carbono. Assim, ao final dessa segunda substituição de meio, havia quatro culturas, duas em meio mínimo contendo glicose e outras duas em meio sem fonte de carbono, que foram incubadas me condições gerais de cultivo por 3,5 horas. Ao final desse período foram adicionados às culturas 5,0 mL de solução estéril de glicose a 40% para a reposição da fonte de carbono. As culturas permaneceram então sob incubação nas condições gerais de cultivo por mais 2,0 horas. Foram retiradas alíquotas da cultura para as determinações de massa seca e concentração de glicose em 0,5, 1,0, 2,0, 3,0 horas de ausência de fonte de carbono, e 0,5, 1,0 e 2,0 horas após o pulso de glicose. Amostras de micélio para a extração de RNA foram retiradas em 0,5, 1,0 e 2,0 horas de ausência de fonte de carbono, e 0,5, 1,0 e 1,5 horas após o pulso de glicose.

4.4 Técnicas gerais de Biologia Molecular

A extração de RNA de *T. reesei* dos diversos experimentos realizados foi feita através de maceração das amostras de micélio em almofariz com pistilo, sob nitrogênio líquido, seguida de suspensão do macerado no reagente TRIzol® (InvitrogenTM Life Technologies), numa proporção de 1,0 mL de reagente para uma faixa de 0,25 a 0,40 mL de macerado. Seguiu-se então o protocolo original do reagente, ao final do qual o RNA total extraído foi dissolvido em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e quantificado por espectrofotometria.

Para se certificar de que não haveria nenhuma contaminação de DNA genômico de *T. reesei* nas amostras de RNA total que seriam utilizadas nas hibridizações de microarray, tais amostras foram tratadas com DNase I, Amplification Grade (InvitrogenTM Life Technologies), na concentração de 0,1 U/ μ g de RNA por 15 minutos a 37°C. Em seguida as amostras sofreram extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico 24:24:1 e precipitação com isopropanol.

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

4.5 Produção de microarrays de T. reesei.

As etapas de impressão das lâminas dos microarrays, hibridização das mesmas com as misturas de cDNAs marcados com fluoróforos e leitura das fluorescências das sondas nas lâminas hibridizadas foram todas desenvolvidas no laboratório CAGE (*Center for Analyses of Gene Expression* – IQ-USP), sob orientação das técnicas Adriana Matsukuma e Denise Yamamoto, e dos Profs. Drs. Aline M. da Silva, inicialmente, e Eduardo M. Reis, a posteriori (responsáveis à época pelo laboratório).

4.5.1 Materiais e condições para a impressão de lâminas de microarray.

Os DNAs utilizados para a impressão de lâminas de *microarrays* foram amplificados por meio de reações de PCR em 100 μ L, realizadas em placas de 96 poços, a partir de estoques dos clones bacterianos (mantidos a –70 °C) selecionados das bibliotecas de cDNA de *T. reesei* (Chambergo, Bonaccorsi *et al.*, 2002; Bonaccorsi, 2003) e do genoma de *T. reesei* com oligonucleotídeos específicos (Bonaccorsi, 2005). Foram empregadas as seguintes condições reacionais, num total de 1920 amplificações:

Mistura para 1 reação: Estoque bacteriano 1 μL (com replicador de 96 pinos) dNTPs 0,125 mM (cada) Primer M13 (forward e reverso) 0,166 μM (cada) MgCh 1,5 mM Tampão de reação 1 x Taq polimerase (5U/μL - Invitrogen) 0,5 U H₂O para volume final de 100 μL

Condições de reação: 95 °C por 4 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 45 segundos, 55 °C por 45 segundos e 72 °C por 1 minuto; seguidos por 72 °C por 5 minutos.

Os produtos de amplificação foram purificados em placas MultiScreen-FB filter plates, modelo MAFB-NOB50 (Millipore) de 96 poços, segundo protocolo desenvolvido

no laboratório CAGE, brevemente descrito a seguir. Aos 100 μ L do produto de cada amplificação são misturados 100 μ L de tampão de purificação (*Soluções e meios de cultura*) por repetidas pipetagens. Os 200 μ L de cada poço são transferidos para a placa de filtro, previamente umedecida com o tampão. Segue-se a centrifugação da placa de filtro com as soluções dos amplificados a aproximadamente 1300 g por 1 minuto em centrífuga apropriada e, duas posteriores lavagens dos filtros com 200 μ L de etanol 80%, com centrifugações a 1.300 g de 1 e 10 minutos. Realizou-se então uma centrifugação a 1.300 g da placa seca e sem tampa por 5 minutos para eliminação de traços de etanol e por fim foi feita a eluição dos amplificados com 50 μ L de Tris-HCl 10 mmol/L, pH 8,0, para placa de 96 poços com fundo U, por centrifugação a 1.300 g por 5 minutos. Desenvolveu-se então eletroforese em gel de agarose 1,2% de 4 μ L de cada amplificado com marcador de massa para a verificação das concentrações. Um exemplo dos resultados é apresentado na Figura 1.



Figura 1: Eletroforese em gel de agarose 1,2% de meia placa de DNAs amplificados e purificados a partir de clones bacterianos das bibliotecas TrEST-A e –B. A primeira fileira corresponde às linhas A e B e a segunda, às linhas C e D da placa TrEST-A12. Foram aplicados 4 mL de cada amplificado. Os marcadores de peso molecular 1 kb Plus Ladder e de massa Low Mass DNA Ladder (InvitrogenTM Life Technologies) foram aplicados respectivamente à direita e esquerda dos amplificados.

Como a maioria das amplificações dos ESTs não alcançou a concentração de 50 ng/ μ L, as placas foram secas num período de uma noite a temperatura ambiente na sala limpa do laboratório CAGE e os precipitados foram dissolvidos por pipetagem manual em 20 μ L de solução 50% DMSO (reagente D, GE Healthcare) em água deionizada estéril. Os 20 μ L de solução dos amplificados foram então transferidos das placas de 96 poços para placas de 384 poços (GE Healthcare) apropriadas para o sistema de impressão. As 20 placas de 96 poços correspondentes aos amplificados das bibliotecas de cDNA de *T. reesei*, foram agrupadas em 4 placas de 384 (placas A1, A2, AB, B1), enquanto que os genes amplificados a partir do genoma com oligonucleotídeos específicos foram colocados em uma quinta placa de forma duplicada (placa G).

Os DNAs foram impressos em lâminas espelhadas 7Star (GE Healthcare) em sistema de impressão Microarray Spotter Generation III da Molecular Dinamics (GE Healthcare), presente no laboratório CAGE, de acordo com os protocolos específicos de funcionamento do aparelho. Os amplificados das placas A1, A2, AB e B1 foram impressos duas vezes nas lâminas, enquanto que aqueles da placa G foram impressos uma única vez. Visto que cada lâmina contém duas colunas de impressão, ou seja, cada sonda é impressa duas vezes em cada lâmina, as lâminas de *T. reesei* contem quatro réplicas de cada sonda estudada. Como controle interno para as reações de síntese de cDNA a partir dos RNAs de referência e de estudo, marcação com fluoróforos específicos e hibridização da lâmina com a mistura dos cDNAs marcados, também foi impressa nas lâminas a placa Universal ScoreCard da qual algumas sondas hibridizam com cDNAs provenientes de RNAs adicionados ao RNA de condição de referência, enquanto outras, com cDNAs provenientes de RNAs adicionados ao RNA da condição de estudo.

4.5.2 Síntese e marcação de cDNAs para hibridização de microarrays.

Para a síntese e marcação de cDNAs a partir dos RNAs das amostras de condições de referência e de estudo foi utilizado o kit SuperScriptTM Plus Indirect cDNA Labeling System (InvitrogenTM Life Technologies) com fluoróforos Alexa Fluor®, seguindo o protocolo do kit adaptado pelo laboratório CAGE. As modificações realizadas no protocolo são brevemente descritas a seguir.

Na reação de síntese de cDNA foram utilizados 30 μ g de RNA total, 6,00 μ L de oligo(dT)₁₈₋₂₀ ancorado, além de ser adicionado 1,00 μ L de solução de RNA Spike de controle para hibridização com a placa Universal ScoreCard (para as amostras da condição de referência foi usado o Spike-Referência, enquanto para as de estudo, o Spike-Teste). Como se partiu de RNA total não foram adicionados à reação os hexâmeros aleatórios. Os demais reagentes e condições foram mantidos e a reação foi realizada por 3 horas a 46°C em bloco termostatizado ThermoBlok II (Eppendorf).

Após a hidrólise alcalina do RNA, a solução foi neutralizada pela adição e mistura de 10 μ L de 2 mol/L HEPES ácido, seguida de purificação utilizando protocolo de purificação em placas de filtro semelhante ao dos amplificados para a confecção das lâminas de microarray, ficando as diferenças em função do volume adicionado de tampão de purificação (120 μ L), número de lavagens com etanol 80% (quatro) e número e volume de 10 mmol/L Tris-HCl, pH 8,0, utilizados na eluição dos cDNAs dos filtros (duas eluições seguidas com 45 μ L). Obtidas as soluções purificadas dos cDNAs, essas foram transferidas para tubos *eppendorf* e evaporadas em SpeedVac.

Na etapa de marcação, os cDNAs secos foram primeiramente dissolvidos em 5 μ L de tampão de acoplamento. Sem incidência de luz direta, os fluoróforos foram então ressuspensos em mistura de 2 μ L de DMSO e 3 μ L de água DEPC por agitação em vórtex e imediatamente adicionados ao tubo *eppendorf* contendo os cDNAs correspondente àquela marcação. Os tubos com as reações de marcações foram mantidos durante uma noite a temperatura ambiente em recipiente protegido da luz dentro de gaveta de bancada. As amostras das condições de referência foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 555, correspondente ao fluoróforo Cy-3 e com excitação a 555 nm, enquanto as amostras das condições de estudo foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 647, correspondente ao fluoróforo Cy-5 e com excitação a 647 nm. São apresentados na tabela 1 os dados de marcação para as amostras dos experimentos de microarray realizados.

Tabela 1: Dados de rendimento de marcação das amostras dos experime ntos realizados para análise do perfil transcricional de *T. reesei* por microarrays. São apresentados os valores de massa de cDNA obtida a partir do RNA total, pmol de cada fluoróforo incorporado aos cDNAs e o número aproximado de fluoróforos incorporados a cada 100 bases de uma fita de cDNA. Os cálculos foram realizados de acordo com o manual do kit de marcação utilizado.

Marcação	cDNA	Alexa 555/	Alexa 647 /	# Alexa 555 /	# Alexa 647
	/ ng	pmor	ртог	100 Dases	/ IOU Dases
Choque Térmico					
HSRef1-555	307	23	_	18	_
HSRef2-555	226	21	_	2.3	-
HSRef3-555	340	15	-	1.1	-
HSRef4-555	289	16	-	1.4	-
HSRef5-555	303	30	_	2.5	-
HSRef1-647	252	-	13	-	1.3
HS-15'-647	233	-	16	-	1.8
HS-30'-647	237	-	15	-	1.6
HS-60'-647	241	-	38	-	4.1
28°C-60'-647	326	-	25	-	2.0
Adicão de Cádmio (II)	020				2.0
Cd(II)Ref1-555	507	31	-	1.5	-
Cd(II)Ref2-555	500	22	-	1.1	-
Cd(II)Ref3-555	481	25	-	1.3	-
Cd(II)Ref4-555	418	25	-	1.5	-
Cd(II)Ref1-647	459	_	27	_	1.5
Cd(II)-30'-647	503	_	30	-	1.5
Cd(II)-60'-647	459	-	23	-	1.3
Cd(II)-120'-647	366	-	20		1.3
Fonte de Nitrogênio					
NSRef1-1-555	389	21	-	1.3	-
NSRef1-2-555	366	31	-	2.1	-
NSRef0-1-555	433	33	-	1.9	-
NSRef0-2-555	400	25	-	1.5	-
NSRef0-3-555	389	31	-	2.0	-
NSRef1-647	385	-	37	-	2.4
NSRef0-1-647	418	-	38	-	2.3
NS-noN-647	451	-	30	-	1.7
NS-N-30'-647	396	-	29	-	1.8
NS-N-90'-647	440	-	23	-	1.3
Fonte de Carbono					
CSRef1-1-555	463	20	-	1.1	-
CSRef1-2-555	482	27	-	1.4	-
CSRef0-1-555	479	41	-	2.1	-
CSRef0-2-555	485	26	-	1.3	-
CSRef0-3-555	566	25	-	1.1	-
CSRef1-647	566	-	39	-	1.7
CSRef0-1-647	566	-	32	-	1.4
CSGlu0-647	591	-	37	-	1.6
CSGlu2%-30'-647	451	-	36	-	2.0
CSGlu2%-90'-647	469	-	16	-	0.9

A etapa de purificação seguinte à marcação foi realizada seguindo o mesmo protocolo que a purificação dos cDNAs para marcação e ao final dessa foram realizadas as medidas espectrofotométricas para quantificação e determinação do rendimento de síntese e marcação de cada amostra.

4.5.3 Hibridização e leitura das lâminas de microarray.

Para a hibridização das lâminas de microarrays com os cDNAs marcados foi seguido protocolo de hibridização desenvolvido no laboratório CAGE, que é brevemente descrito a seguir.

As amostras marcadas foram evaporadas em SpeedVac sob abrigo da luz e posteriormente cada par de amostras (referência e estudo) foi ressuspendida em 13,5 μ L de água deionizada. A essa solução foram adicionados outros 13,5 μ L de tampão de hibridização e 27,0 μ L de formamida deionizada, perfazendo um total de 54 μ L. Essa solução de hibridização foi fervida a 92°C por 3 minutos em bloco termostatizado, rapidamente regelada e centrifugada para aglutinação. Foi então dispensada sobre a lâmina de microarray em forma de uma linha próxima a uma das colunas de sondas. Cuidadosamente uma lamínula foi colocada sobre a lâmina de forma a espalhar homogeneamente a solução por sobre todas as sondas do microarray. As lâminas de todas as condições de estudo sendo hibridizadas foram colocadas conjuntamente em uma câmara de hibridização de vidro (num máximo de 5 lâminas por câmara), contendo um algodão umedecido com água deionizada, e essa, por sua vez, foi incubada por um período de no mínimo 16 horas a 42°C em forno de hibridização.

Passado 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 seqüencialmente as seguintes soluções: 1x SSC, 0,2% SDS a 55°C; 0,1x SSC, 0,2% SDS a temperatura ambiente; 0,1x SSC, 0,2% SDS a temperatura ambiente. A cada troca de solução de lavagem, as lâminas foram giradas em 180° para uma lavagem mais homogênea das lâminas. Por fim, foi realizada uma última lavagem com solução 0,1x SSC à temperatura ambiente com agitação por 1 minuto, antes das lâminas serem

mergulhadas rapidamente quatro vezes em água deionizada e secadas com jato de nitrogênio ultrapuro.

A leitura das fluorescências das sondas 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. Foram realizadas, para cada lâmina, utilizada três leituras, com ganhos de sinal da CCD diferentes: 650, 700 e 750V. Os arquivos referentes às imagens das lâminas foram então submetidos à extração dos dados de fluorescência para cada sonda do microarray.

4.6 Extração e análise dos dados de microarrays.

A normalização dos dados de fluorescência e o teste estatístico para a determinação daqueles genes como real variação de expressão foram realizados pelo aluno de pós-graduação do Departamento de Estatística e Ciência da Computação (IME – USP), e membro do Núcleo de Pesquisas em Bioinformática (BIOINFO-USP), Ricardo Z.N. Vêncio utilizando, respectivamente, o método de normalização com pesos locais LOWESS e ferramentas de bioinformática, baseadas no método HTself desenvolvido por ele, em conjunto com a aluna de pós-graduação do Departamento de Bioquímica (IQ-USP) Tie Koide (http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray) (Vencio e Koide, 2005).

4.6.1 Extração e normalização dos dados de fluorescência.

Os arquivos de imagens das lâminas dos microarrays obtidos pelo processo de leitura no scanner foram então analisados através do programa ArrayVisionTM 8.0 (Imaging Research, Inc.). Para a identificação das sondas nas lâminas de *T. reesei* foi fornecido ao programa um arquivo do mapa de posicionamento de cada sonda na lâmina e escolhida a opção de adição seqüencial de letras às réplicas de uma mesma sonda.

As opções de medidas extraídas pelo programa foram: principal medida, densidade com remoção de artefatos (ARMDens); valor de background calculado pela mediana; desvio padrão com remoção de artefatos; porcentagem de pixels removidos, pixels excluídos, flags, e densidade com remoção de artefatos normalizada pelos fluoróforos (cnARMDens). No cálculo do background foi selecionada a subtração por spots vizinhos em modo individual e para a normalização por fluoróforos foi escolhido o método LOWESS com parâmetros de LOWESS robusto com 3 iterações e 30% de cobertura.

Foram realizados os alinhamentos das grades de impressão das sondas conjuntamente em ambos os canais de fluorescência através do método clássico, com parâmetro de sensitividade 8 e raio 7, e com as opções de busca estendida e de estimativas de rotação e posicionamento de elementos.

Como opções de controle de qualidade foi pedido ao programa que colocasse flags automaticamente tanto para sondas quanto para o fundo em que 10%, ou mais, dos pixels ultrapassassem os limites inferiores ou superiores de detecção. Como controle de qualidade manual foram colocados flags em todos os spots em que 5%, ou mais, dos pixels fossem removidos como artefato.

Após o alinhamento e a extração das medidas foi realizada uma verificação visual das imagens em ambos os canais para as lâminas. Sondas suspeitas de terem sinal influenciado por manchas ou riscos receberam também flags manuais. Finda tal análise os dados foram extraídos e gravados em arquivos texto de planilhas do MS Excel (Microsoft®).

A normalização foi realizada por aproximação LOWESS no espaço M x A, onde M é a razão entre as intensidades de fluorescência dos fluoróforos de cada sonda (definido como M = $\log_2(I_{CE}/I_{CR})$, sendo CE a condição de estudo e CR a condição de referência) e A é a média geométrica das intensidades de fluorescência (definido como A = $\frac{1}{2}$ x $\log_2(I_{CE}$ x $I_{CR})$).

4.6.2 Determinação dos genes diferencialmente expressos.

Para a identificação de quais genes haviam sido diferencialmente expressos foram utilizadas ferramentas baseadas no teste estatístico HTself (http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/ HTself) (Vencio e Koide, 2005) que se vale da determinação de limites de corte dependentes da razão de intensidades de fluorescência em hibridizações homotípicas (por exemplo, condição de referência hibridizada contra ela mesma) e do uso de métodos nãoparamétricos. Brevemente, a função de probabilidade de densidade (*pdf*) nula foi definida localmente para M em um intervalo de A, no espaço M x A, através de método de Estimador de Densidade Kernel do tipo gaussiano, utilizando como dados para análise todas as medidas de densidade de fluorescência normalizadas obtidas nas 6 hibridizações homotípicas realizadas (Cd(II)Ref1-555 x Cd(II)Ref1-647, HSRef1-555 x HSRef1-647f, CSRef1-555 x CSRef1-647, CSRef0-1-555 x CSRef0-1-647, NSRef1-555 x NSRef1-647 e NSRef0-1-555 x NSRef0-1-647). Após estimar a *pdf* nula, os limites de cortes locais foram definidos como aqueles onde se encontravam 99% dos valores de M num determinado intervalo de A. O gráfico abaixo (Figura 2), do espaço M x A, representa os limites de corte definidos com os dados das hibridizações homotípicas realizadas.



Figura 2: Gráfico do espaço M x A onde foram plotados os valores de todas as réplicas de sondas presentes nas lâminas do microarray de *T. reesei* para todas as hibridizações homotípicas realizadas entre as amostras de referência de cada um dos experimentos. A linha contínua determina os limites de corte locais com a presença de 99% (p) dos pontos. M = $\log_2(I_{CE}/I_{CR})$; A = $\frac{1}{2} x \log_2(I_{CE} x I_{CR})$.

Definidos os limites de corte para a razão de fluorescência, foram analisados os dados das demais hibridizações, para todas as réplicas das sondas. Para cada sonda, foi então calculada a mediana do valor de M e a percentagem das réplicas que se encontravam em um de três grupos de expressão: Induzido, quando M se encontrava acima do limite de corte positivo naquele ponto de A; Reprimido, quando M se encontrava abaixo do limite de

corte negativo naquele ponto de A; e Invariável, quando M se encontrava entre os limites positivo e negativo naquele ponto de A.

Foram considerados diferencialmente expressos aqueles genes em que ao menos 66% das sondas (pelo menos, duas em três) estivessem nos grupos Induzido, ou Reprimido, sendo que a maioria dos genes nesses grupos apresentou 100% de porcentagem de réplicas concordantes.

4.6.3 Agrupamento dos genes diferencialmente expressos pelo perfil transcricional.

Uma vez identificados os genes diferencialmente expressos, as tabelas com os dados da mediana de M para cada gene e a porcentagem de inclusão de réplicas em determinado grupo de expressão para cada hibridização realizada foram importadas para um arquivo de banco de dados do MS Access (Microsoft®). Os dados das hibridizações foram agrupados em tabelas específicas para cada experimento, sendo somente considerados para as análises subseqüentes aqueles genes com dados presentes em todas as condições dos experimentos. Para se diminuir a possibilidade de falsos positivos foram utilizados nas etapas posteriores de agrupamento de genes, segundo os perfis de expressão, somente aqueles que apresentassem uma variação positiva ou negativa na razão de expressão de duas vezes (M ≥ 1 ou M ≤ -1) em pelo menos uma das condições de cada experimento.

O agrupamento dos genes diferencialmente expressos em grupos de perfis de expressão semelhantes foi realizado através do programa GeneCluster v2.1.7 (Cancer Genomics Group, Whitehead/MIT Center for Genome Research, http://www.broad.mit.edu/ cancer/software/genecluster2/gc_ref.html), utilizando o algoritmo de análise SOM (Self-Organizing Maps). Para melhor compreensão dos perfis de expressão de cada grupo, foi adicionado para cada experimento um ponto de referência inicial com valor de M igual a 0, uma vez que os valores de M para as amostras de referência eram todos do grupo de Invariantes já que os limites de corte foram definidos justamente pelos valores de M das hibridizações homotípicas dessas amostras.

4.7 Validação dos resultados dos microarrays.

Para a validação de dados dos microarrays foram realizadas hibridizações de Northern Blots das mesmas amostras de RNA utilizadas para a hibridização dos microarrays para grupos de genes de interesse específico. O desenvolvimento de eletroforese de RNA desnaturado por glioxal, sua transferência para membranas de nylon Hybond N+ (GE Healthcare) e hibridização com sondas especificas de genes marcadas radioativamente (Redivue ³²P-dATP, 3.000 Ci/mmol, GE Healthcare) com o Random Primer Labeling Kit (InvitrogenTM Life Technologies), e a hibridização das membranas com as sondas utilizando formamida como desnaturante seguiram os protocolos clássicos (Sambrook, Maniatis *et al.*, 1989) e o do kit mencionado.

4.8 Reanotoção do banco de ESTs de T. reesei.

Para uma correta análise dos resultados dos microarrays, foi realizada a reanotação manual de todos os clones TrEST que sofreram alguma alteração significativa de expressão em algum dos casos estudados, perfazendo um total de aproximadamente 750 ESTs. A reanotação foi realizada por busca de similaridade de seqüência no banco não-redundante de proteínas do banco de dados público do *National Center for Biotechnological Information* (NCBI) dos *National Institutes for Health* (NIH) dos Estados Unidos da América. Foi utilizado para tanto o algoritmo BLASTX (Altschul, Madden *et al.*, 1997) com a matriz de comparação BLOSUM62 e parâmetros padrão para as análises. Como regra geral, alinhamentos com nota abaixo de 80 foram desconsiderados, a não ser em casos muito específicos.

Os clones TrEST foram identificados, não pela proteína de melhor alinhamento, mas por aquela mais relevante, desde que o alinhamento fosse considerado suficientemente bom. Essa estratégia foi adotada devido à existência de várias seqüências de projetos genoma de fungos que estão anotadas somente como proteínas hipotéticas, ou hipotéticas conservadas, seguindo a linha mais conservadora de anotação segundo a qual sem dados funcionais não se pode inferir a real função dessas proteínas, ainda que tenham similaridade a outras conhecidas.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.

Para explorar os efeitos de diferentes estresses ambientais sobre a expressão gênica e o desenvolvimento de *Trichoderma reesei* foram estudadas quatro condições às quais esse fungo pode se encontrar submetido em seu habitat natural: 1) choque térmico; 2) exposição a metais pesados, no caso a cádmio (II); 3) ausência de fonte de nitrogênio; e 4) ausência de fonte de carbono. Foram acompanhados o crescimento, por meio da concentração celular do fungo no meio líquido (Y, massa micelial por volume de cultura – g.L⁻¹), e o consumo da fonte de carbono disponível, por meio da determinação da concentração extracelular de glicose (mmol.L⁻¹), nessas condições e realizaram-se comparações com os valores observados para condições usuais de crescimento.

Os efeitos dessas condições sobre a expressão gênica de *T. reesei* foram examinados através de hibridizações de *microarrays* com aproximadamente 2.000 sondas representando cDNAs, seqüenciados a partir de duas bibliotecas (Chambergo, Bonaccorsi *et al.*, 2002; Bonaccorsi, 2003), e genes amplificados do genoma (Bonaccorsi, 2003; Bonaccorsi, 2005).

As etapas seguintes à obtenção do micélio das condições de interesse para análise do perfil transcricional de *T. reesei* estão detalhadamente descritas na seção de *Materiais e Métodos*. Assim, segue somente um pequeno resumo das etapas por quais todas as amostras dos quatro estresses passaram.

O RNA das amostras de micélio maceradas foi extraído com o reagente TRIzol (InvitrogenTM Life Technologies) e quantificado espectrofotometricamente, para ser então utilizado na síntese e marcação de cDNAs com fluoróforos Alexa Flúor® por meio do kit SuperScriptTM Plus cDNA Indirect Labeling System (InvitrogenTM Life Technologies).

Após as etapas de hibridizações e leitura das fluorescências das lâminas hibridizadas, foram realizadas a extração dos dados de densidade de fluorescência, descontada do background e de possíveis artefatos, para cada uma das 1920 sondas do *microarray* de *T. reesei* por meio do programa ArrayVisionTM 8.0 (Imaging Research, Inc.) e a normalização das intensidades de fluorescência pelo método LOWESS. A definição das sondas representando genes diferencialmente expressos foi realizada por meio do método HTSelf (http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/htself) (Vencio e Koide, 2005), desenvolvido pelos

doutorandos Ricardo Z. N. Vêncio, do Departamento de Estatística e Ciência da Computação (IME-USP), e Tie Koide, do Departamento de Bioquímica (IQ-USP).

Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles em que 66% ou mais das réplicas das sondas tinham valores de razão de expressão M [M = $\log_2(I_{CE}/I_{CR})$, sendo I_{CE} a densidade de fluorescência normalizada para a condição de estudo, e I_{CR} , a para a condição de referência] fora dos limites de corte definidos no espaço M x A [A = $\frac{1}{2}$ x $\log_2(I_{CE} \times I_{CR})$] por 99% dos valores de M provenientes das hibridizações homotípicas das condições de referência.

Os valores das medianas das razões de expressão das sondas dos genes cuja expressão foi modificada foram então incorporados a um banco de dados criado em MS Access (Microsoft®). Subseqüentemente foram analisados aqueles genes presentes em todas as condições de estudo específicas à resposta a um determinado estresse que apresentassem uma variação de duas ou mais vezes, positiva ou negativamente, em suas razões de expressão em pelo menos uma dessas condições.

Por meio de análise utilizando o algoritmo SOM (Self-Organizing Maps) do programa GeneCluster v.2.1.7 (Cancer Genomics Group, Whitehead/MIT Center for Genome Research, http://www.broad.mit.edu/cancer/software/genecluster2/), em condições específicas para cada um dos experimentos, foram obtidos grupos de genes de perfil de expressão gênica semelhantes. Para a visualização dos diversos perfis de expressão desses grupos foram criados mapas de expressão com o programa visualizador TreeView (ref), que são apresentados em conjunto a gráficos fornecidos pelo programa GeneCluster detalhando o perfil de cada grupo.

Baseada na anotação atualizada (agosto de 2005) dos clones TrEST, por meio de busca de similaridade de seqüência utilizando o algoritmo BLASTX (*Materiais e Métodos*), e na descrição, presente no banco de dados público, dos genes de *T. reesei* amplificados a partir do genoma, foi realizada uma classificação por função celular, baseada no banco de dados EGAD (*The Expressed Gene Anatomy Database* – www.tigr.org/tdb/egad/ egad.shtml) e no projeto Gene Ontology (http://www.geneontology.org), dos genes cuja transcrição foi induzidas, ou reprimida, em resposta a cada um dos estresses. Tabelas com dados de expressão dos diversos genes, separados por função celular, nas diferentes condições estudadas são apresentadas no *Apêndice*.

5.1 Efeitos do choque térmico a 40°C sobre *T. reesei*.

Para se averiguar a resposta transcricional de *T. reesei* a choque térmico foi escolhida a temperatura de 40°C com base na literatura disponível que se refere a choque térmico em fungos (Ivey, Kays *et al.*, 2002 ; Bai, Harvey *et al.*, 2003b; Chen, Toone *et al.*, 2003).

5.1.1 Efeito da temperatura de 40°C sobre o crescimento de T. reesei.

Para determinar se *T. reesei* seria capaz de crescer nessa temperatura e, em caso positivo, qual o efeito dela sobre seu crescimento, foram realizados inicialmente cultivos paralelos do fungo em meio completo com 2% glicose, como principal fonte de carbono, a 28 e 40°C para comparação de crescimento e consumo de glicose entre eles.

Depois das etapas de pré-cultura e substituição de meio (*Materiais e Métodos*), duas culturas paralelas foram incubadas a 28°C por período de 5 horas, após o qual uma das culturas passou a ser incubada a 40°C. Alíquotas das duas culturas foram retiradas para determinação da concentração celular e concentração extracelular de glicose anterior e posteriormente a essa mudança de temperatura, para a observação do efeito da mesma sob esses parâmetros. As curvas de crescimento, em função da concentração celular (Y, g.L⁻¹) e concentração extracelular de glicose (mmol.L⁻¹) desses cultivos são apresentadas abaixo (Figura 3 A, B e C).

A velocidade específica de crescimento ($\mu - h^{-1}$) para ambas as culturas foi calculada através de regressão linear dos valores de ln(Y) do intervalo de crescimento exponencial de 5 a 9 horas (Figura 4 A e B). Comparando-se o valor de μ nas duas condições de temperatura, verifica-se que *T. reesei* não só resiste a temperatura de 40°C como também passa a ter uma velocidade de crescimento maior do que a observada a 28°C ($\mu_{28°C} = 0,092$ $h^{-1} e \mu_{40°C} = 0,134 h^{-1}$).

Analisando as curvas de crescimento e consumo de glicose a 40°C (Figura 3 C), é particularmente relevante o rápido decréscimo da concentração de glicose no meio, que estaria relacionado a um aumento da produção de energia por parte do fungo para ser desviada para os mecanismos de adequação à temperatura elevada.



Figura 3: Curvas de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* nas temperaturas de 28 e 40°C. A. Gráfico comparativo das curvas de crescimento de *T. reesei* em meio completo nas temperaturas de 28 e 40°C. Curvas de crescimento e consumo de glicose de *T. reesei* em meio completo a 28°C (B) e 40°C (C). Y, concentração celular determinada por massa seca (*Materiais e métodos*).

A análise do gráfico de velocidade específica de crescimento a 40°C (Figura 4 B) parece indicar que na primeira hora após a mudança de temperatura, de 5,0 a 6,0 horas, ocorreu um drástico aumento na velocidade de crescimento (linha pontilhada), que então seria mais alta (o coeficiente angular da reta, $B = \mu = 0,227 \text{ h}^{-1}$) do que a determinada para todo o intervalo analisado, de 5,0 a 9,0 horas. Após essa primeira hora de choque térmico, intervalo de 6,0 a 9,0 horas, a velocidade de crescimento do fungo diminuiria para valor mais próximo, ainda que maior (linha tracejada, $B = \mu = 0,112 \text{ h}^{-1}$), daquele observado para a cultura a 28°C ($\mu = 0,092 \text{ h}^{-1}$, Figura 4 A).



Figura 4: Gráficos de determinação da velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* em meio completo a 28 e 40°C. Os valores de logaritmo natural da concentração celular (Y) das alíquotas retiradas na fase exponencial de crescimento foram plotados em função do tempo de cultura para a determinação da velocidade específica de crescimento (**m**) por regressão linear. Para a determinação de **m**foram utilizados os dados das 4 alíquotas compreendidas no intervalo de 5,0 a 9,0 horas de cultura. Nos gráficos para as culturas a 28°C(A)e 40°C (B) também são apresentados os dados das respectivas regressões lineares: A, coeficiente linear, B, coeficiente angular (**m**), R, índice de correlação de Pearson e P, índice de confiança.

Em vista desses resultados, concluiu-se a temperatura de 40°C não afeta de forma negativa o desenvolvimento fisiológico de *T. reesei*, pelo menos em um curto período de tempo, sendo essa temperatura então apropriada para o estudo da resposta transcricional a esse tipo de estresse.

5.1.2 Resposta transcricional de T. reesei ao choque térmico a 40°C.

Em vista dos resultados do efeito da temperatura de 40° C sobre o crescimento de *T. reesei*, decidiu-se avaliar a resposta transcricional do fungo a um choque térmico nessa temperatura pelo período de 1 hora, sendo analisadas amostras retiradas após 15, 30 e 60 minutos para a obtenção de um perfil cinético da expressão dos genes e a possível determinação dos envolvidos na resposta inicial e daqueles envolvidos numa resposta contínua a esse estresse.

Para obter uma mudança homogênea da temperatura num curto intervalo de tempo, as culturas submetidas ao choque térmico foram incubadas em banhos termostatizados com prateleiras giratórias ao invés de em agitadores orbitais. Detalhes das condições de cultura estão descritos na seção de *Materiais e Métodos*, mas em resumo: depois das etapas de précultura em agitador orbital a 28°C e substituição de meio, o micélio foi inoculado em meio completo com 2% glicose, e então passado para um banho termostatizado pré-aquecido a 28°C, permanecendo nessa condição por duas horas. Após esse período, uma amostra de micélio para extração de RNA da condição de referência foi filtrada e congelada em nitrogênio líquido e a cultura foi repassada para outro banho termostatizado, pré-aquecido a 40°C. Passados 15, 30 e 60 minutos da cultura no banho a 40°C foram filtradas e congeladas as três amostras de micélio para extração de RNA correspondentes às condições de choque térmico. Retornou-se a cultura, então, para o banho a 28°C para após 1 hora foi filtrada e congelada amostra de micélio para extração de RNA relativa à condição de retorno à temperatura usual de cultivo. A curva de crescimento para o experimento do qual foram extraídas as amostras para a análise transcricional da resposta de *T. reesei* ao choque térmico é apresentada a seguir (Figura 5), com as indicações dos pontos de mudança de temperatura e de obtenção de micélio para extração de RNA.

Na análise da resposta transcricional de *T. reesei* ao choque térmico a 40°C, as condições de estudo foram: 15, 30 e 60 minutos de choque térmico a 40°C, e 60 minutos a 28°C posteriores ao choque térmico (120 minutos após o início do choque térmico), sendo então os respectivos cDNAs marcados com o fluoróforo Alexa Fluor® 647 para as hibridizações de *microarrays*. O RNA obtido a partir da amostra de massa micelial retirada imediatamente antes do início do choque térmico (2,0 horas a 28°C em banho termostatizado) foi utilizado como referência, sendo o respectivo cDNA marcado com o fluoróforo Alexa Flúor® 555 para as hibridizações de *microarrays*. Na tabela 2 é apresentado um resumo dos dados obtidos das hibridizações de *microarrays* de *T. reesei* referentes a essas quatro condições.

Após a incorporação dos valores das medianas das razões de expressão dos genes cuja expressão ao banco de dados criado em MS Access (Microsoft®) foram analisados aqueles presentes nas condições de choque térmico a 40°C e de retorno a 28°C que apresentassem uma variação de duas ou mais vezes, positiva ou negativamente, em suas razões de expressão em pelo menos uma dessas condições. Esse conjunto final somou um total de 603 genes.



Figura 5: Curva de crescimento da cultura de *T. reesei* submetida a choque térmico a 40°C para o estudo da resposta transcricional do fungo a esse estresse. Valores de concentração celular (Y) determinada por massa seca (*Materiais e Métodos*) foram plotados contra o tempo de permanência da cultura em banhos termostatizados com agitação. São indicadas por setas o momento de mudança da temperatura da cultura e os momentos de filtragem de micélio para a extração de RNA a ser utilizado em hibridizações com *microarrays* de DNA de *T. reesei*.

Condição	Total	Invariantes	Reprimidos	Induzidos	Modificados
40°C – 15 min	1.635	895	373	367	740 (45,3%)
40°C – 30 min	1.679	858	404	417	821 (48,9%)
$40^{\circ}\mathrm{C}-60\mathrm{~min}$	1.662	967	356	339	695 (41,8%)
28°C – 120 min	1.667	1.012	332	323	655 (39,5%)

Tabela 2: Número de genes para cada condição de estudo do experimento de choque térmico após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas.

Total: número de genes que foi considerado para a análise estatística; Invariantes, genes cujas razões de expressão ficaram compreendidas entre os limites de corte do teste HTSelf; Reprimidos, genes cujas razões de expressão ficaram abaixo do limite negativo de corte do teste HTSelf; Induzidos, genes cujas razões de expressão ficaram acima do limite positivo de corte do teste HTSelf; Modificados, soma e porcentagem do número de genes Induzidos e Reprimidos.

Considerando esse grupo de 603 genes, foi determinada uma distribuição do número de genes induzidos, e dos reprimidos, em duas, ou mais, vezes para cada uma das quatro condições de estudo, que é apresentada na figura 6.



Número de genes de T. reesei cuja expressão foi afetada pelo choque térmico a 40°C.

Figura 6: Distribuição dos genes de *T. reesei* induzidos, e dos reprimidos, para cada condição de estudo da resposta ao choque térmico a 40°C. Para cada um dos três tempos de cultura a 40°C e para a condição de retorno a 28°C foram contados os genes cujo logaritmo, na base dois, da razão de expressão (M) foi maior, ou igual, a 1,0 (Induzidos), e aqueles cujo M foi menor, ou igual, a -1,0 (Reprimidos).

Para melhor relacionar os perfis transcricionais desses 603 genes nas condições de estudo (15, 30 e 60 minutos de choque térmico) aos da condição de referência, $28^{\circ}C - 0$ minuto, foi arbitrariamente dado o valor 0 para o logaritmo, na base dois, da razão de expressão, M, para a condição de referência, já que esses próprios valores foram utilizados para determinar os limites de M para se considerar a variação, ou não, da expressão gênica e, portanto, pertencem a faixa de invariabilidade. Os dados para a condição padrão também foram, assim, incluídos na análise para a determinação dos grupos de genes com perfil transcricional semelhante.

Por meio de análise utilizando o algoritmo SOM (Self-Organizing Maps) do programa GeneCluster v.2.1.7, com os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 150.000 iterações com faixa de difusão igual a 75, faixa de aprendizado de 2 a 0,00005 e faixa de atualização de 5 a 0,0001, foram gerados, num arranjo 6 x 5, 30 grupos de genes / TrEST com perfil de transcrição semelhante.

Nas páginas a seguir (Figura 7 A, B, C, D e E) são apresentados os 30 grupos de genes com perfis transcricionais, em resposta ao choque térmico, semelhantes por meio de mapas de expressão criados no programa TreeView acompanhados de gráficos ilustrando as médias dos valores de razão de expressão para cada condição e os limites desses valores para cada um dos grupos, além da identificação de cada sonda (clone TrEST ou gene de *T. reesei*). Baseada na anotação atualizada dos genes cuja transcrição foi induzidas, ou reprimida, em resposta ao choque térmico, ou ao retorno à temperatura de 28°C após o mesmo foi montada uma tabela desses 603 genes classificados funcionalmente (tabela 8, *Apêndice*) conjuntamente com sua identificação e com os valores das respectivas medianas da razão de expressão (M).

A distribuição do número de genes (figura 6), os mapas de expressão do diversos grupos de perfis de expressão semelhantes (figura 7), e uma inspeção visual da tendência da razão de expressão dos 603 genes que foram induzidos, ou reprimidos (tabela 8, *Apêndice*), em relação ao tempo de choque térmico demonstra que o ponto de maior modificação do padrão transcricional de *T. reesei* em relação à condição de temperatura normal de cultivo (28°C) foi aquele após 30 minutos do início do estresse. É de especial interesse observar que depois de uma hora sob choque térmico, a tendência observada para a maior parte dos genes é a de nível de expressão mais próximo ao anterior ao estresse, demonstrando, portanto, que *T. reesei* já se encontrava em franco processo de adaptação à nova condição de crescimento em temperatura elevada. No retorno à condição de temperatura normal de cultivo, verifica-se que essa maioria tem seu nível de expressão igual à condição de referência inicial, ou completamente inversa à observada na condição de estresse, identificando o alívio das restrições energéticas e fisiológicas causadas pelo estresse térmico.



Figura 7A: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função do tempo de permanência da cultura à 40°C (0, 15, 30 e 60 minutos) e à 28°C (60 minutos após o choque térmico). Os 603 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar foram ordenados decrescentemente pelo $\log_2(razão de expressão)$ do ponto de 60 minutos a 40°C e são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão. Também são apresentados os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 7B: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função do tempo de permanência da cultura à 40°C (0, 15, 30 e 60 minutos) e à 28°C (60 minutos após o choque térmico). Os 603 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar foram ordenados decrescentemente pelo $\log_2(razão de expressão)$ do ponto de 60 minutos a 40°C e são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão. Também são apresentados os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Os 603 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar foram ordenados decrescentemente pelo log2(razão de expressão) do ponto de 60 minutos a 40°C e são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão. Também são apresentados os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.







Figura 7D: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função do tempo de permanência da cultura à 40°C (0, 15, 30 e 60 minutos) e à 28°C (60 minutos após o choque térmico). Os 603 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar foram ordenados decrescentemente pelo $log_2(razão de expressão)$ do ponto de 60 minutos a 40°C e são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão. Também são apresentados os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 7E: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função do tempo de permanência da cultura à 40°C (0, 15, 30 e 60 minutos) e à 28°C (60 minutos após o choque térmico). Os 603 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar foram ordenados decrescentemente pelo $\log_2(razão de expressão)$ do ponto de 60 minutos a 40°C e são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão. Também são apresentados os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.

Para uma exploração da resposta ao choque térmico em função das funções celulares dos genes / TrESTs cuja expressão foi alterada consideraram-se aqueles que foram constantemente induzidos ($M \ge 1$ em uma condição e $M \ge 0$ nas demais), ou reprimidos ($M \le -1$ em uma condição e M < 0 nas demais) em resposta ao choque térmico, e aqueles que sofreram indução, ou repressão, no retorno à 28°C. Os gráficos dos resultados da distribuição das funções celulares em resposta a esse estresse são apresentados abaixo (Figura 8).

A despeito do grande número de genes com função desconhecida cuja expressão foi modificada como resposta ao choque térmico e que a partir de então passam a ter sua primeira característica funcional determinada, podemos distinguir claramente alguns aspectos gerais dessa resposta em termos de funções celulares dos genes induzidos ou reprimidos (Tabela 8, *Apêndice*).

Na categoria de defesa celular, como esperado, a resposta ao estresse se concentrou na indução das proteínas de choque térmico, que após o período de 1 hora a 28°C ou retornaram ao nível transcricional prévio ao estresse ou foram reprimidas. A maioria das proteínas de choque térmico são chaperonas, ou chaperoninas, cuja função principal na resposta ao choque térmico é o de re-enovelar as proteínas desnaturadas. Hsp98 (Vassilev, Plesofsky-Vig *et al.*, 1992), da família das HSp100/Clp (Schirmer, Glover *et al.*, 1996), tem a capacidade de desagregar os aglomerados de proteínas desnaturadas, que uma vez livres podem então ser renaturadas pela ação da Hsp70 . A indução observada da transcrição do gene da superóxido dismutase mitocondrial (SODM) indica o aumento da concentração intracelular de O_2 .⁻ associado ao choque térmico já descrito previamente (Bai, Harvey *et al.*, 2003a).

A repressão da transcrição dos genes das histonas H3 e H4, assim como de uma chaperona específica para essas proteínas e de uma proteína de ligação aos nucleossomos (NHP6A - *A. fumigatus*) (Kolodrubetz e Burgum, 1990) durante o choque térmico indica pelo menos uma pausa no ciclo e divisão celulares, o que é corroborado pela menor expressão do gene que codifica septina B, envolvida na formação do septo divisional das células (Casamayor e Snyder, 2003), e do que codifica o fator CHF2 (*S. cerevisiae*), relacionado ao controle do ciclo celular (Bieganowski, Shilinski *et al.*, 2004).

Em termos de sinalização celular, a indução da transcrição de genes relacionados a uma subunidade alfa de proteína G (Yang e Borkovich, 1999) e à unidade catalítica da PKA, além da repressão da transcrição do gene que codifica a proteínas quinase RIM15, pode ser vista já como uma resposta secundária do choque térmico, visto que tanto a subunidade G_{α} quanto a proteína quinase PKA têm um papel na regulação negativa das respostas a estresse enquanto que a quinase RIM15 está relacionada à indução dessas mesmas respostas(Thevelein e De Winde, 1999).



Figura 8: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pelo choque térmico da cultura a 40°C, ou pelo retorno à temperatura normal de crescimento (28°C). Ao lado de cada fatia, são apresentados, respectivamente àquela função celular, o número de genes que sofre alteração em sua expressão e a correspondente porcentagem em relação ao total de genes com alteração. O grupo de função desconhecida inclui os genes / clones TrEST sem similaridade de seqüência no banco de dados público e aqueles cuja similaridade se faz com potenciais ORFs sem função anotadas em genomas seqüenciados.

Também sofreram repressão da expressão os genes correspondentes às proteínas fosfatase 2C (Meskiene, Baudouin *et al.*, 2003) e PPS1 (Ernsting e Dixon, 1997), às quinases DSK1 (Takeuchi e Yanagida, 1993) e caseína quinase II (Roussou e Draetta, 1994), à GTPase RHO3 (Matsui e Toh, 1992)e ao sensor osmótico SHO1 (Maeda, Takekawa *et al.*, 1995). Outros genes induzidos foram aqueles que codificam para uma bomba de cálcio, e para proteínas similares a proteínas fosfatases e quinases sem função específica.

A indução e manutenção de uma expressão elevada de genes que codificam enzimas relacionadas à biogênese da parede celular refletem a ação danosa do choque térmico sobre essa estrutura protetora das células, indicando uma resposta contínua de reciclagem da parede celular para a manutenção da integridade celular. Já a repressão de genes relacionados a proteínas que são secretadas, ou que sejam relacionadas à esporulação como a hidrofobina II, indica tanto uma pausa no ciclo celular quanto uma economia energética em função da suspensão da síntese de proteínas não essenciais à resposta ao estresse.

Em termos metabólicos, as funções anabólicas em termos de aminoácidos, lipídeos e nucleotídeos foram negativamente afetadas no nível transcricional, com a expressão dos genes relacionados a tais funções atingindo o nível mínimo em 30 minutos de choque térmico e, no caso da maioria, já em recuperação aos 60 minutos de estresse. Já as funções catabólicas tanto de açúcares como de lipídeos foram induzidas para a obtenção da energia necessária em termos de ATP para promover a resposta ao estresse e principalmente à recuperação ou degradação das proteínas desnaturadas pela temperatura elevada. Nesse sentido, os genes da maior parte dos transportadores teve sua expressão reprimida.

Como mencionado anteriormente, 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. Dentre os processos celulares que mais consomem energia na célula está a biogênese dos ribossomos e o processo generalizado de tradução. Embora essenciais, a simples repressão da expressão dos genes das proteínas ribossomais e dos vários fatores de iniciação e elongação da tradução já corresponde a uma grande economia energética. Dessa forma, a expressão altamente coordenada desses genes é, como observado para o choque térmico, diminuída de forma drástica num primeiro momento, sendo depois lentamente retomada a medida que a célula se adapta à nova condição ambiental.

Genes que codificam enzimas envolvidas na modificação pós-traducional e endereçamento de proteínas também foram reprimidos, assim como aqueles relacionados à maquinaria de secreção de proteínas para o meio extracelular. Uma exceção em particular observada foi a da indução do gene que codifica o fator de iniciação de transcrição SUI1 (Cui, Dinman *et al.*, 1998), relacionado ao fator eIF1 α que é induzido em choque térmico para promover a tradução de mRNAs específicos correspondentes a proteínas de resposta a esse estresse. Também sofreram indução na expressão dois genes que codificam aminoacil-tRNA sintetases, que podem estar envolvidas na tradução específica desses mRNAs.

Para que não ocorra o acúmulo de proteínas que tenham sido irreversivelmente afetadas, a maquinaria de degradação protéica deve estar em pleno funcionamento durante a resposta a um estresse ambiental. Assim, foi verificada a indução de genes que codificam tanto proteases e peptidases como de uma subunidade reguladora do proteasomo e de uma poliubiquitina. Já os genes de proteases relacionadas à degradação de fontes externas de peptídeos, obtidas por endocitose, por exemplo, sofreram uma regulação negativa, seguindo o princípio de economia energética.

Componentes das maquinarias de transcrição e processamento de RNA, além de diversos fatores de transcrição, tiveram a expressão de seus genes reprimida. Os genes dum fator de transcrição do tipo *zinc finger* C2H2 e do coativador MBF1 (Takemaru, Harashima *et al.*, 1998) sofreram uma regulação positiva identificando-os como possíveis fatores que integrem a resposta ao choque térmico.

5.2 Efeitos da presença de cádmio (II) no meio sobre T. reesei.

Uma vez que havia pouca literatura (Frank e Tamova, 1993; Gharieb, 2001; Guelfi, Aze vedo *et al.*, 2003) a respeito do efeito de cádmio (II) sobre o crescimento de fungos filamentos, e nenhuma envolvendo *T. reesei*, antes do estudo da resposta transcricional do mesmo à presença desse metal no ambiente foram realizadas culturas em meios sólido e líquido para se determinar uma concentração de trabalho para esse íon no nosso modelo.

5.2.1 Efeito de cádmio (II) sobre o crescimento de T. reesei.

Inicialmente, para identificar qual o efeito sobre o crescimento de *T. reesei* resultante da adição de cádmio (II) ao meio de cultura, aproximadamente 10^6 esporos de *T. reesei* foram inoculados em meio sólido PDA contendo diferentes concentrações de sulfato de cádmio (II) (CdSO₄) dissolvido (*Materiais e Métodos*). A germinação e o crescimento após 36 horas foram comparados com inóculos de mesma quantidade de esporos em meio sem cádmio, ou com as mesmas concentrações de sulfato de sódio (Na₂SO₄). Fotos desses cultivos são apresentadas abaixo (Figura 9).

Verifica-se que, até a concentração de 50 μ mol.L⁻¹ de CdSO₄, não há influência visível sobre o crescimento de *T. reesei* quando são comparados os inóculos em meio contendo esse sal, sem ele, ou com Na₂SO₄. A partir dessa concentração, há uma correlação direta entre o aumento da concentração de cádmio (II) no meio e a diminuição do crescimento do fungo, chegando ao extremo de a 1,00 mmol.L⁻¹, praticamente o fungo não ser capaz de germinar. Não foi observada mudança no crescimento de *T. reesei* com a adição de Na₂SO₄, evidenciando que as quantidades de sulfato adicionadas ao meio, por serem muito menores do que a presente, não influenciaram o crescimento.

Em vista desses resultados, foram realizadas então culturas em meio líquido mínimo com a adição de CdSO₄ (*Materiais e Métodos*). Após a pré-cultura e toca de meio, o crescimento do micélio e o consumo de glicose, determinados pela concentração celular e pela concentração extracelular de glicose, respectivamente, foram acompanhados em três cultivos paralelos: o primeiro sem a adição de CdSO₄, o segundo com 50 μ mol.L⁻¹ CdSO₄. e o terceiro com 500 μ mol.L⁻¹ CdSO₄. Os dados são apresentados nos gráficos abaixo (Figura 10).



Figura 9: Crescimento de *T. reesei* após 36 horas em meio sólido PDA na presença de CdSO₄. 10⁶ esporos foram inoculados em meio PDA na presença de diferentes concentrações de CdSO₄, ou de Na₂SO₄ como controle (A, B, C), para a verificação da influência dos íons desse metal de transição sobre a germinação e crescimento do fungo. Uma comparação direta entre a germinação e o crescimento de *T. reesei* na presença de concentrações crescentes de CdSO₄ também é apresentada (D). Em todas as placas foram também realizados inóculos na ausência de qualquer um dos dois sais para comparação.

Como visto nas culturas em meio sólido a concentração de 50 μ mol.L⁻¹ CdSO₄ não alterou o crescimento de *T. reesei*, enquanto que surpreendentemente a concentração de 500 μ mol.L⁻¹ CdSO₄ causou um aumento substancial na massa micelial, devido ao aumento na velocidade específica de crescimento do fungo (figura 11), em discordância com o observado na cultura em meio sólido.

Durante a fase exponencial de crescimento a velocidade específica de crescimento (μ) das culturas de *T. reesei* em meio mínimo sem adição de CdSO₄ e com 50 μ mol.L⁻¹ CdSO₄ foi praticamente a mesma (0,082 e 0,078 h⁻¹, respectivamente). Para a cultura com 500 μ mol.L⁻¹ CdSO₄ o valor de μ foi de 0,117 h⁻¹.



Figura 10: Curvas de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* na presença ou ausência de CdSO₄. A. Gráfico comparativo das curvas de crescimento de *T. reesei* em meio mínimo suplementado com diferentes concentrações de CdSO₄. Curvas de crescimento e consumo de glicose de *T. reesei* em meio mínimo suplementado com 0 mmol.L⁻¹ (B), 50 mmol.L⁻¹ (C) e 500 mmol.L⁻¹ (D) CdSO₄. Y, concentração celular determinada por massa seca (*Materiais e métodos*).

O comportamento em meio sólido pode ser explicado como uma maior toxicidade do cádmio (II) para o processo de germinação de *T. reesei*, quando os mecanismos de resposta a esse metal ainda não foram completamente desenvolvidos, do que para o crescimento do fungo já na forma micelial. Uma possível explicação para o comportamento verificado na cultura líquida seria que esse metal poderia estar suprimindo alguma deficiência do meio que não estava descrita até o momento, já que, embora contenha certos íons de metais de transição (*Materiais e Métodos*), não há a presença de cádmio (II).



Figura 11: Gráficos de determinação da velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* em meio mínimo na presença ou ausência de CdSO₄. Os valores de logaritmo natural da concentração celular (Y) das alíquotas retiradas na fase exponencial de crescimento foram plotados em função do tempo de cultura para a determinação da velocidade específica de crescimento (**m**) por regressão linear. Para a determinação de **m**foram utilizados os dados das 6 alíquotas compreendidas no intervalo de 8,0 a 19,5 horas de cultura. Nos gráficos para as culturas com 0 **m**mol.L⁻¹ (A), 50 **m**mol.L⁻¹ (B) e 500 **m**mol.L⁻¹ (C) CdSO₄ também são apresentados os dados das respectivas regressões lineares: A, coeficiente linear, B, coeficiente angular (**m**), R, índice de correlação de Pearson e P, índice de confiança.

Em razão dos resultados obtidos pelo primeiro experimento, foi realizado um segundo cultivo nos mesmos moldes do primeiro, com a exceção de ser estudada uma única concentração intermediária de 250 μ mol. L⁻¹ CdSO₄. Os dados de concentração celular (Y) e de concentração de glicose, acompanhadas durante a cultura, são apresentados nos gráficos abaixo (Figura 12).



Figura 12: Curvas de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* na presença ou ausência de CdSO₄. A. Gráfico comparativo das curvas de crescimento de *T. reesei* em meio mínimo suplementado com diferentes concentrações de CdSO₄. Curvas de crescimento e consumo de glicose de *T. reesei* em meio mínimo suplementado com 0 mmol.L⁻¹ (B) e 250 mmol.L⁻¹ (C) CdSO₄. Y, concentração celular determinada por massa seca.
Confirmando o observado para a cultura contendo 500 μ mol.L⁻¹ CdSO₄, a cultura contendo 250 μ mol.L⁻¹ CdSO₄ também teve crescimento superior ao observado para a cultura sem a adição desse sal, como é comprovado pela velocidade específica de crescimento ($\mu = 0,122 \text{ h}^{-1}$) nessa condição, que foi praticamente igual à da cultura com 500 μ mol.L⁻¹ CdSO₄ (Figura 13).



Figura 13: Gráficos de determinação da velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* em meio mínimo na presença ou ausência de CdSO₄. Os valores de logaritmo natural da concentração celular (Y) das alíquotas retiradas na fase exponencial de crescimento foram plotados em função do tempo de cultura para a determinação da velocidade específica de crescimento (**m**) por regressão linear. Para a determinação de **m**foram utilizados os dados das 6 alíquotas compreendidas no intervalo de 2,5 a 13,0 horas de cultura. Nos gráficos para as culturas com 0 **m**mol.L⁻¹ (A) e 250 **m**mol.L⁻¹ (B) CdSO₄ também são apresentados os dados das respectivas regressões lineares: A, coeficiente linear, B, coeficiente angular (**m**), R, índice de correlação de Pearson e P, índice de confiança.

Em função dos resultados de crescimento em meio sólido e líquido, a concentração intermediária de 250 μ mol.L⁻¹ de CdSO₄ foi escolhida para o estudo da resposta transcricional de *T. reesei* à presença de íons desse metal no meio de cultura.

5.2.2 Resposta transcricional de T. reesei à adição de cádmio (II) ao meio.

Para estudar a resposta transcricional de *T. reesei* à adição de cádmio (II) ao meio, culturas paralelas em meio mínimo contendo glicose a 2% como fonte de carbono receberam um pulso de CdSO₄, ou Na₂SO₄, depois de 4 horas de adaptação ao meio (*Materiais e Métodos*). Alíquotas para o acompanhamento do crescimento, através de

massa seca e consumo de glicose, foram retiradas logo antes da adição dos sais e 15 e 30 minutos, 1,0, 2,0 e 4,0 horas após a adição. Foram retiradas amostras de massa micelial para a extração de RNA imediatamente antes e 30 minutos, 1,0 e 2,0 horas após a adição de CdSO₄, ou Na₂SO₄, para concentração final de 250 µmol.L⁻¹ (Figura 14). Como descrito anteriormente (*Materiais e Métodos*), as amostras de massa micelial foram filtradas e imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido até que fosse realizada a obtenção de RNA, pela maceração do micélio sob nitrogênio líquido e extração com o reagente TRIzol® (InvitrogenTM Life Technologies).





Figura 14: Curva de crescimento da cultura de *T. reesei* submetida à adição de cádmio (II) para o estudo da resposta transcricional do fungo a esse estresse. São indicados por setas os momentos da adição dos sais à cultura e de filtragem de micélio para a extração de RNA a ser utilizado em hibridizações com *microarrays* de DNA de *T. reesei* (*Materiais e Métodos*).

Seguindo o procedimento habitual (*Materiais e Métodos*), o cDNA correspondente a amostra de micélio em meio mínimo antes da adição de CdSO₄ foi marcado com o fluoróforo Alexa Fluor® 555 e utilizado como condição de referência para comparação com os cDNAs das amostras de 30 minutos, 1,0 e 2,0 horas de tratamento com esse sal, marcados com o fluoróforo Alexa Fluor® 647.

Após os procedimentos de hibridização das lâminas de *microarray*, extração dos dados de intensidade de fluorescência, normalização dos mesmos por LOWESS e

identificação dos genes diferencialmente expressos pelo método HTSelf (Vencio e Koide, 2005), descritos anteriormente (*Materiais e Métodos*), foram obtidos os resultados resumidos na tabela 3.

Tabela 3: Número de genes para cada um dos grupos de expressão após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas para cada uma das hibridizações heterotípicas realizadas para análise da resposta transcricional à presença de cádmio (II).

Experimento / Hibridização	Total	Invariantes	Reprimidos	Induzidos	Modificados
<i>Adição de Cádmio (II)</i> 30 min 60 min 120 min	1.816 1.750 1.806	1.516 1.353 1.582	117 171 78	183 226 146	300 (16,5%) 397 (22,7%) 224 (12,4%)

Total, número de genes de cada hibridização heterotípica que foi considerado para a análise estatística; Invariantes, genes cujas razões de expressão ficaram compreendidas entre os limites de corte do teste HTSelf; Reprimidos, genes cujas razões de expressão ficaram abaixo do limite inferior de corte do teste HTSelf; Induzidos, genes cujas razões de expressão ficaram acima do limite superior de corte do teste HTSelf; Modificados, soma e porcentagem do número de genes Induzidos e Reprimidos.

Os valores das medianas das razões de expressão dos genes cuja expressão foi modificada foram então incorporados ao banco de dados criado em MS Access (Microsoft®) e, subseqüentemente, foram analisados aqueles presentes nas três condições de estudo que apresentassem uma variação de duas ou mais vezes, positiva ou negativamente, em suas razões de expressão em pelo menos uma das três condições de presença de cádmio (II). Esse conjunto final somou um total de 97 genes a partir do qual foi determinada uma distribuição do número de genes induzidos, e dos reprimidos, em duas vezes, ou mais, para cada uma das condições de estudo, que é apresentada na figura 15.

Como anteriormente descrito, para melhor relacionar os perfis transcricionais desses 97 genes nas condições de estudo (30, 60 e 120 minutos após a adição de cádmio (II)) aos da condição de referência, cultura antes da adição, foi arbitrariamente dado o valor 0 para a razão de expressão M para a condição de referência, sendo os dados para a condição padrão também incorporados na análise para a determinação dos grupos de genes com perfil transcricional semelhante. Por meio de análise utilizando o algoritmo SOM (Self-Organizing Maps) do programa GeneCluster v.2.1.7, com os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 100.000 iterações com faixa de difusão igual a 50, faixa de aprendizado de 1 a 0,00005 e faixa de atualização de 5 a 0,0005, foram gerados, num arranjo 3 x 5, 15 grupos de genes / TrEST com perfil de transcrição semelhante.



Figura 15: Distribuição dos genes de *T. reesei* induzidos, e dos reprimidos, para cada condição de estudo da resposta à adição de cádmio (II). Para cada um dos três tempos de cultura na presença de cádmio (II) foram contados os genes cuja razão de expressão (M) foi maior, ou igual, a 1,0 (Induzidos), e aqueles cuja M foi menor, ou igual, a -1,0 (Reprimidos).

Na página a seguir (Figura 16) são apresentados os 15 grupos de genes com perfis transcricionais, em resposta ao choque térmico, semelhantes por meio de mapas de expressão criados no programa TreeView (A) acompanhados dos gráficos ilustrando as médias dos valores de razão de expressão para cada condição e os limites desses valores para cada um dos grupos (B), além da identificação de cada sonda (clone TrEST ou gene de *T. reesei*). Baseada na anotação atualizada (agosto de 2005) dos clones TrEST, foi realizada uma classificação por função celular dos genes cuja transcrição foi induzida, ou reprimida, em resposta à adição de cádmio. Os 97 genes / TrESTs classificados funcionalmente são apresentados na tabela 9 (*Apêndice*), conjuntamente a sua identificação e aos valores das respectivas medianas da razão de expressão (M).

250 mm/	ID Gene /
Cd2+	ID Clone
5.5.5	
12 0 3	
1	TrEST-B34DU5 TrEST-B43C07
2	Trest-A3340 Trest-A0277
	TrEST-B42A11 TrEST-A0191
	TrEST-A1667
	Trest-A0004
3	TrEST-AUU66 TrEST-A3488
	TrEST-A2520 TrEST-A0074
	TrEST-A2618 TrEST-A3747
	TrEST-A2258
4	TrEST-B11E01
	TrEST-A1813 TrEST-A2812
	TrEST-A0595 TrEST-A3651
5	TrEST-A3863
	TrEST-B15D12
	TrEST-A3427
6	TrEST-A2908 TrEST-B27G10
	TrEST-A3112 TrEST-A2606
	TrEST-A3946
	TrEST-B07H02
	Trest-B06F12
7	TrEST-B41H03 TrEST-B35B11
	TrEST-A2428 TrEST-A2012
	TrEST-A2747
	TrEST-A2091
	TrEST-A2609 TrEST-B12D05
	TrEST-A3454 TrEST-A0137
	TrEST-B38F03 TrEST-B28B09
	TrEST-A2590
	TrEST-A0150
	TrEST-A4128 TrEST-A1821
	TrEST-B17F07 TrEST-A0326
	TrEST-B06A02 TrEST-B18G08
	TrEST-A3430
	Tr255
	TrEST-A0415 TrEST-B35G01
	TrEST-A0140 TrEST-A3165
	TrEST-A2965 TrEST-A0011
10	TrEST-A0896
	TrEST-A1668
11	TrND4
	TrTRS1 TrEST-A3996
12	TrEST-AU231 TrEST-BO6D08
	TrEST-A3804 TrEST-A3673
13	TrEST-B06C07 TrEST-A1842
	TrEST-A0758
	TrEST-B14000 TrEST-B33B06
	TTEST-A0897 TTEST-A3037
	TrEST-B34B10 TrEST-A4034
34	TrEST-B33H12 TrEST-A2367
	TrEST-A1982
	TrEST-814608 TrEST-A1718
	TrEST-A3914 TrEST-A0678
15	TrEST-A0901 TrEST-A0358
	TrEST-A2651

Mapas Auto-organizáveis (Self-Organizing Maps - SOMs) dos clones / genes baseados em seus padrões de expressão.

В



Figura 16: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função do tempo de permanência do fungo em meio contendo inicialmente 250 mmol/L de cádmio (II).

A: Os 97 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos um dos pontos de tempo estudados, foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar foram então ordenados decrescentemente pelo log₂(razão de expressão) do ponto de 15 minutos em 250 **m**nol/L cádmio (II) e são apresentados através de figura obtida pelo programa visualizador de dados TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão.

B: Gráficos de padrão de expressão dos grupos de transcritos identificados pelo algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. São apresentados o número do grupo (c#) e o número de transcritos pertencente a cada grupo. A razão de expressão do grupo é apresentada pela média (linha azul) e os limites do grupo (linhas vermelhas).

A distribuição do número de genes (figura 15), os mapas de expressão do diversos grupos de perfis de expressão semelhantes (figura 16), e uma inspeção visual da tendência da razão de expressão dos 97 genes que foram induzidos, ou reprimidos (Tabela 9, *Apêndice*), em relação ao tempo de presença de íons de cádmio (II) demonstra que o ponto de maior modificação do padrão transcricional de *T. reesei* em relação a esse tratamento foi aquele após 60 minutos do início do estresse. É interessante observar que depois de duas horas da adição de cádmio (II), a tendência observada para a maior parte dos genes é a de nível de expressão mais próximo ao anterior ao estresse, demonstrando, portanto, que *T. reesei* já havia respondido e se adaptado à presença de íons desse metal.

Para uma exploração da resposta ao choque térmico em função das funções celulares dos genes / TrESTs cuja expressão foi alterada considerou-se os genes / TrESTs que foram constantemente induzidos (M >= 1 em uma condição e M > 0 nas demais), ou reprimidos (M <= -1 em uma condição e M < 0 nas demais) em resposta à adição de cádmio (II). Os gráficos dos resultados da distribuição das funções celulares em resposta a esse estresse são apresentados abaixo (Figura 17).



Figura 17: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pela adição de sulfato de cádmio (II) ao meio mínimo de cultura para uma concentração final de 250 mmol/L. Ao lado de cada fatia são apresentados, respectivamente àquela função celular, o número de genes que sofreu alteração e a correspondente porcentagem em relação ao total de genes com alteração. O grupo de função desconhecida inclui os genes / clones TrEST sem similaridade de seqüência no banco de dados público e aqueles cuja similaridade se faz com potenciais ORFs sem função anotadas em genomas seqüenciados.

A despeito do grande número de genes com função desconhecida cuja expressão foi modificada como resposta ao choque térmico e que a partir de então passam a ter sua primeira característica funcional determinada, podemos distinguir claramente alguns aspectos gerais dessa resposta em termos de funções celulares dos genes induzidos ou reprimidos (Tabela 9, *Apêndice*).

Dentro da categoria de defesa celular, ao contrário do ocorrido no choque térmico, somente 4 genes relacionados a HSPs tiveram sua expressão induzida pela presença de íons de cádmio (II) no meio: o de Hsp98 (família Hsp100/Clp) (Vassilev, Plesofsky-Vig *et al.*, 1992; Schirmer, Glover *et al.*, 1996), o da co-chaperone Hsp90 (Craig, Gambill *et al.*, 1993), o da Hsp30 (família das HSPs de pequeno peso molecular) (Plesofsky-Vig e Brambl, 1990) e o de uma proteína relacionada à ATPase DnaJ (Frydman, Nimmesgern *et al.*, 1994). Outros dois genes foram induzidos nessa categoria: o de uma proteína com função antioxidante de *Aspergillus nidulans* (LsfA) e o de um peptídeo relacionado a resposta a estresses. Visto que o efeito do cádmio (II) se dá por um desequilíbrio do balanço redox da célula (Jamieson, 2002), a indução de um gene relacionado à proteção espécies oxidantes mostra que realmente esse equilíbrio foi afetado pelo tratamento realizado com 250 μ mol.L⁻¹ de cádmio (II).

Ambos os genes que codificam as proteínas CDC48 e PIM1, relacionados ao ciclo celular foram induzidos pelo tratamento com cádmio (II), mas com perfis diferentes: o gene de CDC48, como a maioria, teve um pico de expressão uma hora após a adição do cádmio (II), enquanto o gene Pim1 sofreu uma indução crescente a partir da exposição a esses íons. CDC48 é uma ATPase da família AAA, cujas funções estão associadas à fusão de membranas (Ye, Meyer *et al.*, 2001)e, quando associada a um complexo multiprotéico, à extração de proteínas desnaturadas do retículo endoplasmático para o citoplasma, com poliubiquitinação concomitante, para conseqüente degradação (Schuberth, Richly *et al.*, 2004). Essa última função parece estar mais relacionada à indução por cádmio, visto que aparentemente *T. reesei* já havia se adaptado ao estresse, ou simplesmente compartimentalizado os íons de cádmio (II), uma hora após a adição dos mesmos. PIM1, por sua vez está relacionada ao controle da iniciação da mitose (Matsumoto e Beach, 1991) e sua indução após duas horas da adição dos íons de cádmio (II) demonstra que o fungo já havia respondido ao estresse e estava voltando ao curso normal de crescimento.

Na área de sinalização celular, o gene que codifica a proteína PALI, uma proteína com quatro hélices transmembranares envolvida na tradução de sinal do pH extracelular como provável co-sensor (Denison, Negrete-Urtasun *et al.*, 1998), teve sua expressão

induzida durante todo o período de acompanhamento ainda que tenha decrescido durante o decorrer do tempo. Como uma função específica ainda não foi descrita para essa proteínas, sua indução em outros estresses não diretamente relacionados a mudanças de pH extracelular pode indicar sua participação na tradução de outros sinais, possivelmente relacionados à membrana citoplasmática.

Em termos metabólicos, o efeito da adição de cádmio (II) na concentração de 250 μ mol.L⁻¹ não foi tão pronunciado como o visto em outros microorganismos. Na parte de metabolismo de aminoácidos, enquanto o gene que codifica a enzima T do complexo de clivagem da glicina, responsável pelo passo de incorporação do grupo metileno a tetraidrofolato, foi induzido, o gene da enzima P do mesmo complexo, que realiza a descarboxilação da glicina, foi reprimido. Visto que esse complexo também pode realizar a síntese de glicina com a reversão de suas reações, o perfil transcricional divergente desses genes pode indicar a indução da síntese de glicina ao invés de sua degradação. Seguindo essa mesma linha um gene envolvido na síntese do cofator piridoxal, importante para a degradação de aminoácidos, também sofreu repressão de sua transcrição.

Na parte energética, embora não tenha ocorrido nenhuma repressão da expressão de genes, foi interessante notar que passadas duas horas após a adição dos íons de cádmio (II), genes relacionados a subunidades do complexo I da cadeia respiratória e da ATP sintase foram transcricionalmente induzidos. Genes relacionados à produção de reservas energéticas como os de glicogenina e duma subunidade da sintetase de ácidos graxos foram reprimidos. Os genes que codificam para uma endoquitinase e para uma N-acetilglucosamina desacetilase, ambas envolvidas na degradação da parede celular foram envolvidos, provavelmente indicando a reciclagem dessa estrutura visto que muitos íons de cádmio (II) se complexam a proteínas e polímeros constituintes da mesma.

O fato mais marcante, entretanto, é a repressão acentuada de dois genes relacionados à prospecção e transporte de íons metálicos: o de um transportador de cobre (II), que possivelmente pode transportar cádmio (II), e o de uma metalorredutase, que altera o estado redox de íons metálicos para o transporte através de transportadores de membrana, favorecendo sua absorção pela célula. Esse perfil de expressão indica claramente uma das estratégias de defesa do fungo frente à alta concentração de cádmio (II) no meio: tentar barrar inicialmente o aumento da concentração intracelular desse íon, dificultando ao

máximo a entrada do mesmo na célula através dos mecanismos gerais de absorção de íons metálicos (Shiraishi, Inouhe *et al.*, 2000). O efeito da presença de cádmio (II) no meio sobre a repressão desses dois genes desaparece após as duas horas iniciais de tratamento, corroborando uma vez mais a hipótese de que após esse período *T. reesei* de alguma forma eliminou o estresse causado por esses íons.

Em termos de metabolismo protéico, genes relacionados à degradação protéica (subunidade do proteasomo, proteases e proteína relacionada ao autofagossomo) ou ao endereçamento de proteínas para sua degradação (poliubiquitina e proteína de endereçamento para o vacúolo) foram induzidos. Diferentemente do ocorrido no choque térmico praticamente não houve efeito sobre as proteínas ribossomais, indicando que *T. reesei* manteve seu nível de síntese protéica estável enquanto degradou aquelas proteínas que sofreram algum dano devido à presença de íons de cádmio (II). Considerando a área de síntese de RNA, dois genes de fatores transcricionais: o do cofator MBF1 (Takemaru, Harashima *et al.*, 1998)e o de um fator não identificado tiveram sua expressão induzida podendo, portanto, estar relacionados à resposta a esse estresse.

Por fim, é interessante observar que ocorreu a indução de uma proteína relacionada à senescência, identificada em ervilhas estocadas a baixas temperaturas com função protetora para aumentar a sobrevida das mesmas, associada de certa forma à defesa contra algum tipo de estresse.

Em vista desses perfis transcricionais e dos genes afetados podemos concluir que a concentração de 250 μ mol.L⁻¹ de cádmio (II) não afetou de forma drástica *T. reesei*, já que em momento algum o fungo reprimiu a maquinaria de tradução ou de transcrição, o que normalmente ocorre em função de condições bastante estressantes. Funções anabólicas em geral também não sofreram interferência. Fungos em geral têm grande capacidade de absorção de íons de metais pesados (Gharieb, 2001) e normalmente os compartimentalizam em seus vacúolos, através da complexação com glutationa e metalotioneína, e posterior transporte do complexo para o interior do vacúolo (Li, Lu *et al.*, 1997), para que não causem danos às proteínas e estruturas celulares em geral. Grande parte dos íons também se adsorve na parede celular, o que pode ser a causa da indução das enzimas envolvidas em sua degradação e reciclagem em vista dos prováveis danos causados.

Embora sejam necessários maiores estudos, o fato de que *T. reesei* parece ter em duas horas aparentemente eliminado o estresse pode demonstrar um potencial para sua utilização como agente de biorremediação de áreas contaminadas com metais pesados se for comprovado que está compartimentalizando a maior parte dos íons de cádmio (II) livres.

5.3 Efeitos da ausência de fonte de nitrogênio, e sua reposição, sobre T. reesei.

Para os experimentos de descrição da resposta transcricional de *T. reesei* à ausência de fonte de nitrogênio, seguida de sua reposição, foi utilizado um meio sem fonte de nitrogênio através da substituição no meio mínimo (*Materiais e Métodos*) do sulfato de amônio ($(NH_4)_2SO_4$) por sulfato de sódio (Na_2SO_4) em concentração molar equivalente (15,0 mmol.L⁻¹), de forma a manter intacta a composição em relação à fonte de enxofre.

5.3.1 Efeito da ausência de fonte de nitrogênio sobre o crescimento de T. reesei.

Duas pré-culturas paralelas de *T. reesei*, em meio completo com glicose a 2% (111 mmol.L⁻¹) como fonte de carbono, foram incubadas durante 18 horas sob as condições normais de crescimento *(Materiais e Métodos)*. Após esse período, foram realizadas a lavagem e a substituição do meio por meio mínimo sem fonte de nitrogênio *(Materiais e Métodos)*, seguidas de nova incubação sob as condições normais de crescimento por 3,5 horas, quando foi adicionado $(NH_4)_2SO_4$ para restaurar a concentração usual de fonte de nitrogênio no meio mínimo (15,0 mmol.L⁻¹). Alíquotas para determinação de massa seca e da concentração de glicose no meio foram retiradas da cultura para o acompanhamento do efeito dessa limitação nutricional sobre o crescimento de *T. reesei*. As curvas de crescimento celular, em função da concentração celular (Y) e consumo de glicose são apresentadas abaixo (Figura 18).

Aparentemente o período de limitação de fonte de nitrogênio não afetou o crescimento de *T. reesei*, sendo que as células não entraram em estado estacionário, o que é corroborado pelo contínuo consumo de glicose. Entretanto, logo após a adição de (NH₄)₂SO₄ como fonte de nitrogênio, ocorreu um aumento no consumo de glicose, sem o

correspondente pulso no crescimento. Tal fato pode estar relacionado ao consumo, durante a limitação de nitrogênio, de reservas alternativas de fontes de carbono para a suplementação de intermediários do ciclo de Krebs devido à falta de glutamato (Butow e Avadhani, 2004), que poderiam estar sendo então recompostas logo após o suprimento de uma boa fonte de nitrogênio com o aumento do consumo de glicose que era abundante no meio.



Figura 18: Curvas de crescimento de *T. reesei* e consumo de glicose em meio mínimo sem fonte de nitrogênio. É indicado o instante em que foi adicionado $(NH_4)_2SO_4$ para a reposição da fonte de nitrogênio.

5.3.2 Resposta transcricional de T. reesei à ausência de fonte de nitrogênio e a sua subseqüente reposição.

Para estudar a resposta transcricional de *T. reesei* à ausência de fonte de nitrogênio e à sua subseqüente reposição, foram retiradas amostras de massa micelial para a extração de RNA antes da troca de meios, após 2 horas de ausência de fonte de nitrogênio, e após 30 minutos, 1 e 2 horas após a adição de $(NH_4)_2SO_4$, como fonte de nitrogênio, como mostrado abaixo (Figura 19). Como descrito anteriormente (*Materiais e Métodos*), as amostras de massa micelial foram filtradas e imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido até que fosse realizada a obtenção de RNA, pela maceração do micélio sob nitrogênio líquido e extração com o reagente TRIzol® (InvitrogenTM Life Technologies).

Para analisar a resposta à ausência de fonte de nitrogênio, seguindo o procedimento habitual (*Materiais e Métodos*), o cDNA correspondente a amostra de micélio em meio completo da pré-cultura foi marcado com o fluoróforo Alexa Fluor® 555 e utilizado como condição de referência para comparação com o cDNA da amostra de 2 horas sem fonte de nitrogênio, marcado com o fluoróforo Alexa Fluor® 647. Para analisar a reposta à reposição da fonte de nitrogênio, o cDNA da amostra de 2 horas de ausência de fonte de nitrogênio foi utilizado como condição de referência (marcado com o fluoróforo Alexa Flúor® 555) para comparação com os cDNAs das amostras de micélio retiradas após 30 e 60 minutos após a adição de (NH₄)₂SO₄, marcados como o fluoróforo Alexa Flúor® 647.



Figura 19: Curva de crescimento da cultura de *T. reesei* submetida à ausência de fonte de nitrogênio para o estudo da resposta transcricional do fungo a esse estresse. São indicados por setas os momentos da adição de $(NH_4)_2SO_4$ à cultura e de filtragem de micélio para a extração de RNA a ser utilizado em hibridizações com *microarrays* de DNA de *T. reesei* (*Materiais e Métodos*).

Após os procedimentos de hibridização das lâminas de *microarray*, extração dos dados de intensidade de fluorescência, normalização dos mesmos por LOWESS e identificação dos genes diferencialmente expressos pelo método HTSelf (Vencio e Koide,

2005), descritos anteriormente (*Materiais e Métodos*), foram obtidos os resultados resumidos na tabela 4.

Visto que existiam duas condições diversas de referência (amostra da pré-cultura em meio completo, para a ausência de fonte de nitrogênio, e essa última, para os pontos de reposição da fonte de nitrogênio), somaram-se os valores das medianas das razões de expressão (M) de cada um dos pontos de reposição de fonte de nitrogênio aos valores de M, correspondentes, do ponto de ausência da fonte de nitrogênio. Assim, todos os valores de M passaram a ser relacionados à amostra de referência do meio completo, independentemente se fossem dos pontos de ausência ou reposição da fonte de nitrogênio.

Tabela 4: Número de genes para cada um dos grupos de expressão após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas para as hibridizações de ausência de fonte de nitrogênio por 2 horas e de reposição da mesma após 30 e 60 minutos da adição de (NH₄)₂SO₄ à cultura.

Experimento / Hibridização	Total	Invariantes	Reprimidos	Induzidos	Modificados
<i>Fonte de Nitrogênio</i> Ausência de fonte de nitrogênio (noN) – 2 h	1.726	895	443	388	831 (48,1%)
$(NH_4)_2SO_4 - 30 min$ $(NH_4)_2SO_4 - 60 min$	1.754 1.738	1.101 1.057	295 305	358 376	653 (37,2%) 681 (39,3%)

Total: número de genes de cada hibridização heterotípica que foi considerado para a análise estatística; Invariantes, genes cujas razões de expressão ficaram compreendidas entre os limites de corte do teste HTSelf; Reprimidos, genes cujas razões de expressão ficaram abaixo do limite inferior de corte do teste HTSelf; Induzidos, genes cujas razões de expressão ficaram acima do limite superior de corte do teste HTSelf; Modificados, soma e porcentagem do número de genes Induzidos e Reprimidos.

Com a incorporação, ao banco de dados, dos valores das medianas das razões de expressão (M) dos genes cuja expressão foi modificada, foram analisados aqueles genes que estavam presentes na ausência de fonte de carbono, e nas duas condições de reposição, e que apresentaram uma variação de duas ou mais vezes, positiva ou negativamente, em suas razões de expressão em pelo menos uma dessas condições. Esse conjunto final somou um total de 549 genes. Considerando esse grupo de 549 genes, foi determinada uma distribuição do número de genes induzidos, e dos reprimidos, em duas, ou mais, vezes para cada uma das três condições de estudo, que é apresentada na figura 20.

Para melhor relacionar os perfis transcricionais desses 549 genes na três condições de estudo (2 horas de ausência de fonte de nitrogênio, 30 e 60 minutos de reposição da mesma, após a adição de $(NH_4)_2SO_4$), como realizado anteriormente, foi arbitrariamente dado o valor 0 para a razão de expressão M para a condição de referência, para a inclusão da condição padrão na análise para a determinação dos grupos de genes com perfil transcricional semelhante. Por meio de análise utilizando o algoritmo SOM (Self-Organizing Maps) do programa GeneCluster v.2.1.7, com os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 150.000 iterações com faixa de difusão igual a 75, faixa de aprendizado de 2 a 0,00005 e faixa de atualização de 5 a 0,0001, foram gerados, num arranjo 5 x 5, 25 grupos de genes / TrEST com perfil de transcrição semelhante.



Figura 20: Distribuição dos genes de *T. reesei* induzidos, e dos reprimidos, para cada condição de estudo da resposta à ausência e à reposição de fonte de nitrogênio. Foram contados os genes cuja razão de expressão (M) foi maior, ou igual, a 1,0 (Induzidos), e aqueles cuja M foi menor, ou igual, a -1,0 (Reprimidos).

Nas páginas a seguir (Figura 21 A, B, C, D e E) são apresentados os 25 grupos de genes com perfis transcricionais, em resposta a ausência e reposição de fonte de nitrogênio, semelhantes por meio de mapas de expressão criados no programa TreeView acompanhados de gráficos ilustrando as médias dos valores de razão de expressão para cada condição e os limites desses valores para cada um dos grupos, além da identificação de cada sonda (clone TrEST ou gene de *T. reesei*).









condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 21B: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de nitrogênio (noN 120 min) e de pulso de sulfato de amônio após tal limitação (N 30 e 60 min). Os 549 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 21C: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de nitrogênio (noN 120 min) e de pulso de sulfato de amônio após tal limitação (N 30 e 60 min). Os 549 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 21D: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de nitrogênio (noN 120 min) e de pulso de sulfato de amônio após tal limitação (N 30 e 60 min). Os 549 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 21E: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de nitrogênio (noN 120 min) e de pulso de sulfato de amônio após tal limitação (N 30 e 60 min). Os 549 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.

Baseada na anotação atualizada (agosto de 2005) dos clones TrEST (*Materiais e Métodos*), foi realizada uma classificação por função celular dos genes cuja transcrição foi induzidas, ou reprimida, em resposta à ausência ou reposição de fonte de nitrogênio. Os 549 genes / TrESTs classificados funcionalmente são apresentados na tabela 10 (*Apêndice*) conjuntamente a sua identificação e aos valores das respectivas medianas da razão de expressão (M).

Para a obtenção de um panorama geral da resposta transcricional de *T. reesei* à ausência de fonte de nitrogênio foram obtidas a distribuição das funções celulares em resposta a esse estresse e à reposição da fonte de nitrogênio. Para essa última condição foram considerados os genes / TrESTs que foram constantemente induzidos ($M \ge 1$ em uma condição e M > 0, na outra), ou reprimidos ($M \le -1$ em uma condição e M < 0 na outra). Os gráficos dos resultados da são apresentados abaixo (Figura 22).

A análise do perfil dos genes induzidos e reprimidos em cada uma das condições de estudo (Figura 20) e dos valores da razão de expressão (M) para os genes (Tabela 10, *Apêndice*) mostra que o resultado da mudança de *T. reesei* do meio completo para o meio mínimo sem fonte de nitrogênio foi a repressão de um grande número de genes. As modificações no padrão transcricional podem, entretanto, refletir a soma de pelo menos dois fatores: a ausência de fonte de nitrogênio e de um outro nutriente, disponível no meio completo. Assim, podemos identificar quais genes realmente sofreram uma alteração em sua expressão como resposta à falta de uma fonte de nitrogênio pela verificação de que essa alteração deveria ser contrabalançada quando ocorreu a reposição da fonte de nitrogênio pela adição de amônio ao meio. Genes cuja expressão foi modificada para certa tendência, indução ou repressão, e cuja expressão seguiu tal tendência na mesma magnitude mesmo uma hora após a adição de amônio serão considerados como responsivos a outros componentes presentes no meio completo ou ao fato desse meio favorecer um maior desenvolvimento do fungo em função da maior quantidade de nutrientes presente.

Como já observado anteriormente há um grande número de genes com função desconhecida cuja expressão foi modificada como resposta a ausência e a reposição da fonte de nitrogênio. Considerando então os demais genes cuja expressão sofreu uma alteração, podem-se distinguir alguns aspectos gerais dessas respostas em termos de suas funções celulares (Tabela 10, *Apêndice*).



Figura 22: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pela ausência de fonte de nitrogênio durante o período de 2 horas, ou pelo pulso de sulfato de amônio, para concentração final de 15,0 mmol/L, realizado após o período de limitação. 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 gene s com alteração. O grupo de função desconhecida inclui os genes / clones TrEST sem similaridade de seqüência no banco de dados público e aqueles cuja similaridade se faz com potenciais ORFs sem função anotadas em genomas seqüenciados.

Na categoria de defesa celular, verifica-se que há vários genes que responderam a outros componentes do meio que não a fonte de nitrogênio. Genes para fenol 2monooxigenase, uma proteína de resistência a aureobasidina A e para o peptídeo RCI de resposta a estresse foram todos constantemente reprimidos pelo crescimento em meio mínimo, indicando que o meio completo, embora mais rico em nutrientes também traz certos compostos que *T. reesei* considera nocivos e que causam certo estresse.

Dentre os que responderam especificamente à ausência de nitrogênio estão os genes para Hsp98 (família Hsp100/Clp) e glioxal oxidase, que sofreram repressão decrescente após a adição de amônio ao meio, e o gene para a proteína antioxidante LSFA, cuja expressão foi reprimida durante a ausência de fonte de nitrogênio, mas chegou a ter leve indução após a reposição da mesma. Pode-se especular que a resposta desses três genes esteja relacionada a uma menor atividade mitocondrial, visto que nessa condição tanto a produção de glioxal quanto o estresse oxidativo proveniente da produção de espécies reativas de oxigênio pela cadeia respiratória são diminuídos.

Com relação a funções relacionadas ao ciclo celular, o gene homólogo ao da proteína de controle de divisão celular CDC48 de *S. cerevisiae* foi induzido pela ausência de nitrogênio, tendo sua expressão retornado ao nível usual após a adição de amônio. Visto que CDC48 também está relacionada à extrusão de proteínas do retículo endoplasmático para degradação citoplasmática (Ye, Meyer *et al.*, 2001), tal indução pode ser vista como parte da repressão da via de secreção e reutilização de proteínas não essenciais como fonte de nitrogênio alternativa. Já o gene do fator CHF2 teve sua expressão reprimida durante a limitação de nitrogênio, condição que só foi ultrapassada uma hora após a adição de amônio. Uma vez que esse fator está associado ao controle de tradução em situações de estresse e ao atraso do ciclo celular na fase G1 (Bieganowski, Shilinski *et al.*, 2004), sua repressão indica que *T. reesei* não entra em estado estacionário mesmo na ausência de fonte de nitrogênio.

Em termos de sinalização celular, a ausência de fonte de nitrogênio reprimiu a expressão de genes relacionados a canais e transportadores, como uma bomba de cálcio do vacúolo, e do gene homólogo ao da proteína histidina quinase M27Mp de *Giberella zea*. Ocorreu a indução da expressão dos genes de uma proteína de transporte e da proteína tirosina fosfatase PPS1 e uma leve indução da proteína serina/treonina quinase SNF1. Uma vez que a sinalização, principalmente a relacionada à repressão catabólica, em fungos é bastante dependente de cálcio e que histidina quinases fazem normalmente parte de sistemas de fosfo-relê (homólogos dos sistemas de dois componentes bacterianos) (Santos e Shiozaki, 2001), a verificação de que genes relacionados a esses processos foram

reprimidos indica que estão relacionados provavelmente à chamada repressão catabólica por nitrogênio. A indução do gene de PPS1 resulta na parada do ciclo celular e no arresto do crescimento (Ernsting e Dixon, 1997), enquanto que a proteína quinase SNF1 é essencial na desrepressão de genes cuja expressão é afetada negativamente pela presença de alta concentração de glicose (Vincent, Townley *et al.*, 2001) – o que pode indicar um relaxamento na repressão por glicose devido à falta de fonte de nitrogênio.

Ainda presentes nessa categoria, genes que tiveram sua expressão afetada de forma constante pela mudança do meio são envolvidos de forma geral na sinalização de um ambiente pobre em nutrientes. Os genes de transporte e controle da via secretória (proteína Rab11) (Dumanchin, Czech *et al.*, 1999) foram reprimidos, enquanto os de uma proteína G da família Rho (Rho1p, envolvida na síntese da parede celular e morfogênese) (Guest, Lin *et al.*, 2004), da proteína serina/treonina fosfatase PP1 (Andrews e Stark, 2000)e do regulador negativo de conjugação e meiose Ran1p foram induzidos, indicando que ocorreu a manutenção da forma vegetativa do fungo.

Já a reposição da fonte de nitrogênio, além de reverter as alterações acima descritas reprimiu a expressão dos genes de uma subunidade alfa de proteína trimérica G e da calnexina, envolvida no controle de qualidade de enovelamento de proteínas do retículo endoplasmático (Parlati, Dominguez *et al.*, 1995).

Na categoria de estrutura celular a maior parte dos genes respondeu não a falta de fonte de nitrogênio, mas à mudança do meio como um todo. Genes de hidrofobinas foram altamente induzidos e proteínas relacionadas à síntese da parede celular tiveram sua expressão reprimida, assim como o gene de actina. Tudo indica que a menor quantidade de nutrientes disponíveis no meio mínimo, que levou a um menor desenvolvimento de *T. reesei*, assim como suas diferentes características fisicoquímicas sejam as maiores responsáveis por esse efeito sobre a expressão desses genes.

No campo do metabolismo, com a ausência de fonte de nitrogênio observou-se de forma geral uma repressão de todas as funções anabólicas (aminoácidos, lipídeos e glicogênio) e mesmo das vias energéticas relacionadas à mitocôndria (ciclo de Krebs – citrato sintase, malato desidrogenase, diidrolipoamida succiniltransferase, e da cadeia de transporte de elétrons – NADH:ubiquinona oxidoredutase subunidades 5 e 6), enquanto foram induzidos os genes relacionados à degradação de reservas lipídicas (enoil-coA

hidratase, 3-hidroxybutiril-coA desidrogenase e fosfolipase D) e os do ciclo do glioxilato (isocitrato liase e malato sintase) para a reposição de intermediários do ciclo de Krebs, visto que a repressão da succinato desidrogenase observada em limitação de fonte de nitrogênio interrompe o ciclo e causa uma carência de oxaloacetato. O fato de que dentre os genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, os genes para aspartato aminotransferase, glutamina sintetase e 4-aminobutirato (GABA) aminotransferase não sofreram repressão (o último foi induzido), indicando que possivelmente esses aminoácidos, provenientes da degradação de proteínas não essenciais, podem ter sido utilizados como fonte alternativa de nitrogênio.

Também foi induzida especificamente pela ausência da fonte de nitrogênio, a expressão de genes relacionados à reutilização de pirimidinas (uricase e alantoinase), enquanto a expressão do gene que codifica argininosuccinato sintase, necessária para a eliminação de nitrogênio pelo ciclo da uréia, foi reprimida. A expressão de alguns genes da glicólise também sofreu repressão que se mostrou resultado da diferença de meio e não especificamente da falta da fonte de nitrogênio.

Genes que codificam transportadores de peptídeos e de aminoácidos tiveram sua expressão induzida ou mantiveram constante seu nível de expressão, o que também foi observado para um gene que codifica um transportador de hexose (MstA), enquanto outros transportadores da família MFS (*Major Facilitator System*) foram reprimidos. È igualmente relevante a repressão da expressão de genes que codificam um transportador mitocondrial de fosfato e uma translocase de ADP/ATP, o que comprova uma diminuição da atividade mitocondrial.

A adição de amônio ao meio, repondo a fonte de nitrogênio, teve um efeito marcante sobre a expressão de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos e às vias energéticas mitocondriais. Embora a expressão dos genes dessas funções tenha se mantido inferior se comparada àquela presente no meio completo – evidenciando uma taxa de metabolismo mais comedida considerando a menor disponibilidade de nutrientes, a adição de uma fonte de nitrogênio fez com que a síntese de aminoácidos fosse automaticamente retomada e que o metabolismo energético se re-normalizasse. O ciclo do glioxilato manteve-se induzido durante a primeira meia hora após a adição de amônio, provavelmente

até que a atividade do ciclo de Krebs como um todo se normalizasse, enquanto a expressão dos genes relacionados à degradação de lipídeos e de glicogênio foi rapidamente reprimida.

Os efeitos sobre as vias de reutilização de nitrogênio também foram definidos. A indução de genes da via de degradação de pirimidinas foi abortada, assim como a repressão da expressão dos genes relacionados ao ciclo da uréia.

Em termos de transporte, os genes de transportadores específicos para peptídeos ou aminoácidos tiveram sua expressão reprimida pela adição de amônio, indicando uma repressão catabólica. Já o transportador de hexose teve sua expressão ainda mais induzida, indicando que além da indução derivada da mudança de meio e, portanto, da retirada de outras fontes de carbono que não glicose, a reposição da fonte de nitrogênio levou a uma taxa metabólica maior, necessitando por sua vez de maior influxo de glicose. As translocases de ADP/ATP e o transportador mitocondrial de fosfato deixaram de ser reprimidos indicando uma normalização da expressão de genes relacionados à atividade mitocondrial.

A ausência de fonte de nitrogênio resultou num efeito drástico sobre a transcrição dos genes envolvidos com o metabolismo de proteínas. A expressão daqueles genes que codificam enzimas relacionadas a processos de degradação protéica, como genes para proteases e peptidases, genes relacionados com ubiquitinação de proteínas e os de subunidades do proteasomo, foi induzida. Em contrapartida, os genes que codificam proteínas ribossomais tiveram suas expressões altamente reprimidas, indicando uma diminuição substancial na síntese protéica, enquanto houve a reciclagem de aminoácidos através da degradação de proteínas não-essenciais para substituir a fonte de nitrogênio faltante. Com exceção do fator de iniciação de tradução SUI1 (eIF1 – *S. cerevisiae*) que sofreu uma leve indução, a expressão dos fatores de tradução também foi reprimida.

Uma vez reposta a fonte de nitrogênio, a expressão da maioria dos genes envolvidos com o metabolismo de proteínas retornou ao mesmo nível observado antes da mudança de meio. A expressão de alguns, entretanto, teve um comportamento mais diferenciado. Genes similares a uma manosiltranferase (*A. fumigatus*), a uma protease aspártica lisossomal (*A. aegypti*) e a uma proteína contendo repetições de beta-transducina (*X. laevis*), embora tenham tido sua expressão muito pouco afetada durante a ausência de fonte de nitrogênio, foram reprimidos na primeira meia hora após a adição de amônio. O mesmo ocorreu com

os genes ortólogos a uma arginil-tRNA sintetase (*S. cerevisiae*) e a uma proteína ribossomal mitocondrial (*N. crassa*). Já a expressão de alguns genes relacionados à degradação protéica, como os similares a uma protease endocelular da família das subtilisinas (PR1H – *M. anisopliae*) (Bagga, Hu *et al.*, 2004) e a uma serina protease (PSP2 – *P. brassicae*) (Keniry, Li *et al.*, 2002), embora tenha diminuído com a reposição da fonte de nitrogênio, ainda permaneceu mais elevada do que na condição de meio completo, apontando uma manutenção da reciclagem protéica maior no meio mínimo, em função da menor disponibilidade nutricional. Tal fato é corroborado também pela indução após a reposição da fonte de nitrogênio da expressão do gene de uma proteína ribossomal fusionada a ubiquitina.

Genes similares a uma subunidade do coatômero (*A. fumigatus*) e a uma aminopeptidase (*A. fumigatus*) tiveram sua expressão constantemente reprimida, assim como de algumas amino-acil-tRNA sintetases. Visto que o coatômero é uma estrutura celular envolvida no processo de endocitose de substratos e já que o meio mínimo contém apenas sais como fontes de macronutrientes, a repressão de genes envolvidos com tanto a obtenção, a partir do meio, quanto a degradação de metabólicos mais complexos é esperada. A diminuição da expressão das aminoacil-tRNA sintetases também pode ser atribuída à um menor desenvolvimento do fungo no meio mínimo.

A expressão de diversos fatores de transcrição foi afetada pela ausência de fonte de nitrogênio, de forma bastante variada. Os genes ortólogos aos fatores ATF2 (*N. crassa*) e ATF21 (*S. pombe*) (Ohmiya, Kato *et al.*, 1999) e do transativador AMYR (*N. crassa*) (Kato, 2005) tiveram sua expressão induzida pela ausência da fonte de nitrogênio, sendo que tal indução só desapareceu após uma hora da adição de amônio ao meio. Pelo fato dos dois primeiros serem da família ATF/CREB e o terceiro estar envolvido na regulação positiva da transcrição de genes envolvidos na degradação de amido, uma fonte alternativa de carbono, tais fatores estão sobre o controle da resposta catabólica de carbono mediada por cAMP. Assim, verifica-se que mesmo havendo glicose abundante no meio, a ausência de fonte de nitrogênio, com a conseqüente diminuição da taxa metabólica e atividade mitocondrial, faz com que a repressão catabólica mediada por cAMP seja relaxada. A demora verificada para o fim da indução desses transativadores pode estar relacionada ao

tempo necessário para que as funções metabólicas das células se normalizassem frente à extensa limitação da fonte de nitrogênio.

Foi induzida a expressão de um fator de transcrição não identificado (*H. jecorina* – *T. reesei*), entretanto tal comportamento se manteve constante mesmo após a adição de amônio, o que indica que tal indução resultou a ausência de algum outro componente presente no meio completo. Alguns genes de fatores de transcrição também tiveram sua expressão reprimida: um segundo fator de transcrição não identificado (*H. jecorina* – *T. reesei*) e uma proteína de controle relacionada à repressão catabólica por enxofre. Enquanto a expressão do primeiro gene foi modificada especificamente pela ausência de nitrogênio, a do segundo se manteve reprimida durante toda a fase da cultura em meio mínimo. Considerando que nessa condição a única fonte de enxofre presente é sulfato, a expressão de genes necessários para sua fixação através da síntese de aminoácidos sulfurados se torna necessária e é conseguida pela suspensão da repressão catabólica normalmente existente quando da presença destes.

Ainda na categoria de transcrição, a expressão de duas RNA helicases e uma endonuclease também foram afetadas pela ausência de fonte de nitrogênio. O gene similar ao de uma endonuclease codificada em um íntron do rDNA (*O. sativa*) teve sua expressão induzida pela ausência de fonte de nitrogênio, a mesma retornando ao nível usual após uma hora da adição de amônio. A mudança de meio resultou numa repressão contínua da expressão do gene ortólogo ao da RNA helicase DBP3 (*S. cerevisiae*), envolvida no processamento de rRNA (Weaver, Sun *et al.*, 1997), que pode ser atribuída a um menor desenvolvimento do fungo em meio mais nutricionalmente mais pobre.

5.4 Efeitos da ausência de fonte de carbono, e sua reposição, sobre T. reesei.

Para os experimentos de descrição da resposta transcricional de *T. reesei* à ausência de fonte de carbono, seguida de sua reposição, foi utilizado meio mínimo (*Materiais e Métodos*) sem a adição de qualquer fonte de carbono. Com o intuito de limitar a resposta transcricional ao efeito da ausência de uma fonte específica de carbono, no caso glicose, foi realizada após a pré-cultura em meio completo, uma etapa intermediária de crescimento de *T. reesei* em meio mínimo contendo glicose a 1,0%. Assim, a substituição desse meio com

glicose por meio mínimo sem fonte de carbono criou uma resposta específica à remoção de glicose. Similarmente, o pulso de glicose, para a reposição da fonte de carbono, também cria uma resposta específica a esse açúcar que pode ser diferente da observada para outras fontes de carbono.

5.4.1 Efeito da ausência de fonte de carbono sobre o crescimento de T. reesei.

Duas pré-culturas paralelas de *T. reesei*, em meio completo com glicose a 2% (111 mmol.L⁻¹) como fonte de carbono, foram incubadas durante 16 horas sob as condições normais de crescimento (*Materiais e Métodos*). Após esse período, foram realizadas a lavagem e a substituição do meio por meio mínimo com glicose a 1% (55 mmol.L⁻¹) (*Materiais e Métodos*), seguidas de nova incubação sob as condições normais de crescimento por 2 horas. Nova lavagem e substituição de meio foram realizadas, agora ressuspendendo uma das culturas em meio mínimo contendo 1% de glicose e a outra em meio mínimo sem fonte de carbono. As culturas voltaram a ser incubadas nas condições normais de crescimento por então 3,5 horas, após o que foi adicionada, a ambas as culturas, glicose para concentração final de 2% e as culturas permaneceram incubadas por mais 2 horas. Alíquotas para determinação de massa seca e da concentração de glicose no meio foram retiradas da cultura para o acompanhamento do deito da limitação de fonte de carbono sobre o crescimento de *T. reesei*. As curvas de crescimento celular, em função da concentração celular (Y) e consumo de glicose são apresentadas abaixo (Figura 23 A, B e C).

Como foi demonstrado pelas curvas de crescimento (Figura 23 A e B), a ausência de fonte de carbono tem um efeito drástico sobre o crescimento de *T. reesei*, visto que a cultura entrou em fase estacionária logo após o início dessa limitação nutricional. Isso se deve certamente à necessidade do microorganismo gastar suas reservas energéticas para a manutenção de um estado quiescente a espera de um meio em que a fonte de carbono seja abundante.

Ao contrário do que ocorre com a de fonte de nitrogênio, que pode ser substituída parcialmente pela degradação de proteínas não essenciais durante certo período, a degradação de fontes alternativas, e de reserva, de carbono deve manter tanto a síntese de componentes essenciais como a produção de energia, o que invariavelmente causa a perda de carbono na forma de CO_2 , devido à respiração. Assim, *T. reesei* cessa seu crescimento para direcionar o gasto das fontes de carbono que ainda lhe restam para a manutenção da viabilidade celular.



Figura 23: Curvas de crescimento e consumo de glicose para culturas de *T. reesei* em meio mínimo contendo, ou não, fonte de carbono na forma de glicose. A. Gráfico comparativo das curvas de crescimento de *T. reesei* em meio mínimo com e sem fonte de carbono. Curvas de crescimento e consumo de glicose de *T. reesei* em meio mínimo sem fonte de carbono (B) e com glicose a 1% (C). É indicado o momento em que foi realizado o pulso de glicose para concentração final de 2% em ambas as culturas. Y, concentração celular determinada por massa seca (*Materiais e Métodos*)

Ao contrário do que ocorre com a de fonte de nitrogênio, que pode ser substituída parcialmente pela degradação de proteínas não essenciais durante certo período, a degradação de fontes alternativas, e de reserva, de carbono deve manter tanto a síntese de componentes essenciais como a produção de energia, o que invariavelmente causa a perda de carbono na forma de CO₂, devido à respiração. Assim, *T. reesei* cessa seu crescimento para direcionar o gasto das fontes de carbono que ainda lhe restam para a manutenção da viabilidade celular.

Corroborando tal linha de pensamento segue o fato de que imediatamente após a adição de glicose o crescimento é rapidamente reiniciado com velocidade específica de crescimento (μ) superior ($\mu = 0,229 \text{ h}^{-1}$) inclusive à da cultura que permaneceu em meio com fonte de carbono (inicialmente glicose 1% - $\mu = 0,114 \text{ h}^{-1}$) (Figura 24), o que indica uma pronta retomada dos processos anabólicos suspensos durante a fase estacionária.



Figura 24: Gráfico de determinação da velocidade específica de crescimento na fase exponencial de culturas de *T. reesei* em meio mínimo contendo 2% glicose após, ou não, a ausência de fonte de carbono. Os valores de logaritmo natural da concentração celular (Y) das alíquotas retiradas na fase exponencial de crescimento foram plotados em função do tempo de cultura para a determinação da velocidade específica de crescimento (**m**) por regressão linear. Para a determinação de **m** foram utilizados os dados das 3 alíquotas compreendidas no intervalo de 4,0 a 5,5 horas de cultura. São apresentados os dados das respectivas regressões lineares: A, coeficiente linear, B, coeficiente angular (**m**), R, índice de correlação de Pearson e P, índice de confiança.

5.4.2 Resposta transcricional de T. reesei à ausência da fonte de carbono e à sua subseqüente reposição.

Para avaliar a resposta transcricional de *T. reesei* à ausência de fonte de carbono e à sua subseqüente reposição foram obtidas amostras de micélio para a extração de RNA das culturas em meio mínimo com e sem fonte de carbono, antes e após a adição de glicose a ambas para concentração de 110 mmol.L⁻¹ (Figura 25). Como descrito anteriormente (*Materiais e Métodos*), as amostras de massa micelial foram filtradas e imediatamente congeladas sob nitrogênio líquido até que fosse realizada a obtenção de RNA, pela maceração do micélio sob nitrogênio líquido e extração com o reagente TRIzol® (InvitrogenTM Life Technologies).



Figura 25: Curva de crescimento da cultura de *T. reesei* submetida, ou não, à ausência de fonte de carbono para o estudo da resposta transcricional do fungo a esse estresse. São indicados por setas os momentos da adição de glicose às culturas e de filtragem de micélio para a extração de RNA a ser utilizado em hibridizações com *microarrays* de DNA de *T. reesei* (*Materiais e Métodos*).

Para analisar a resposta à ausência de fonte de carbono, seguindo o procedimento habitual (*Materiais e Métodos*), utilizou-se para condição de referência o cDNA correspondente a amostra de micélio incubada por 2 horas em meio mínimo contendo glicose 1%, que foi marcado com o fluoróforo Alexa Fluor® 555. A comparação foi realizada então com o mRNA da amostra de micélio incubada pelo mesmo período em

meio mínimo sem fonte de carbono, marcado com o fluoróforo Alexa Fluor® 647. Para analisar a reposta à reposição da fonte de carbono, o cDNA da amostra de 2 horas de ausência de fonte de carbono foi utilizado como condição de referência (marcado com o fluoróforo Alexa Flúor® 555) para comparação com os cDNAs das amostras de micélio retiradas após 30 e 90 minutos após a adição de glicose às culturas, marcados como o fluoróforo Alexa Flúor® 647.

Após os procedimentos de hibridização das lâminas de *microarray*, extração dos dados de intensidade de fluorescência, normalização dos mesmos por LOWESS e identificação dos genes diferencialmente expressos pelo método HTSelf (Vencio e Koide, 2005), descritos anteriormente (*Materiais e Métodos*), foram obtidos os resultados resumidos na tabela 5.

Tabela 5: Número de genes para cada um dos grupos de expressão após a análise estatística dos dados de razão de fluorescência das réplicas das sondas para cada uma das hibridizações heterotípicas realizadas para a análise da resposta transcricional à ausência e reposição de fonte de carbono.

Experimento / Hibridização	Total	Invariantes	Reprimidos	Induzidos	Modificados
<i>Fonte de Carbono</i> Ausência de fonte de carbono – 2 h	1.822	1.685	11	126	137 (7.5%)
Glicose 2% - 30 min Glicose 2% - 90 min	1.731 1.642	1.192 1.202	262 246	277 194	539 (31.1%) 440 (26,8%)

Total: número de genes de cada hibridização heterotípica que foi considerado para a análise estatística; Invariantes, genes cujas razões de expressão ficaram compreendidas entre os limites de corte do teste HTSelf; Reprimidos, genes cujas razões de expressão ficaram abaixo do limite inferior de corte do teste HTSelf; Induzidos, genes cujas razões de expressão ficaram acima do limite superior de corte do teste HTSelf; Modificados, soma e porcentagem do número de genes Induzidos e Reprimidos.

De forma semelhante a utilizada na análise da resposta transcricional de *T. reesei* à ausência e reposição de fonte de nitrogênio, os valores das medianas das razões de expressão (M) de cada um dos pontos de reposição de fonte de carbono também foram ajustados para refletir uma comparação com a condição de referência da análise de ausência de fonte de carbono, ou seja, foram somados aos valores de M, correspondentes, do ponto de ausência da fonte de carbono. Assim, todos os valores de M passaram a se relacionar à

amostra de referência de meio mínimo com glicose a 1%, independentemente se fossem dos pontos de ausência ou reposição da fonte de carbono.

Os valores das medianas das razões de expressão (M) dos genes cuja expressão foi modificada foram então incorporados ao banco de dados e, subseqüentemente, foram analisados aqueles presentes na ausência de fonte de carbono e nas duas condições de reposição e que apresentaram uma variação de duas ou mais vezes, positiva ou negativamente, em suas razões de expressão em pelo menos uma dessas condições. Esse conjunto final somou um total de 310 genes.

Considerando esse grupo de 310 genes, foi determinada uma distribuição do número de genes induzidos, e dos reprimidos, em duas, ou mais, vezes para cada uma das três condições de estudo, que é apresentada na figura 26.



Figura 26: Distribuição dos genes de *T. reesei* induzidos, e dos reprimidos, para cada condição de estudo da resposta à ausência e à reposição de fonte de carbono. Foram contados os genes cuja razão de expressão (M) foi maior, ou igual, a 1,0 (Induzidos), e aqueles cuja M foi menor, ou igual, a -1,0 (Reprimidos).

Para melhor relacionar os perfis transcricionais desses 310 genes na três condições de estudo (2 horas de ausência de fonte de carbono, 30 e 90 minutos de reposição da mesma, após a adição de glicose para concentração de 110 mmol. L^{-1}), como já mencionado, foi arbitrariamente estipulado o valor 0 para a razão de expressão M para a condição de referência, para a inclusão da mesma na análise para a determinação dos grupos de genes com perfil transcricional semelhante.

Por meio de análise utilizando o algoritmo SOM (Self-Organizing Maps) do programa GeneCluster v.2.1.7, com os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 100.000 iterações com faixa de difusão igual a 50, faixa de aprendizado de 2 a 0,00005 e faixa de atualização de 5 a 0,0005, foram gerados, num arranjo 5 x 4, 20 grupos de genes / TrEST com perfil de transcrição semelhante.

Nas páginas a seguir (Figura 27 A, B e C) são apresentados os 20 grupos de genes com perfis transcricionais, em resposta a ausência e reposição da fonte de carbono, semelhantes por meio de mapas de expressão criados no programa TreeView acompanhados de gráficos ilustrando as médias dos valores de razão de expressão para cada condição e os limites desses valores para cada um dos grupos, além da identificação de cada sonda (clone TrEST ou gene de *T. reesei*). Baseada na anotação atualizada (agosto de 2005) dos clones TrEST (*Materiais e Métodos*), foi realizada uma classificação por função celular dos genes cuja transcrição foi induzidas, ou reprimida, em resposta à ausência ou reposição de fonte de carbono. Os 310 genes / TrESTs classificados funcionalmente são apresentados na tabela 11 (*Apêndice*) conjuntamente a sua identificação e aos valores das respectivas medianas da razão de expressão (M).

Para a obtenção de um panorama geral da resposta transcricional de *T. reesei* à ausência de fonte de carbono foram obtidas a distribuição das funções celulares em resposta a esse estresse e à reposição desse macronutriente. Para essa última condição foram considerados os genes / TrESTs que foram constantemente induzidos ($M \ge 1$ em uma condição e M > 0, na outra), ou reprimidos ($M \le -1$ em uma condição e M < 0 na outra). Os gráficos dos resultados da são apresentados abaixo (Figura 28). A despeito do grande número de genes com função desconhecida cuja expressão foi modificada como resposta a ausência e reposição da fonte de carbono e que a partir de então passam a ter uma característica funcional determinada, podemos distinguir claramente alguns aspectos gerais dessa resposta em termos de funções celulares dos genes induzidos ou reprimidos (Tabela 11, *Apêndice*).



Figura 27A: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de carbono (noC 120 min) e de pulso de glicose após tal limitação(C 30 e 90 min). Os 310 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 27B: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de carbono (noC 120 min) e de pulso de glicose após tal limitação(C 30 e 90 min). Os 310 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.


Figura 27C: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função da ausência de fonte de carbono (noC 120 min) e de pulso de glicose após tal limitação(C 30 e 90 min). Os 310 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos uma das condições estudadas foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7 de acordo com seus padrões de expressão. Os grupos de transcritos com padrão de expressão similar são apresentados em mapa obtido no programa visualizador TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão, assim como os gráficos de padrão de expressão, contendo o número do grupo (c#) e o respectivo número de transcritos presentes.



Figura 28: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pela ausência de fonte de carbono durante o período de 2 horas, ou pelo pulso de glicose na cultura, para uma concentração final de aproximadamente 110 mmol.L⁻¹, realizado após o período de limitação. Não houve genes cuja expressão foi reprimida de forma significante (duas ou mais vezes) pela ausência de fonte de carbono por 2 horas. 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. O grupo de função desconhecida inclui os genes / clones TrEST sem similaridade de seqüência no banco de dados público e aqueles cuja similaridade se faz com potenciais ORFs sem função anotadas em genomas seqüenciados.

A ausência de fonte de carbono induz um estado de quiescência em fungos no qual cessa a proliferação e as reservas de carbono passam a ser utilizadas moderadamente e para a manutenção da viabilidade celular. Nessa condição há normalmente uma diminuição da expressão de genes relacionados aos processos anabólicos e são induzidos genes associados à manutenção das células (Thomsson, Gustafsson *et al.*, 2005).

Entretanto, embora durante as duas horas em que *T. reesei* foi submetido à ausência de fonte de carbono o crescimento celular tenha cessado, como discutido anteriormente, não foi observada a repressão da transcrição de genes dos processos anabólicos, que seria esperada caso o fungo tivesse entrado em estado de quiescência. Esse dado indica que o período de duas horas de limitação de fonte de carbono, ao contrário do que ocorre para a fonte de nitrogênio, não é suficiente para provocar um estresse nutricional de grandes proporções ao fungo.

Dentro do pequeno grupo de genes que foi induzido pela condição de ausência de fonte de carbono e cuja maioria é composta de genes sem função conhecida, destacam-se do ponto de vista metabólico os genes de fosfoenolpiruvato carboxiquinase, isocitrato liase, 3-hidroxibutiril-CoA desidrogenase e duas aldeídos desidrogenases. Considerando a função dessas enzimas dentro do metabolismo central, fica evidente que *T. reesei* estava utilizando reservas lipídicas como fonte de carbono para a manutenção de seus processos celulares.

Em contraste com o observado para a condição de ausência de fonte de carbono, a modificação do padrão transcricional de *T. reesei* em resposta à reposição da fonte de carbono, com a adição de glicose para uma concentração repressora de aproximadamente 110 mmol.L⁻¹ (2%), foi bastante significativa, distinguindo-se entre uma fase inicial de transição, identificado pelo padrão de expressão após 30 minutos da adição, e o estado de crescimento exponencial normal verificado pelo padrão de expressão após 90 minutos.

A análise do padrão de expressão gênica de *T. reesei* após 30 minutos da reposição da fonte de carbono sugere uma provável disparada metabólica para a obtenção de energia e potencial redutor sintético na forma de NADPH, evidenciada pela forte indução da transcrição dos genes da glicólise, TCA e da via das pentoses-fosfato que não é observada no padrão transcricional do fungo após 90 minutos de reposição de fonte de carbono. Considerando outros aspectos metabólicos, a expressão de genes relacionados ao metabolismo de aminoácidos, cofatores e nucleotídeos foi em geral induzida pela reposição da fonte de carbono enquanto que a expressão de genes relacionados à outras fontes de carbono que não glicose parecem ter sentido o efeito da repressão catabólica, dentre os quais os homólogos de um precursor da glucoamilase I, uma endoxilanase, uma xilitol desidrogenase e uma xilulose redutase. Genes homólogos a vários transportadores também tiveram uma aumento em sua expressão de forma pontual após os 30 minutos de reposição.

É interessante observar que proteínas relacionadas à destoxificação de espécies reativas de oxigênio (ROS), como a superóxido dismutase mitocondrial e o homólogo da proteína antioxidante LsfA de *A. fumigatus*, tiveram sua expressão gênica igualmente induzida, assim como a cochaperona Hps90 e a proteína de choque térmico Hsp98, da família das Hsp100/Clp. Após os 90 minutos de reposição da fonte de carbono, a expressão dos genes dessas proteínas relacionadas à defesa celular ou caminhava para os mesmos níveis prévios à adição da glicose ou se encontrava mais baixa do que tais níveis.

A expressão de genes relacionados à divisão celular, tanto de fatores do ciclo celular como a histona H4, foi igualmente induzida aos 30 minutos de reposição nutricional, mantendo-se acima da expressão de referência mesmo após 90 minutos. Em termos de estrutura celular, foi observado o mesmo pico de indução de expressão de genes da parede celular, como as hidrofobinas, e do citoesqueleto (actina) após 30 minutos do fim da limitação de fonte de carbono. Em conjunto esses dados comprovam o reinício do crescimento do fungo, podendo estar o pico de indução em 30 minutos relacionado à maior velocidade específica de crescimento observada para a cultura que passou pela limitação de fonte de carbono, com relação à cultura de referência.

Em termos de síntese e degradação protéica, é importante notar que a vasta maioria dos genes que codificam proteínas ribossomais não sofreu modificação relevante em todo o curso desse estresse, desde a limitação até a reposição da fonte de carbono. Alguns genes envolvidos na degradação protéica sofreram indução após os 30 minutos da adição de glicose. Considerando a síntese e processamento de RNA, a reposição da fonte de carbono reprimiu de forma passageira a expressão de uma endonuclease, de uma ribonucleoproteína nucleolar e de um fator de transcrição sem especificidade conhecida. O gene de um outro fator transcricional sem especificidade sofreu indução após a adição de glicose, podendo estar relacionado então ao controle da expressão de genes que respondam positiva, ou negativamente, à presença de glicose no meio. Por fim o gene da proteína de repressão por metabólitos sulfurados teve sua expressão bastante reprimida após 90 minutos da reposição de glicose, indicando a necessidade da transcrição dos genes envolvidos com metabolismo dos aminoácidos sulfurados devido ao reinício do crescimento do fungo.

5.5 Comparação entre as respostas transcricionais de *T. reesei* a diferentes estresses ambientais.

Como mencionado na *Introdução*, uma resposta geral a estresses é conservada evolutivamente e responsável pelo fenômeno de proteção cruzada entre estresses, que podem, ou não, ser relacionados. Na tentativa de identificar genes que pudessem participar dessa resposta comum a diferentes estresses em *T. reesei*, foi realizada uma busca para identificar os genes cuja expressão foi alterada em resposta ao choque térmico a 40°C e também ao tratamento com cádmio (II) a 250 μ mol.L⁻¹, que resultou num conjunto de 61 genes.

Esses 61 genes foram então agrupados, com relação aos seus perfis de transcrição em resposta a ambos os estresses, por meio de análise utilizando o algoritmo SOM (Self-Organizing Maps) do programa GeneCluster v.2.1.7, com os parâmetros de inicialização por vetores aleatórios, busca de vizinhança por bolhas, 100.000 iterações com faixa de difusão igual a 50, faixa de aprendizado de 1 a 0,00005 e faixa de atualização de 5 a 0,0005, gerando, num arranjo 3 x 6, 18 grupos de genes / TrEST com perfil de transcrição semelhante.

Na página a seguir (Figura 29) são apresentados os 18 grupos de genes com perfis transcricionais semelhantes, que responderam tanto ao choque térmico quanto à adição de cádmio (II), por meio de mapas de expressão criados no programa TreeView (Figura 29 A) acompanhados dos gráficos ilustrando as médias dos valores de razão de expressão para cada condição e os limites desses valores para cada um dos grupos (Figura 29 B), além da identificação de cada sonda (clone TrEST ou gene de *T. reesei*).

Considerando os genes que tiveram padrão de expressão semelhante em resposta ao choque térmico a 40°C e à adição de cádmio (II) na concentração de 250 μ mol.L⁻¹, ou seja, sofreram indução, ou repressão da expressão gênica, em ambas as condições, foram identificados 28 genes que foram induzidos, e 12 genes que foram reprimidos. Tais genes são os melhores candidatos a participarem da resposta comum a estresses ambientais de *T. reesei*. A relação desses genes de acordo com sua função celular é apresentada na tabela 6. e a distribuição das funções celulares pelo padrão de transcrição, na figura 30.





Figura 29: Padrões de expressão de genes / clones TrEST de *T. reesei* em função do tempo de permanência do fungo em meio contendo 250 **m**mol/L de cádmio (II) e do tempo de choque térmico a 40°C.

A: Os 61 transcritos cuja expressão foi induzida ou reprimida em 2 vezes, ou mais, em pelo menos um dos pontos de tempo estudados, foram agrupados através do algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. Os grupos são apresentados através de figura obtida pelo programa visualizador de dados TreeView. O número do grupo de padrão de expressão e a identificação do clone / gene são apresentados à direita do mapa de expressão. B: Gráficos de padrão de expressão dos grupos de transcritos identificados pelo algoritmo SOM do pacote de análise do programa GeneCluster 2.1.7. São apresentados o número do grupo (c#) e o número de transcritos pertencente a cada grupo. A razão de expressão do grupo é apresentada pela média (linha azul) e os limites do grupo (linhas vermelhas).

B

Tabela 6: Distribuição por função celular dos genes cuja expressão foi afetada pelo choque térmico a 40°C e pela adição de cádmio (II) para 250 **m**nol.L⁻¹. São apresentadas a função e sub-função celulares, a identificação do gene / clone TrEST e sua descrição e o grupo de padrão de expressão ao qual pertence, de acordo com o agrupamento apresentado na figura 29. Os genes cuja expressão teve mesmo comportamento em resposta ao choque térmico e à adição de cádmio (II) estão destacados em cores: os induzidos, em vermelho, e os reprimidos em verde.

Função Celular	Identificação	o & Descrição	Grupo
Dafaca Calular			
Resposta a estresses	TrFST-43340	30 kDa heat shock protein (P19752) [N. crassa]	1
Resposit a estresses	TrEST-A0004	Heat shock protein Hsn98 (P31540) [N. crassa]	2
	TrEST-A0074	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	2
	TrEST-A2012	Probable DnaI-like heat-shock protein (FAK98400) [C albicans]	
	TrEST-A2428	Molecular chaperone Hsp90 (EAL 85888) [A fumigatus]	3
	TrEST-A0191	Stress response Rci pentide (FAI 92348) [A fumigatus]	5
Sinlaização Celular	TILST TROTYT	Sitess response for populae (ErrE) 25 (6) [r. funigutus]	5
Efetores/moduladores	TrEST-A1813	Related to Pall protein (O9P6T5) [N_crassa]	4
Modificação protéica	TrEST-A1058	Calnexin (EAL89509) [A. fumigatus]	9
Estrutura Celular			
Parede celular	TrEST-A3142	Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase NagA (EAL87759) [A. fumigatus]	3
<u>Metabolismo</u>			
Aminoácidos	TrEST-A2908	Glycine cleavage system T protein (EAL90405) [A. fumigatus]	8
	TrEST-A0758	Probable glycine decarboxylase P subunit (CAE76410) [N. crassa]	14
Energia/ciclo TCA	TrND4	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 4 (AAL74179) [T. reesei]	12
2	TrND5	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 5 (AAL74164) [T. reesei]	12
Lipídeos	TrEST-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha (P15368) [P. griseofulvum]	14
Açúcares/glicólise	TrEST-A2258	Endochitinase class V precursor (AAL84699) [H. virens]	11
Transporte	TrEST-A1842	ADP,ATP carrier protein (P02723) [N. crassa]	14
-	TrEST-A0901	Metalloreductase (EAL85037) [A. fumigatus]	17

Função Celular	Identificação & Descrição			
Síntese Protéica				
Degradação protéica	TrEST-A4209	26S proteasome regulatory subunit-like protein (AAW69328) [M. grisea]	4	
0,51	TrEST-A1821	Autophagy-related ubiquitin-like modifier Atg-8 (Q8WZY7) [N. crassa]	10	
	TrEST-A0595	Subtilisin-like serine protease PR1H (CAC95047) [M. anisopliae]	15	
	TrEST-B07H02	Serine protease 2 (CAC85639) [P. brassicae]	15	
Modificação pós- traducional/endereçamento	TrEST-A0636	Polyubiquitin 5 (UQBY) [S. cerevisiae]	6	
2	TrEST-A3488	Putative protein-vacuolar targeting-related protein (AAW40887) [C. neoformans]	8	
Proteínas ribossomais	TrEST-B15D12	Ribosomal protein L27 (EAL88345) [A. fumigatus]	3	
	TrEST-B06A02	Cytosolic small ribosomal subunit S15 (EAL86942) [A. fumigatus]	9	
<u>Síntese de RNA</u>				
Fatores transcricionais	TrEST-A3675	Multiprotein bridging factor (Q53IP3) [G. fujikuroi]	9	
	TrEST-A3454	Transcription factor (CAC88374) [H. jecorina]	10	
Não classificadas				
Outros genes	TrTRS1	Trichoderma reesei DNA fragment trs1 (Y14562) [T. reesei]	12	
-	TrEST-B06D08	Aminotransferase class V (EAL90276) [A. fumigatus]	14	
Desconhecida				
Relacionados a outras ORFs putativas	TrEST-B12D05	Hypothetical protein FG01866.1 (EAA67401) [G. zeae]	3	
	TrEST-A2618	Hypothetical protein FG01267.1 (EAA70576) [G. zeae]	5	
	TrEST-A1999	Hypothetical protein FG02234.1 (EAA69401) [G. zeae]	6	
	TrEST-A3946	Hypothetical protein FG10202.1 (EAA70045) [G. zeae]	6	
	TrEST-A3747	Hypothetical protein FG07160.1 (EAA76619) [G. zeae]	7	
	TrEST-A2606	Hypothetical protein MG07328.4 (EAA56973) [M. grisea]	7	
	TrEST-A3430	Hypothetical protein FG02859.1 (EAA72359) [G. zeae]	9	
	TrEST-A2812	Hypothetical protein FG01555.1 (EAA68510) [G. zeae]	10	
	TrEST-B14G08	Hypothetical protein FG06563.1 (EAA78348) [G. zeae]	14	

Função Celular	Identificação	o & Descrição	Grupo
Desconhecida			
Relacionados a outras ORFs putativas	TrEST-A0150	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	16
r	TrEST-A3427	Hypothetical protein FG09205.1 (EAA77045) [G. zeae]	16
	TrEST-A3863	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	16
	TrEST-A0358	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	17
	TrEST-A2651	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	17
	TrEST-A3914	Hypothetical protein FG02131.1 (EAA69762) [G. zeae]	17
Sem similaridade	TrEST-A0066		2
	TrEST-A3112		3
	TrEST-B27G10)	3
	TrEST-A1667		5
	TrEST-B06F12		6
	TrEST-A2520		8
	TrEST-A0277		11
	TrEST-A1879		11
	TrEST-A3996		12
	TrEST-A4034		13
	TrEST-B33H12	2	13
	TrEST-A1718		14
	TrEST-A2609		15
	TrEST-B28B09)	15
	TrEST-B35G01		15
	TrEST-A3804		18
	TrEST-B06C07	7	18

Genes comumente induzidos Genes comumente reprimidos

Grupos 1 a 9. Grupos 14, 17e 18.



Figura 30: Distribuição das funções celulares dos genes de *T. reesei* cuja expressão foi alterada pelo choque térmico a 40°C e pela adição de cádmio (II) a 250 **m**mol.L⁻¹. 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. O grupo de função desconhecida inclui os genes / clones TrEST sem similaridade de seqüência no banco de dados público e aqueles cuja similaridade se faz com potenciais ORFs sem função anotadas em genomas seqüenciados.

Como visto na tabela 6 e na figura 30, metade dos 28 genes comumente induzidos em choque térmico a 40°C e em resposta à adição de íons de cádmio (II) a 250 mmol.L-1 não tem função conhecida, sendo 7 genes identificados com proteínas hipotéticas e oustros 7 sem similaridade de seqüência.

Dentre os demais 14 genes, a função que mais se destaca são certamente os genes de defesa celular relacionados justamente à resposta a estresses: genes que codificam para proteínas de choque térmico HSP30, HSP90, HSP98 e DNAJ e um peptídeo de resposta a estresse de *A. fumigatus*. A HSP98, da família das proteínas HSP100/CLP e similar à proteína HSP104 de *S. cerevisiae* e *S. pombe*, certamente funciona como membro da resposta comum a estresses, visto sua função altamente conservada de desagregação de polipeptídeos desnaturados que podem aparecer em função das mais diversas condições de estresse. A co-chaperone HSP90, a HSP30 e a ATPase DNAJ também estão envolvidas na renaturação de proteínas que perderam sua conformação nativa em função desses estresses.

Além desses, são induzidos em ambos os estresses: o gene do co-sensor PALI, relacionado á via de tradução de sinal de resposta ao pH extracelular em *A. nidulans*; o gene para a N-acetilglucosamina-6-fosfato desacetilase (NAGA), que está relacionada à

reciclagem da parede celular danificada em função de estresses; o gene para a proteína T do sistema de clivagem da glicina, responsável pela síntese de N^5 , N^{10} -metileno-tetraidrofolato; os genes para poliubiquitina e de uma subunidade regulatória do proteasomo que certamente induzem a degradação protéica de peptídeos disfuncionais que estejam além da capacidade de renaturação das chaperonas; dois genes para proteínas ribossomais e um para uma proteína responsável pelo endereçamento vacuolar de peptídeos.

Por fim, o co-fator transcricional MBF1, responsável pela interação entre domínios de ligação a DNA de transativadores e o fator basal de transcrição TBP, também sofreu indução em ambos os estresses. Especula-se MBF1 promova uma maior estabilização da interação entre transativadores e TBP, que leavaria ao aumento da transcrição de certos genes em condições em que o transativador necessário para a expressão dos mesmos estivesse presente. Tal hipótese é corroborada pelo fato de que sua deleção em *S. cerevisiae* não é letal, mas diminui a transcrição de genes dependentes do transativador GCN4, aumentando a susceptibilidade dos mutantes ao composto 3-aminotriazol. A especificidade de MBF1 em relação ao transativador parece não ser conservada, visto que somente sua região C-terminal que interage com TBP tem similaridade de seqüência entre proteínas de diversos organismos. Pode-se imaginar assim que MBF1 potencialize a transcrição de genes normalmente expressos em níveis mais baixos cujos produtos são necessários para a resposta comum a estresses de *T. reesei*.

Dentre os 12 genes reprimidos comumente no choque térmico e na adição de cádmio (II), 7 não têm função conhecida, sendo 4 produtos similares a proteínas hipotéticas e ou 3 demais sem similaridade. Os 5 genes com função conhecida são: o gene para a subunidade P do complexo de clivagem da glicina, responsável pela descarboxilação da glicina numa reação dependente de piridoxal-fosfato; o gene para uma subunidade da sintase de ácidos graxos; o gene para a translocação de ADP/ATP através da membrana mitocondrial; o gene para a metaloredutase, responsável pela redução e absorção de íons metálicos do meio extracelular; e o gene para uma aminotransferase.

Com o intuito de confirmar o padrão de expressão verificado através dos microarrays e realizar uma comparação de forma mais controlada entre as respostas transcricionais de alguns genes frente aos quatro estresses estudados, foi realizada a análise da expressão gênica por meio de Northern blot e hibridização das membranas com sondas

específicas radioativamente marcadas. Os genes estudados foram o da fator de clivagem envolvido na sinalização para a síntese de esteróis, Scap (*SREBP-cleavage activating protein*); o do co-sensor relacionado à sinalização por pH, PalI; o da proteína quinase A, dependente de cAMP, Pka ; o da proteína de choque térmico Hsp98; os dos fatores transcricionais Mbf1, Hac1 (envolvido na resposta a proteínas desnaturadas), Atf21 (envolvido na expressão de genes reprimidos pela repressão catabólica por nitrogênio) e o de um fator transcricional sem especificidade (TrEST-A3600). Como controle da concentração de RNA aplicado nos géis, foi realizada a hibridização com sonda específica para RNA ribossomal 25S. As auto-radiografias dessa análise comparativa são apresentadas na figura 31.

De forma geral, os resultados da figura 31 correspondem aos obtidos pelos microarrays, considerando que as taxas de indução ou repressão dada pelos dados de microarray indicam muito mais uma tendência do que valores quantitativamente precisos. Assim, comprovaram-se em resposta ao choque térmico a 40°C as induções de expressão dos genes Scap, PalI, Mbf1, Hsp98 e uma leve repressão do gene Hac1. As induções da expressão dos genes Mbf1, Hsp98 e Atf21 e a repressão da expressão do gene do fator transcricional codificado pelo TrEST-A3600 em função da ausência de fonte de nitrogênio também foram ratificadas.

A indução da expressão de PalI pela presença de íons de cádmio (II) foi igualmente anotada, ainda que pelo northern blot tenha se mostrado como uma resposta transiente após 30 minutos da adição embora os dados do microarray indicassem que ela se mantinha durante todo o período estudado. Outras discrepâncias foram as induções da expressão de PalI e Mbf1 na ausência de fonte de carbono que não apareceram nos dados de análise comparativa dos microarrays de fonte de carbono. Nesse caso, porém, é importante lembrar que as tabelas comparativas só contem genes para os quais houvesse dados estatisticamente relevantes nas três condições estudadas, ou seja, para ausência de carbono por duas horas e para 30 e 90 minutos após a reposição da fonte de carbono pela adição de glicose.





12 h exp.

Figura 31: Confirmação dos padrões de expressão de alguns genes de *T. reesei* em resposta a diferentes estresses ambientais, inicialmente indicados pela análise de microarrays, através de northern blots (*Materiais e Métodos*). São exibidos dados de autorradiografias reveladas após exposição a membranas hibridizadas por 12 horas. A. Padrões de expressão gênica do fator *SREBP-cleavage activating protein* (SCAP), envolvido na ativação de genes de esteróis; do co-sensor PALI, do sistema de tradução de sinal regulado pelo pH e de um fator de transcrição sem especificidade definida (TrEST-A3600), em função do tempo de choque térmico a 40°C, presença de 250 **m**mol.L⁻¹ Cd²⁺, e ausência e reposição de fontes de carbono e nitrogênio. B. Padrões de expressão gênica do co-fator transcricional *Multiprotein bridging factor 1* (MBF1), da proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA), da proteína de choque térmico HSP98, do fator transcricional HAC1, envolvido na resposta a proteínas desenoveladas, e do fator transcricional ATF21, envolvido na regulação da expressão gênica por disponibilidade nutricional, em função do choque térmico a 40°C e presença, ausência e reposição de fontes de carbono e de nitrogênio. Como controle de aplicação do RNA nos géis foi realizada hibridização com sonda do rRNA 25S de *T. reesei*. Glu 1% - glicose 1%, No C – ausência fonte de carbono, Glu 2% - glicose 2%, Pré-cult. – pré-cultura em meio completo, no N – ausência de fonte de nitrogênio.

Com perspectivas futuras de aprofundar a análise da variação da expressão gênica de *T. reesei* frente a condições adversas e dessa forma identificar novos mecanismos que organismo eucarióticos multicelulares possam utilizar para responder a tais desafios, foi realizada uma comparação inicial dos genes cuja expressão foi alterada em resposta a choque térmico a 40°C, à presença de íons de cádmio (II) e à hipóxia / anóxia transiente (tabela 7), visto a grande variação da expressão gênica de *T. reesei* em função da disponibilidade de oxigênio (Bonaccorsi, 2003; Bonaccorsi, 2005). Genes induzidos, ou reprimidos, nos três estresses podem ser considerados como os mais prováveis membros de uma resposta comum a estresses ambientais.

Dos 23 genes com variação relevante na expressão gênica, presentes nos dados obtidos para esses três estresses, 8 foram comumente induzidos e somente 2 comumente reprimidos. Os genes reprimidos nos três estresses codificam uma proteína similar a uma proteína hipotética de *Giberella zeae* e a metalorredutase, indicando que a captação de íons de metais de transição, como processo de transporte não-essencial, durante a adaptação a uma nova condição ambiental é suspensa.

Dentre os genes induzidos nessas três condições, incluem-se aqueles para as proteínas de choque térmico HSP30 e HSP98, para o co-sensor PALI e para a NAGA, além de dois genes cujos produtos não têm similaridade e um com similaridade a uma proteína hipotética de *G. zeae.* Claramente, pelas funções que desempenham na desagregação e renaturação de proteínas (HSP98 e HSP30), na reciclagem da parede celular (NAGA) e na tradução de um sinal, que pode não estar mais relacionado à condição da membrana plasmática do que ao pH do meio especificamente (PALI), tais genes fazem parte da resposta comum a estresses de *T. reesei.* Visto que a indução da expressão do gene de MBF1 foi verificada em hipóxia / anóxia transiente através de Northern blots (Bonaccorsi, 2003; Bonaccorsi, 2005) e que o gene é induzido me choque térmico e pela presença de íons de cádmio (II) (tabela 6), é igualmente comprovada sua atuação na resposta comum a estresses.

Tabela 7: Genes cuja expressão foi afetada pela adição de cádmio (II) ao meio, pelo choque térmico a 40° C e por hipóxia / anóxia transiente ([O₂] < 0,2 mg.L⁻¹). A expressão dos genes em cada estresse está representada pelos grupos de expressão em que foram incluídos. Os genes cuja tendência de expressão nos três tipos de estresse foi semelhante estão destacados em vermelho, se induzidos, ou em verde, se reprimidos. Os grupos de expressão que representam, em cada caso, os genes induzidos e os reprimidos são indicados.

runçao ID Cione & Descrição	Cd(II)	Grupo 40°C	Grupo O ₂
Defesa Celular			
Resposta a estresseTrEST-A334030 kDa heat shock protein (P19752) [N. crassa]	1	2	3
TrEST-A0004 Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	2	4	5
TrEST-A0074 Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	3	4	5
TrEST-A2012 Probable DnaJ-like heat-shock protein (EAK98400) [C. albicans]	7	6	14
TrEST-A0191 Stress response Rci peptide (EAL92348) [A. fumigatus]	2	11	15
Sinalização Celular			
<i>Efetores/moduladores</i> TrEST-A1813 Related to Pall protein (Q9P6T5) [N. crassa]	4	11	6
Modificação protéica TrEST-A1058 Calnexin (EAL89509) [A. fumigatus]	5	16	14
Estrutura Celular			
Parede celular TrEST-A3142 fumigatus] Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA) (EAL87759) [A	A. 6	6	3
<u>Metabolismo</u>			
Transporte TrEST-A0901 Metalloreductase (EAL85037) [A. fumigatus]	15	28	12
Síntese Protéica			
Degradação protéica TrEST-B07H02 Serine protease 2 (CAC85639) [P. brassicae]	6	20	11
TrEST-A0595 Subtilisin-like serine protease PR1H (CAC95047) [M. anisopliae]	4	20	14
Desconhecida			
Relacionada a provável ORF TrEST-A3747 Hypothetical protein FG07160.1 (EAA76619) [G. zeae]	3	8	6
TrEST-A3914 Hypothetical protein FG02131.1 (EAA69762) [G. zeae]	14	28	6
TrEST-A0358 Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	15	28	12
TrEST-A2812 Hypothetical protein FG01555.1 (EAA68510) [G. zeae]	4	14	14
TrEST-A0150 Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	8	22	14
TrEST-A2606 Hypothetical protein MG07328.4 (EAA56973) [M. grisea]	6	12	15
TrEST-A3863 Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	4	22	15
Sem similaridade TrEST-A0066	2	4	5
TrEST-B27G10	6	6	6
TrEST-A0277	2	21	11
TrEST-A2520	3	12	14
TrEST-A1667	2	11	15
Genes induzidos	1 a 11	1 a 14	0 a 9
Genes reprimidos	12 a 15	15 a 30	10 a 15

Dentre os demais genes que sofreram variação tanto em choque térmico como na presença de cádmio e na hipóxia / anóxia transiente, são igualmente interessantes aqueles que têm o mesmo comportamento em dois estresses, mas diferenciado num terceiro. Assim, verificam-se dois grupos bem distintos com tal comportamento: o primeiro é de genes que, embora induzidos em choque térmico e pela presença de íons de cádmio (II), são reprimidos na hipóxia / anóxia transiente; e o segundo é o de genes reprimidos tanto em choque térmico quanto em hipóxia / anóxia transiente, mas induzidos pela presença de íons de cádmio (II).

No primeiro grupo se encontram os genes da ATPase DNAJ, do ortólogo do peptídeo de resposta a estresse RCI de *A. fumigatus*, e de dois transcritos sem função conhecida e de outros dois sem similaridade de seqüência protéica. Tais genes, portanto, não fazem parte de uma resposta comum a estresses, mas devem responder ao estresse oxidativo que é verificado tanto em choque térmico como resultado da diminuição da reserva antioxidante de glutationa devido à presença de íons de cádmio (II).

No segundo grupo se encontram os genes de duas serina proteases, da calnexina, que atua como chaperone molecular e está relacionada à produção de peroxidase mitocondrial (dependente de manganês) e de tioperoxidases; e de três genes com produtos sem função: dois similares a proteína hipotéticas de *G. zeae* e um sem similaridade de seqüência protéica. Considerando que esses genes são reprimidos normalmente reprimidos em resposta a outros estresses que não a presença de íons de cádmio (II), podemos considerá-los como membros da resposta mais específica a essa condição. As ærinas proteases promovem a degradação de proteínas e peptídeos afetados pela complexação de seus grupos sulfidris pelos íons de cádmio (II) enquanto a calnexina promove a renaturação, ou o enovelamento *de novo*, de enzimas relacionadas à eliminação de radicais que possam ter se formado devido à oscilação no potencial redox intracelular resultante da diminuição da reserva de glutationa, certamente utilizada para a complexação dos íons de cádmio (II) e destoxificação do meio intracelular.

6 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Por ser um organismo saprófito cujo habitat natural é o solo, *Trichoderma reesei* pode se encontrar sob condições de estresse envolvendo a limitação de micro e macronutrientes, a presença de concentrações nocivas de íons de metais pesados e a variação do pH. Essas condições, assim como o crescimento sob temperaturas elevadas, podem ser ainda mais comuns em cultivos industriais em que *T. reesei* é utilizado por suas características de alto poder de síntese e secreção de proteínas.

A análise da variação da expressão gênica de aproximadamente 2.000 transcritos de *T. reesei* em função do choque térmico a 40°C, da presença de íons de cádmio (II) em concentração de 250 μ mol.L⁻¹, e da ausência de fontes de carbono ou de nitrogênio, apontou que, como em *S. cerevisiae* e *S. pombe*, vários genes tiveram um padrão de expressão comum em resposta a esses estresses, além daqueles muitos cuja expressão variou especificamente em resposta a um determinado estresse.

Em geral, as respostas aos estresses se compuseram da regulação negativa da transcrição de genes envolvidos em processos com alta demanda de energia como a síntese protéica, evidenciada pela repressão da expressão de genes de proteínas ribossomais e do anabolismo. Em contrapartida, genes codificando proteínas relacionadas à defesa celular, como chaperonas, tiveram sua expressão induzida.

As respostas ao choque térmico e ao tratamento com cádmio II se mostraram bastantes semelhantes. Genes relacionados à utilização de reservas lipídicas foram induzidos tanto na ausência de fonte de carbono quanto de nitrogênio. A ausência de fonte de nitrogênio também induziu a expressão de genes relacionados à degradação de proteínas e nucleotídeos para sua utilização dos catabólitos como fonte alternativa de nitrogênio na manutenção da viabilidade celular.

Foram identificados reguladores transcricionais e componentes de vias de sinalização celular com expressão diferenciada frente a esses diferentes estresses ambientais, que podem estar dessa forma relacionados à resposta específica a um determinado estresse ou comum a vários.

A maior parte dos genes cuja expressão se alterou em função dos diversos estresses ambientais estudados ainda não tem função celular conhecida, sendo essa observação uma contribuição importante para sua anotação funcional.

A ampliação da análise desses dados com a introdução dos dados provenientes dos experimentos de limitação nutricional em comparação à disponibilidade de oxigênio certamente fornecerá um maior entendimento da resposta geral e específica de *T. reesei* a estresses ambientais, que se espera poder ser aplicado tanto em pesquisa sobre os mecanismos celulares e fisiológicos do fungo quanto em aplicações industriais.

Outra área de interesse a ser desenvolvida no futuro é a determinação das vias de tradução de sinal, seus componentes e os fatores transcricionais que possam estar envolvidos na resposta a estresses em *T. reesei* e sua comparação com as já conhecidas vias de leveduras e de eucariotos superiores. Para tanto, será necessária análise mais detalhada da expressão de fatores transcricionais e proteínas relacionadas à sinalização celular frente aos diferentes estresses estudados nesse trabalho.

Uma vez que o fungo filamentoso *Trichoderma reesei* vem se tornando um organismo de valor biotecno lógico por sua característica de alto poder de síntese e secreção de proteínas, esperamos que os dados apresentados forneçam um maior entendimento dos processos celulares desse organismo e possam subsidiar futuros projetos visando uma melhor adaptação do mesmo a ambientes industriais.

7 – BIBLIOGRAFIA

Abrahao-Neto, J., C. H. Rossini, *et al.* Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in Trichoderma reesei. Biochemistry, v.34, n.33, Aug 22, p.10456-62. 1995.

Albig, A. R. e C. J. Decker. The target of rapamycin signaling pathway regulates mRNA turnover in the yeast Saccharomyces cerevisiae. <u>Mol Biol Cell</u>, v.12, n.11, Nov, p.3428-38. 2001.

Alspaugh, J. A., J. R. Perfect, *et al.* Cryptococcus neoformans mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP. <u>Genes Dev</u>, v.11, n.23, Dec 1, p.3206-17. 1997.

Altomare, C., W. A. Norvell, *et al.* Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus trichoderma harzianum rifai 1295-22. <u>Appl Environ Microbiol</u>, v.65, n.7, Jul, p.2926-33. 1999.

Altschul, S. F., T. L. Madden, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. <u>Nucleic Acids Res</u>, v.25, n.17, Sep 1, p.3389-402. 1997.

Amin, J., J. Ananthan, et al. Key features of heat shock regulatory elements. Mol Cell Biol, v.8, n.9, Sep, p.3761-9. 1988.

Amoros, M. e F. Estruch. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of Saccharomyces cerevisiae genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. <u>Mol Microbiol</u>, v.39, n.6, Mar, p.1523-32. 2001.

Andrews, P. D. e M. J. Stark. Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in Saccharomyces cerevisiae. <u>J Cell Sci</u>, v.113 (Pt 3), Feb, p.507-20. 2000.

Ashburner, M., C. A. Ball, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. <u>Nat</u> <u>Genet</u>, v.25, n.1, May, p.25-9. 2000.

Ashe, M. P., S. K. De Long, *et al.* Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast. <u>Mol Biol Cell</u>, v.11, n.3, Mar, p.833-48. 2000.

Attfield, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. <u>Nat Biotechnol</u>, v.15, n.13, Dec, p.1351-7. 1997.

Ausubel, F. M. <u>Short protocols in molecular biology</u>: a compendium of methods from <u>Current protocols in molecular biology</u>. Brooklyn, NYNew York, NY: Greene Pub. Associates ;Wiley. 1992. 1 v. (various pagings) p.

Bagga, S., G. Hu, *et al.* Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus Metarhizium anisopliae. <u>Gene</u>, v.324, Jan 7, p.159-69. 2004.

Bai, Z., L. M. Harvey, *et al.* Elevated temperature effects on the oxidant/antioxidant balance in submerged batch cultures of the filamentous fungus Aspergillus niger B1-D. <u>Biotechnol Bioeng</u> v.83, n.7, Sep 30, p.772-9. 2003a.

. Oxidative stress in submerged cultures of fungi. Crit Rev Biotechnol, v.23, n.4, p.267-302. 2003b.

Ball, C. A., K. Dolinski, *et al.* Integrating functional genomic information into the Saccharomyces genome database. <u>Nucleic Acids Res</u>, v.28, n.1, Jan 1, p.77-80. 2000.

Barbey, R., P. Baudouin-Cornu, *et al.* Inducible dissociation of SCF(Met30) ubiquitin ligase mediates a rapid transcriptional response to cadmium. <u>Embo J</u>, v.24, n.3, Feb 9, p.521-32. 2005.

Beckmann, R. P., L. E. Mizzen, et al. Interaction of Hsp 70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. <u>Science</u>, v.248, n.4957, May 18, p.850-4. 1990.

Beguin, P. e J. P. Aubert. The biological degradation of cellulose. FEMS Microbiol Rev, v.13, n.1, Jan, p.25-58. 1994.

Beissinger, M. e J. Buchner. How chaperones fold proteins. Biol Chem, v.379, n.3, Mar, p.245-59. 1998.

Bieganowski, P., K. Shilinski, *et al.* Cdc123 and checkpoint forkhead associated with RING proteins control the cell cycle by controlling eIF2gamma abundance. J Biol Chem, v.279, n.43, Oct 22, p.44656-66. 2004.

Biely, P., Tenkanen, M. Enzymology of hemicellulose degradation. In: G. E. Harman, Kubicek, C. P. (Ed.). <u>*Trichoderma*</u> & <u>*Gliocladium*</u>. London: Taylor & Francis, v.2, 1998. Enzymology of hemicellulose degradation.

Bolar, J., Norelli, J. L., Wong, K.-W., Hayes, C. K., Harman, G. E., Aldwinckle, H. S. Increased resistance to scab of endochitinase transgenic McIntosh applelines. <u>Phytopathology</u>, v.90, p.72-7. 2000.

Bonaccorsi, E. <u>Regulação da expressão gênica por oxigênio em microorganismos eucariotos: Análise de ESTs</u> ("Expressed Sequence Tags") e "microarrays" de cDNA de *Trichoderma reesei*. (Tese de Doutorado). Departamento de Bioquímica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003. 117 p.

Bonaccorsi, E. D., Ferreira A. J. S.*, Chambergo, F. S., Ramos, A. S. P., Mantovani, M. C., Farah, J. P. S., Sorio, C. S., Gombert, A. K., Tonso, A., El-Dorry, H. Transcriptional response of the obligatory aerobe Trichoderma reesei to hypoxia and transient anoxia: implications for energy production and survival in the absence of oxygen. <u>Biochemistry</u>, v.submetido. 2005.

Borkovich, K. A., F. W. Farrelly, *et al.* hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. <u>Mol Cell Biol</u>, v.9, n.9, Sep, p.3919-30. 1989.

Braun, E. L., E. K. Fuge, *et al.* A stationary-phase gene in Saccharomyces cerevisiae is a member of a novel, highly conserved gene family. <u>J Bacteriol</u>, v.178, n.23, Dec, p.6865-72. 1996.

Bukau, B. e A. L. Horwich. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell, v.92, n.3, Feb 6, p.351-66. 1998.

Butow, R. A. e N. G. Avadhani. Mitochondrial signaling: the retrograde response. <u>Mol Cell</u>, v.14, n1, Apr 9, p.1-15. 2004.

Carle-Urioste, J. C., J. Escobar-Vera, *et al.* Cellulase induction in Trichoderma reesei by cellulose requires its own basal expression. J Biol Chem, v.272, n.15, Apr 11, p.10169-74. 1997.

Casamayor, A. e M. Snyder. Molecular dissection of a yeast septin: distinct domains are required for septin interaction, localization, and function. <u>Mol Cell Biol</u>, v.23, n.8, Apr, p.2762-77. 2003.

Causton, H. C., B. Ren, *et al.* Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. <u>Mol Biol</u> <u>Cell</u>, v.12, n.2, Feb, p.323-37. 2001.

Chambergo, F. S., E. D. Bonaccorsi, *et al.* 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, v.277, n.16, Apr 19, p.13983-8. 2002.

Chang, Y.-C., Chang Y.-C, Baker, R. Increased growth of plants in the presence of the biological control agent Trichoderma harzianum. <u>Plant Diseases</u>, v.70, p.145-8. 1986.

Chen, D., W. M. Toone, *et al.* Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. <u>Mol Biol Cell</u>, v.14, n.1, Jan, p.214-29. 2003.

Clemens, S., E. J. Kim, *et al.* Tolerance to toxic metals by a gene family of phytochelatin synthases from plants and yeast. <u>Embo J</u>, v.18, n.12, Jun 15, p.3325-33. 1999.

Clemens, S., J. I. Schroeder, *et al.* Caenorhabditis elegans expresses a functional phytochelatin synthase. <u>Eur J Biochem</u>, v.268, n.13, Jul, p.3640-3. 2001.

Cobbett, C. S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol, v.123, n.3, Jul, p.825-32. 2000.

Craig, E. A., B. D. Gambill, *et al.* Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. <u>Microbiol Rev</u>, v.57, n.2, Jun, p.402-14. 1993.

Cui, Y., J. D. Dinman, *et al.* The Mof2/Sui1 protein is a general monitor of translational accuracy. <u>Mol Cell Biol</u>, v.18, n.3, Mar, p.1506-16. 1998.

Cullen, P. J. e G. F. Sprague, Jr. Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.97, n.25, Dec 5, p.13619-24. 2000.

Denison, S. H., S. Negrete-Urtasun, *et al.* Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in Aspergillus and meiosis in saccharomyces are homologous. <u>Mol Microbiol</u>, v.30, n.2, Oct, p.259-64. 1998.

Derisi, J. L., V. R. Iyer, *et al.* Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. <u>Science</u>, v.278, n.5338, Oct 24, p.680-6. 1997.

Dumanchin, C., C. Czech, *et al.* Presenilins interact with Rab11, a small GTPase involved in the regulation of vesicular transport. <u>Hum Mol Genet</u>, v.8, n.7, Jul, p.1263-9. 1999.

El-Gogary, S., A. Leite, *et al.* Mechanism by which cellulose triggers cellobiohydrolase I gene expression in Trichoderma reesei. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.86, n.16, Aug, p.6138-41. 1989.

Ellis, J. Proteins as molecular chaperones. Nature, v.328, n.6129, Jul 30-Aug 5, p.378-9. 1987.

Erkine, A. M., C. Szent-Gyorgyi, *et al.* The upstream sequences of the HSP82 and HSC82 genes of Saccharomyces cerevisiae: regulatory elements and nucleosome positioning motifs. <u>Yeast</u>, v.11, n.6, May, p.573-80. 1995.

Ernsting, B. R. e J. E. Dixon. The PPS1 gene of Saccharomyces cerevisiae codes for a dual specificity protein phosphatase with a role in the DNA synthesis phase of the cell cycle. J Biol Chem, v.272, n.14, Apr 4, p.9332-43. 1997.

Estruch, F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. <u>FEMS</u> <u>Microbiol Rev</u>, v.24, n.4, Oct, p.469-86. 2000.

Fauchon, M., G. Lagniel, *et al.* Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. <u>Mol Cell</u>, v.9, n.4, Apr, p.713-23. 2002.

Fenton, W. A. e A. L. Horwich. GroEL-mediated protein folding. Protein Sci, v.6, n.4, Apr, p.743-60. 1997.

Fernandes, M., H. Xiao, *et al.* Fine structure analyses of the Drosophila and Saccharomyces heat shock factor--heat shock element interactions. <u>Nucleic Acids Res</u>, v.22, n.2, Jan 25, p.167-73. 1994.

Francois, J. e J. L. Parrou. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. <u>FEMS Microbiol</u> <u>Rev</u>, v.25, n.1, Jan, p.125-45. 2001.

Frank, V. e G. Tamova. Mutagenic effect of cadmium on Trichoderma viride. <u>Acta Microbiol Hung</u> v.40, n.1, p.65-9. 1993.

Frydman, J., E. Nimmesgern, *et al.* Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones. <u>Nature</u>, v.370, n.6485, Jul 14, p.111-7. 1994.

Fuge, E. K., E. L. Braun, *et al.* Protein synthesis in long-term stationary-phase cultures of Saccharomyces cerevisiae. <u>J</u> Bacteriol, v.176, n.18, Sep, p.5802-13. 1994.

Gallo, G. J., H. Prentice, *et al.* Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. <u>Mol Cell Biol</u>, v.13, n.2, Feb, p.749-61. 1993.

Gams, W., Bissett, J. Morphology and identification of Trichoderma. In: C. P. Kubicek, Harman G. E. (Ed.). <u>Trichoderma</u> & <u>Gliocladium. v.1</u>. London: Taylor & Francis, v.1, 1998. Morphology and identification of Trichoderma.

Garreau, H., R. N. Hasan, *et al.* Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in Saccharomyces cerevisiae. <u>Microbiology</u>, v.146 (Pt 9), Sep, p.2113-20. 2000.

Gasch, A. P., M. Huang *et al.* Genomic expression responses to DNA-damaging agents and the regulatory role of the yeast ATR homolog Mec1p. <u>Mol Biol Cell</u>, v.12, n.10, Oct, p.2987-3003. 2001.

Gasch, A. P., P. T. Spellman, *et al.* Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell, v.11, n.12, Dec, p.4241-57. 2000.

Gasch, A. P. e M. Werner-Washburne. The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. <u>Funct</u> <u>Integr Genomics</u>, v.2, n.4-5, Sep, p.181-92. 2002.

Gharieb, M. M. Pattern of cadmium accumulation and essential cations during growth of cadmium-tolerant fungi. <u>Biometals</u>, v.14, n.2, Jun, p.143-51. 2001.

Granot, D. e M. Snyder. Carbon source induces growth of stationary phase yeast cells, independent of carbon source metabolism. <u>Yeast</u>, v.9, n.5, May, p.465-79. 1993.

Guelfi, A., R. A. Azevedo, *et al.* Growth inhibition of the filamentous fungus Aspergillus nidulans by cadmium: an antioxidant enzyme approach. J Gen Appl Microbiol, v.49, n.2, Apr, p.63-73. 2003.

Guest, G. M., X. Lin, *et al.* Aspergillus nidulans RhoA is involved in polar growth, branching, and cell wall synthesis. <u>Fungal Genet Biol</u>, v.41, n.1, Jan, p.13-22. 2004.

Ha, S. B., A. P. Smith, *et al.* Phytochelatin synthase genes from Arabidopsis and the yeast Schizosaccharomyces pombe. <u>Plant Cell</u>, v.11, n.6, Jun, p.1153-64. 1999.

Haran, S., Schikler, H. And Chet, I. Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the ciocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. <u>Microbiology</u>, v.142, p.2321-31. 1996.

Harman G E, K. C. P. <u>Trichoderma and Gliocladium - Enzymes</u>, <u>Biological Control and Commercial Applications</u>. London: Taylor & Francis, v.2. 1998. 393 p.

Harrison, C., S. Katayama, *et al.* SCF(Pof1)-ubiquitin and its target Zip1 transcription factor mediate cadmium response in fission yeast. <u>Embo J</u>, v.24, n.3, Feb 9, p.599-610. 2005.

Hemmingsen, S. M., C. Woolford, *et al.* Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. <u>Nature</u>, v.333, n.6171, May 26, p.330-4. 1988.

Henrique-Silva, F., S. El-Gogary, *et al.* Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of Trichoderma reesei are adjacent to its TATA box. <u>Biochem Biophys Res Commun</u>, v.228, n.2, Nov 12, p.229-37. 1996.

Herrera-Estrella, A., G. H. Goldman, *et al.* Electrophoretic karyotype and gene assignment to resolved chromosomes of Trichoderma spp. <u>Mol Microbiol</u>, v.7, n.4, Feb, p.515-21. 1993.

Hightower, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. Cell, v.66, n.2, Jul 26, p.191-7. 1991.

Hirschi, K. D., V. D. Korenkov, *et al.* Expression of arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. <u>Plant Physiol</u>, v.124, n.1, Sep, p.125-33. 2000.

Hoj, A. e B. K. Jakobsen. A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. <u>Embo J</u>, v.13, n.11, Jun 1, p.2617-24. 1994.

Holmberg, C. I., V. Hietakangas, *et al.* Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. Embo J, v.20, n.14, Jul 16, p.3800-10. 2001.

Howlett, N. G. e S. V. Avery. Induction of lipid peroxidation during heavy metal stress in Saccharomyces cerevisiae and influence of plasma membrane fatty acid unsaturation. <u>Appl Environ Microbiol</u>, v.63, n.8, Aug, p.2971-6. 1997.

Ilmen, M., A. Saloheimo, *et al.* Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus Trichoderma reesei. <u>Appl Environ Microbiol</u>, v.63, n.4, Apr, p.1298-306. 1997.

Ivey, F. D., A. M. Kays, *et al.* Shared and independent roles for a Galpha(i) protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in Neurospora crassa. <u>Eukaryot Cell</u>, v.1, n.4, Aug, p.634-42. 2002.

Jakobsen, B. K. e H. R. Pelham. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. <u>Mol Cell Biol</u>, v.8, n.11, Nov, p.5040-2. 1988.

Jamieson, D. Saving sulfur. Nat Genet, v.31, n.3, Jul, p.228-30. 2002.

Jamieson, D. J. Saccharomyces cerevisiae has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione. <u>J</u> <u>Bacteriol</u>, v.174, n.20, Oct, p.6678-81. 1992.

Jelinsky, S. A., P. Estep, *et al.* Regulatory networks revealed by transcriptional profiling of damaged Saccharomyces cerevisiae cells: Rpn4 links base excision repair with proteasomes. <u>Mol Cell Biol</u>, v.20, n.21, Nov, p.8157-67. 2000.

Johnston, M. Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. <u>Trends Genet</u>, v.15, n.1, Jan, p.29-33. 1999.

Kato, M. An overview of the CCAAT-box binding factor in filamentous fungi: assembly, nuclear translocation, and transcriptional enhancement. <u>Biosci Biotechnol Biochem</u>, v.69, n.4, Apr, p.663-72. 2005.

Keniry, C. A., D. Li, *et al.* Cloning and expression studies during vegetative growth and sexual development of Psp2, a serine protease gene from Pyrenopeziza brassicae. <u>Biochim Biophys Acta</u>, v.1577, n.1, Aug 19, p.159-63. 2002.

Klein, D., Eveleigh, D. E. Ecology of Trichoderma. In: C. P. Kubicek, Harman G. E. (Ed.). <u>Trichoderma & Gliocladium</u>. <u>v.1</u>. London: Taylor & Francis, v.1, 1998. Ecology of Trichoderma.

Kolodrubetz, D. e A. Burgum. Duplicated NHP6 genes of Saccharomyces cerevisiae encode proteins homologous to bovine high mobility group protein 1. <u>J Biol Chem</u>, v.265, n.6, Feb 25, p.3234-9. 1990.

Kuhls, K., E. Lieckfeldt, *et al.* Molecular evidence that the asexual industrial fungus Trichoderma reesei is a clonal derivative of the ascomycete Hypocrea jecorina. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.93, n.15, Jul 23, p.7755-60. 1996.

Kuhn, K. M., J. L. Derisi, *et al.* Global and specific translational regulation in the genomic response of Saccharomyces cerevisiae to a rapid transfer from a fermentable to a nonfermentable carbon source. <u>Mol Cell Biol</u>, v.21, n.3, Feb, p.916-27. 2001.

Lee, I. S., J. Lin, *et al.* The stationary-phase sigma factor sigma S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent Salmonella typhimurium. <u>Mol Microbiol</u>, v.17, n.1, Jul, p.155-67. 1995.

Li, Y., R. D. Moir, *et al.* Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. <u>Mol Cell Biol</u>, v.20, n.11, Jun, p.3843-51. 2000.

Li, Z. S., Y. P. Lu, *et al.* A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in Saccharomyces cerevisiae: YCF1catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.94, n.1, Jan 7, p.42-7. 1997.

Liao, V. H., J. Dong *et al.* Molecular characterization of a novel, cadmium-inducible gene from the nematode Caenorhabditis elegans. A new gene that contributes to the resistance to cadmium toxicity. <u>J Biol Chem</u>, v.277, n.44, Nov 1, p.42049-59. 2002.

Lindquist, S. e E. A. Craig. The heat-shock proteins. Annu Rev Genet, v.22, p.631-77. 1988.

Liu, X. D. e D. J. Thiele. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. <u>Genes Dev</u>, v.10, n.5, Mar 1, p.592-603. 1996.

Liu, X. F. e V. C. Culotta. Post-translation control of Nramp metal transport in yeast. Role of metal ions and the BSD2 gene. J Biol Chem, v.274, n.8, Feb 19, p.4863-8. 1999.

Lorito, M., S. L. Woo, *et al.* Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.95, n.14, Jul 7, p.7860-5. 1998.

Macfarlane, W. M., C. M. Mckinnon, *et al.* Glucose stimulates translocation of the homeodomain transcription factor PDX1 from the cytoplasm to the nucleus in pancreatic beta-cells. J Biol Chem, v.274, n.2, Jan 8, p.1011-6. 1999.

Maeda, T., M. Takekawa, *et al.* Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. <u>Science</u>, v.269, n.5223, Jul 28, p.554-8. 1995.

Mandels, M. e E. T. Reese. Induction of cellulase in Trichoderma viride as influenced by carbon sources and metals. J Bacteriol, v.73, n.2, Feb, p.269-78. 1957.

Mantyla, A. L., Paloheimo, M., Suominen, P. Industrial mutants and recombinantstrains of Trichoderma reesei. In: K. C. P. Harman G E (Ed.). <u>Trichoderma & Gliocladium. v.2.</u> London: Taylor & Francis, v.2, 1998. Industrial mutants and recombinantstrains of Trichoderma reesei.

Mantyla, A. L., K. H. Rossi, *et al.* Electrophoretic karyotyping of wild-type and mutant Trichoderma longibrachiatum (reesei) strains. <u>Curr Genet</u>, v.21, n.6, May, p.471-7. 1992.

Mata, J., R. Lyne, *et al.* The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. <u>Nat Genet</u>, v.32, n.1, Sep, p.143-7. 2002.

Matsui, Y. e E. A. Toh. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. <u>Mol Cell Biol</u>, v.12, n.12, Dec, p.5690-9. 1992.

Matsumoto, T. e D. Beach. Premature initiation of mitosis in yeast lacking RCC1 or an interacting GTPase. <u>Cell</u>, v.66, n.2, Jul 26, p.347-60. 1991.

Meskiene, I., E. Baudouin, *et al.* Stress-induced protein phosphatase 2C is a negative regulator of a mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem, v.278, n.21, May 23, p.18945-52. 2003.

Moradas-Ferreira, P. e V. Costa. Adaptive response of the yeast Saccharomyces cerevisiae to reactive oxygen species: defences, damage and death. <u>Redox Rep</u>, v.5, n.5, p.277-85. 2000.

Nelson, M. A. e R. L. Metzenberg. Sexual development genes of Neurospora crassa. <u>Genetics</u>, v.132, n.1, Sep, p.149-62. 1992.

Nidetzky, B., Hayn, M., Macarron, R., Steiner, W. Synergism of Trichoderma reesei cellulases while degrading different celluloses. <u>Biotechnological Letters</u>, v.15, p.71-6. 1993.

Nidetzky, B., W. Steiner, *et al.* 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. <u>Biochem J</u>, v.303 (Pt 3), Nov 1, p.817-23. 1994.

Ohmiya, R., C. Kato, *et al.* Isolation of multicopy suppressors of the calcium sensitivity of a mutant lacking the bZIP transcription factor Atf1 in fission yeast. <u>Mol Gen Genet</u>, v.261, n.2, Mar, p.297-306. 1999.

Ortiz, D. F., T. Ruscitti, *et al.* Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. J Biol Chem, v.270, n.9, Mar 3, p.4721-8. 1995.

Padilla, P. A., E. K. Fuge, *et al.* The highly conserved, coregulated SNO and SNZ gene families in Saccharomyces cerevisiae respond to nutrient limitation. <u>J Bacteriol</u>, v.180, n.21, Nov, p.5718-26. 1998.

Pan, T., J. Chen, *et al.* Crk1, a novel Cdc2-related protein kinase, is required for hyphal development and virulence in Candida albicans. <u>Mol Cell Biol</u>, v.20, n.23, Dec, p.8696-708. 2000.

Parlati, F., M. Dominguez, *et al.* Saccharomyces cerevisiae CNE1 encodes an endoplasmic reticulum (ER) membrane protein with sequence similarity to calnexin and calreticulin and functions as a constituent of the ER quality control apparatus. J Biol Chem, v.270, n.1, Jan 6, p.244-53. 1995.

Pelham, H. R. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. <u>Cell</u>, v.46, n.7, Sep 26, p.959-61. 1986.

Perego, P. e S. B. Howell. Molecular mechanisms controlling sensitivity to toxic metal ions in yeast. <u>Toxicol Appl</u> <u>Pharmacol</u>, v.147, n.2, Dec, p.312-8. 1997.

Plesofsky-Vig, N. e R. Brambl. Gene sequence and analysis of hsp30, a small heat shock protein of Neurospora crassa which associates with mitochondria. J Biol Chem, v.265, n.26, Sep 15, p.15432-40. 1990.

Posas, F., J. R. Chambers, *et al.* The transcriptional response of yeast to saline stress. <u>J Biol Chem</u>, v.275, n.23, Jun 9, p.17249-55. 2000.

Pratt, W. B. The role of the hsp90-based chaperone system in signal transduction by nuclear receptors and receptors signaling via MAP kinase. <u>Annu Rev Pharmacol Toxicol</u>, v.37, p.297-326. 1997.

Rep, M., M. Krantz, *et al.* The transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. J Biol Chem, v.275, n.12, Mar 24, p.8290-300. 2000.

Richter, K. e J. Buchner. Hsp90: chaperoning signal transduction. J Cell Physiol, v.188, n.3, Sep, p.281-90. 2001.

Roussou, I. e G. Draetta. The Schizosaccharomyces pombe casein kinase II alpha and beta subunits: evolutionary conservation and positive role of the beta subunit. <u>Mol Cell Biol</u>, v.14, n.1, Jan, p.576-86. 1994.

Saltsman, K. A., H. L. Prentice, *et al.* Mutations in the Schizosaccharomyces pombe heat shock factor that differentially affect responses to heat and cadmium stress. <u>Mol Gen Genet</u>, v.261, n.1, Feb, p.161-9. 1999.

Sambrook, J., T. Maniatis, et al. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory. 1989

Samuels, G. J. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. <u>Mycology Research</u>, v.100, 1996, p.923-35. 1996.

Santoro, N., N. Johansson, *et al.* Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. <u>Mol Cell Biol</u>, v.18, n.11, Nov, p.6340-52. 1998.

Santos, J. L. e K. Shiozaki. Fungal histidine kinases. Sci STKE, v.2001, n.98, Sep 4, p.RE1. 2001.

Schirmer, E. C., J. R. Glover, *et al.* HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. <u>Trends</u> <u>Biochem Sci</u>, v.21, n.8, Aug, p.289-96. 1996.

Schuberth, C., H. Richly, *et al.* Shp1 and Ubx2 are adaptors of Cdc48 involved in ubiquitin-dependent protein degradation. <u>EMBO Rep</u>, v.5, n.8, Aug, p.818-24. 2004.

Shalon, D., S. J. Smith, *et al.* A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. <u>Genome Res</u>, v.6, n.7, Jul, p.639-45. 1996.

Shiraishi, E., M. Inouhe, *et al.* The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast S. cerevisiae. <u>Curr Genet</u>, v.37, n.2, Feb, p.79-86. 2000.

Shyy, T. T., J. R. Subjeck, *et al.* Effect of growth state and heat shock on nucleolar localization of the 110,000-Da heat shock protein in mouse embryo fibroblasts. <u>Cancer Res</u>, v.46, n.9, Sep, p.4738-45. 1986.

Siderius, M., E. Rots, *et al.* High-osmolarity signalling in Saccharomyces cerevisiae is modulated in a carbon-source-dependent fashion. <u>Microbiology</u>, v.143 (Pt 10), Oct, p.3241-50. 1997.

Sistonen, L., K. D. Sarge, *et al.* Human heat shock factors 1 and 2 are differentially activated and can synergistically induce hsp70 gene transcription. <u>Mol Cell Biol</u>, v.14, n.3, Mar, p.2087-99. 1994.

Sorger, P. K. e H. R. Pelham. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperaturedependent phosphorylation. <u>Cell</u>, v.54, n.6, Sep 9, p.855-64. 1988.

Subjeck, J. R., T. Shyy, *et al.* Association between the mammalian 110,000-dalton heat-shock protein and nucleoli. <u>J Cell</u> <u>Biol</u>, v.97, n.5 Pt 1, Nov, p.1389-95. 1983.

Szczypka, M. S., J. A. Wemmie, *et al.* A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. <u>J Biol Chem</u>, v.269, n.36, Sep 9, p.22853-7. 1994.

Takemaru, K., S. Harashima, *et al.* Yeast coactivator MBF1 mediates GCN4-dependent transcriptional activation. <u>Mol</u> <u>Cell Biol</u>, v.18, n.9, Sep, p.4971-6. 1998.

Takeuchi, M. e M. Yanagida. A mitotic role for a novel fission yeast protein kinase dsk1 with cell cycle stage dependent phosphorylation and localization. <u>Mol Biol Cell</u>, v.4, n.3, Mar, p.247-60. 1993.

Thevelein, J. M. e J. H. De Winde. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast Saccharomyces cerevisiae. <u>Mol Microbiol</u>, v.33, n.5, Sep, p.904-18. 1999.

Thomsson, E., L. Gustafsson, *et al.* Starvation response of Saccharomyces cerevisiae grown in anaerobic nitrogen- or carbon-limited chemostat cultures. <u>Appl Environ Microbiol</u>, v.71, n.6, Jun, p.3007-13. 2005.

Travers, K. J., C. K. Patil, *et al.* Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. <u>Cell</u>, v.101, n.3, Apr 28, p.249-58. 2000.

Vassilev, A. O., N. Plesofsky-Vig *et al.* Isolation, partial amino acid sequence, and cellular distribution of heat-shock protein hsp98 from Neurospora crassa. <u>Biochim Biophys Acta</u>, v.1156, n.1, Dec 8, p.1-6. 1992.

Vasudevan, S. e S. W. Peltz. Regulated ARE-mediated mRNA decay in Saccharomyces cerevisiae. <u>Mol Cell</u>, v.7, n.6, Jun, p.1191-200. 2001.

Vatamaniuk, O. K., E. A. Bucher, *et al.* A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in Caenorhabditis elegans. J Biol Chem, v.276, n.24, Jun 15, p.20817-20. 2001.

Vencio, R. Z. e T. Koide. HTself: Self-Self Based Statistical Test for Low Replication Microarray Studies. <u>DNA Res</u>, v.12, n.3, p.211-4. 2005.

Vido, K., D. Spector, *et al.* A proteome analysis of the cadmium response in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem, v.276, n.11, Mar 16, p.8469-74. 2001.

Vincent, O., R. Townley, *et al.* Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. <u>Genes Dev</u>, v.15, n.9, May 1, p.1104-14. 2001.

Wainwright, M. Oligotrophic growth of fungi - stress or natural state? In: D. H. Jennings (Ed.). <u>Stress Tolerance of Fungi</u>. New York: Mercel Dekker, 1993. Oligotrophic growth of fungi - stress or natural state?

Walsh, G. A., R. F. Power, et al. Enzymes in the animal-feed industry. <u>Trends Biotechnol</u>, v.11, n.10, Oct, p.424-30. 1993.

Wang, P., J. R. Perfect, *et al.* The G-protein beta subunit GPB1 *is* required for mating and haploid fruiting in Cryptococcus neoformans. <u>Mol Cell Biol</u>, v.20, n.1, Jan, p.352-62. 2000.

Warner, J. R. The economics of ribosome biosynthesis in yeast. Trends Biochem Sci, v.24, n.11, Nov, p.437-40. 1999.

Weaver, P. L., C. Sun, *et al.* Dbp3p, a putative RNA helicase in Saccharomyces cerevisiae, is required for efficient prerRNA processing predominantly at site A3. <u>Mol Cell Biol</u>, v.17, n.3, Mar, p.1354-65. 1997.

Werner-Washburne, M., E. L. Braun, *et al.* Stationary phase in Saccharomyces cerevisiae. <u>Mol Microbiol</u>, v.19, n.6, Mar, p.1159-66. 1996.

Werner-Washburne, M. e E. A. Craig. Expression of members of the Saccharomyces cerevisiae hsp70 multigene family. <u>Genome</u>, v.31, n.2, p.684-9. 1989.

Westwood, J. T., J. Clos, *et al.* Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. Nature, v.353, n.6347, Oct 31, p.822-7. 1991.

Wu, J., N. Zhang, *et al.* Global analysis of nutrient control of gene expression in Saccharomyces cerevisiae during growth and starvation. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u>, v.101, n.9, Mar 2, p.3148-53. 2004.

Xie, X., H. H. Wilkinson, *et al.* Transcriptional response to glucose starvation and functional analysis of a glucose transporter of Neurospora crassa. <u>Fungal Genet Biol</u>, v.41, n.12, Dec, p.1104-19. 2004.

Yang, Q. e K. A. Borkovich. Mutational activation of a Galphai causes uncontrolled proliferation of aerial hyphae and increased sensitivity to heat and oxidative stress in Neurospora crassa. <u>Genetics</u>, v.151, n.1, Jan, p.107-17. 1999.

Ye, Y., H. H. Meyer, *et al.* The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. <u>Nature</u>, v.414, n.6864, Dec 6, p.652-6. 2001.

Zaragoza, O. e J. M. Gancedo. Pseudohyphal growth is induced in Saccharomyces cerevisiae by a combination of stress and cAMP signalling. <u>Antonie Van Leeuwenhoek</u>, v.78, n.2, Aug, p.187-94. 2000.

Zhao, H. e D. Eide. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.6, Mar 19, p.2454-8. 1996.

Zhou, J. e P. B. Goldsbrough. Functional homologs of fungal metallothionein genes from Arabidopsis. <u>Plant Cell</u>, v.6, n.6, Jun, p.875-84. 1994.

APÊNDICE.

Este apêndice consiste de tabelas contendo os dados de expressão gênica dos clones TrEST / genes de *Trichoderma reesei*, sob as quatro diferentes condições de estresse ambiental estudadas (choque térmico, presença de cádmio II, ausência e reposição de fontes de carbono e de nitrogênio), obtidos através da técnica de "microarray" de cDNA e tratamento estatístico-matemático descritos em Materiais e Métodos.

Os clones / genes de *T. reesei* estão agrupados segundo sua suposta função celular de acordo com sua anotação a partir do banco público de dados, que também apresenta o número de acesso e o organismo ao qual pertence a seqüência mais relevante com melhor similaridade.

Os dados de expressão fornecidos estão na forma de logaritmo na base 2 da relação entre a condição de estudo e a condição de referência. É fornecido o número do grupo de expressão a que cada clone / gene se situou em cada uma das condições pela análise através do algoritmo SOM.

Tabela 8: Dados de expressão do experimento de Choque Térmico a 40°C. Os clones 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 seqüência similar mais relevante e o organismo da qual proveio. Os dados de expressão são o grupo de padrão de expressão e os valores do logaritmo, na base 2, da razão das fluorescências normalizadas (M) para os pontos de 15, 30 e 60 minutos após o início do choque térmico a 40°C, e 60 minutos após o retorno à temperatura normal de cultura (28°C).

				40 °C				28°C	
Função	Clone ID & Identificação			0 min	15 min	30 min	60 min	120 min	
<u>Defesa Celular</u>									
Destoxificação	Trest-A0033	Related to phenol 2-monooxygenase (CAE76270) [N. crassa]	8	0.00	1.12	1.52	1.45	-0.76	
	Trest-A0307	Cytochrome P450 (AAM48916) [G. zeae]	9	0.00	0.52	1.19	1.19	0.13	
	Trest-A3343	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor (Q9Y783) [N. crassa]	16	0.00	-0.49	-0.50	0.25	1.13	
	Trest-A0803	Monooxygenase (EAL84931) [A. fumigatus]	17	0.00	0.17	-0.55	-0.56	-1.10	
	Trest-A3699	Related to phenol 2-monooxygenase (CAE76270) [N. crassa]	17	0.00	-0.57	0.14	-0.01	-1.41	
	Trest-A0620	Related to glyoxal oxidase precursor (CAE76318) [N. crassa]	24	0.00	-2.06	-3.35	-3.72	-0.12	
	Trest-A4158	Related to glyoxal oxidase precursor (CAE76318) [N. crassa]	24	0.00	-1.64	-2.65	-3.17	-0.45	
	TrEST-A1642	Probable protein disulfide-isomerase precursor (erp38) (Q92249) [N. crassa]	29	0.00	-1.17	-2.00	-0.57	0.36	
Resposta a estresse	Trest-A3340	30 kDa heat shock protein (P19752) [N. crassa]	2	0.00	6.67	7.06	5.74	2.46	
	Trest-A0004	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	4	0.00	4.85	3.90	2.63	-0.59	
	Trest-A0074	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	4	0.00	4.59	3.86	2.64	-0.58	
	Trest-A2428	Molecular chaperone Hsp90 (EAL85888) [A. fumigatus]	4	0.00	3.39	3.85	2.77	-1.28	
	Trest-A2012	Probable DnaJ-like heat-shock protein (Ydj1) (EAK98400) [C. albicans]	6	0.00	2.73	2.86	1.44	-0.86	
	Trest-A2330	Putative Hsp70 chaperone (BiP) (EAL87329) [A. fumigatus]	6	0.00	2.46	2.10	1.35	0.92	
	TrEST-A3968	Heat shock protein 70 kDa (AAP40020) [H. jecorina]	6	0.00	2.38	2.98	1.72	-0.78	
	Trest-A3124	Related to DNAJ-like protein homolog (CAC28838) [N. crassa]	7	0.00	1.40	1.47	1.54	-0.51	
	TrEST-B16D11	Related to Hsp90 associated co-chaperone (CAD21185) [N. crassa]	7	0.00	1.38	1.82	1.29	-0.31	
	Trest-A0696	Putative Hsp70 chaperone (HscA) (EAL85162) [A. fumigatus]	10	0.00	1.17	1.22	0.52	0.33	
	TrEST-A0191	Stress response RCI peptide (EAL92348) [A. fumigatus]	11	0.00	1.32	1.91	1.55	-3.27	
	Trest-A0496	Probable heat-shock protein hsp60 (CAB91379) [N. crassa]	13	0.00	0.55	0.43	0.35	-1.14	
	Trest-A2568	Hypoxia-inducbile gene 1 (HIG1) (AAD33954) [H. sapiens]	13	0.00	0.42	0.23	-0.07	-1.30	
<u>Divisão Celular</u>									
Ciclo celular	Trest-A0423	Checkpoint forkhead associated with RING 2 (Chf2) (DAA05594) [S. cerevisiae]	18	0.00	0.39	-0.63	-2.97	1.80	
	TrEST-A1043	Septin B (EAL86934) [A. fumigatus]	23	0.00	-1.13	-1.61	-1.46	0.08	
Estrutura dos cromossomos	TrEST-A0933	Putative histone chaperone (ASF1) (EAL92478.) [A. fumigatus]	19	0.00	-0.91	-1.44	-1.16	0.27	
	TrEST-A2858	Histone H4 (EAA65376) [A. nidulans]	25	0.00	-0.77	-1.80	-0.96	0.75	
	TrEST-A1561	Histone H3 (P07041) [N. crassa]	26	0.00	-1.23	-2.15	-1.63	0.59	
	TrEST-B08B02	Putative nucleosome binding protein (Nhp6a) (EAL92420) [A. fumigatus]	26	0.00	-1.06	-1.96	-1.36	1.23	
Sinalização Celular									
Canais e proteínas de transporte	Trest-A3723	Putative calcium P-type ATPase NCA-2 (CAE85558) [N. crassa]	14	0.00	-0.69	1.00	0.23	-1.18	
	TrEST-A1513	Putative transport protein (NP_588478) [S. pombe]	15	0.00	0.05	0.79	0.72	-2.16	
	TrEST-B35B09	Related to ER translocation complex chain SEC66 (CAE76490) [N. crassa]	16	0.00	0.00	-0.13	-0.08	1.39	
Efetores e moduladores	TrEST-A3462	Shol osmosensor protein (EAL91757) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.10	-0.81	-0.82	0.12	
Sinalizadores intracelulares	TrEST-A1694	G protein alpha subunit (AAO18659) [H. virens]	9	0.00	0.62	1.19	1.22	-0.10	
	Trest-A3867	Rho3 protein (CAC20376) [H. jecorina]	30	0.00	-1.13	-0.29	-0.31	-0.71	
Modificação protéica	Trest-A0783	Related to protein phosphatase 1 regulator (Glc8)(CAD21258) [N. crassa]	7	0.00	1.84	2.02	1.33	-0.50	

_	~
Fu	ncao

Sinalização Celular

Modificação protéica	Trest-A2158	Related to protein-tyrosine-phosphatase (CAB91306) [N. crassa]	7	0.00	0.88	1.86	1.38	-0.26
	Trest-A3670	Putative protein kinase (EAL89894) [A. fumigatus]	8	0.00	1.25	0.90	0.65	-1.33
	Trest-A2011	cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit (CAC03748) [B. fuckeliana]	9	0.00	0.38	1.16	0.86	0.54
	TrEST-A1058	Calnexin (EAL89509) [A. fumigatus]	16	0.00	0.69	0.68	0.05	1.26
	TrEST-A1661	Probable dis1-suppressing protein kinase Dsk1 (CAD79655) [N. crassa]	17	0.00	-0.32	-0.90	-0.82	-1.55
	TrEST-A3919	Related to protein tyrosine phosphatase PPS1 (CAD21139) [N. crassa]	19	0.00	-1.36	-0.73	-0.60	-0.34
	TrEST-B12C11	Putative serine/threonine phosphatase 2C ptc2 (AAP92916) [H. jecorina]	19	0.00	-1.24	-1.50	-1.07	0.27
	Trest-A3138	Casein kinase II, alpha chain (Q8TG13) [N. crassa]	29	0.00	-1.51	-1.75	-0.94	0.51
	TrEST-A0194	Serine/threonine kinase RIM15 (NP_116620) [S. cerevisiae]	30	0.00	-1.39	-0.32	-0.37	-0.56

Estrutura Celular

Parede celular	Trest-A3472	Putative cell wall glucanase (EAL86311) [A. fumigatus]	5	0.00	2.04	2.65	2.15	-1.47
	Trest-A3142	Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EAL87759) [A. fumigatus]	6	0.00	2.60	2.49	1.76	-0.30
	Trest-A3360	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel2 (EAL88984) [A. fumigatus]	8	0.00	1.08	1.29	1.17	-1.09
	Trest-A2896	Putative cell wall glucanase (EAL86311) [A. fumigatus]	13	0.00	1.04	1.03	0.30	-1.04
	TrEST-B16G09	Extracellular matrix protein precursor (AAL47843) [F. oxysporum]	18	0.00	-0.24	-0.79	-1.26	0.22
	TrHFB2	Hydrophobin II (Y11894) [T. reesei]	18	0.00	0.39	0.11	-1.49	1.42
	Trest-A4289	Related to beta-N-acetylglucosaminidase (CAE85548) [N. crassa]	19	0.00	-1.71	-1.02	-0.99	-0.04
Citoesqueleto	Trest-A4298	Kinesin (AA059284) [B. fuckeliana]	30	0.00	-1.12	-0.03	0.06	-0.08

Metabolismo

Aminoácidos	TrEST-A2908	Glycine cleavage system T protein (EAL90405) [A. fumigatus]	12	0.00	1.53	1.49	0.42	-2.30
	Trest-A3986	Probable carbamoyl-phosphate synthase large chain (CAE76486) [N. crassa]	15	0.00	0.07	0.78	0.64	-2.14
	Trest-A0061	Probable branched-chain aminoacids aminotransferase (CAC18611) [N. crassa]	16	0.00	0.30	0.43	-0.14	1.85
	Trest-A2767	Glutamine synthetase (Glutamateammonia ligase) (Q9UUN6) [N. haematococca]	16	0.00	-0.37	-0.09	0.50	1.03
	Trest-A0359	Cystathionine beta-synthase (AAM73774) [M. grisea]	19	0.00	-1.21	-0.89	-1.06	0.19
	Trest-A4205	Probable glycine decarboxylase P subunit (CAE76410) [N. crassa]	19	0.00	-0.87	-0.93	-1.38	-0.36
	TrEST-B21C05	Cobalamin-independent methionine synthase (AAF82115) [A. nidulans]	19	0.00	-1.11	-1.71	-1.18	-0.39
	Trest-A3669	2-Isopropylmalate synthase (EAL90831) [A. fumigatus]	20	0.00	-0.86	-1.08	-0.92	-0.65
	Trest-A2564	4-Aminobutyrate (GABA) aminotransferase (EAL91927) [A. fumigatus]	22	0.00	-0.31	-2.07	-2.53	-1.57
	Trest-A0758	Probable glycine decarboxylase P subunit (CAE76410) [N. crassa]	23	0.00	-1.01	-1.47	-1.58	-0.29
	Trest-A2162	Putative aspartate transaminase (EAL93260) [A. fumigatus]	23	0.00	-0.40	-1.95	-1.85	-0.31
	TrEST-B34E01	Argininosuccinate synthase (EAL87525) [A. fumigatus]	23	0.00	-0.21	-1.74	-2.56	0.48
	TrEST-B33G12	Putative thiosulfate sulfurtransferase (EAL84757) [A. fumigatus]	28	0.00	-1.68	-2.16	-1.21	0.96
	Trest-A1230	Putative serine hydroxymethyltransferase, mitochondrial (Q7S5N8) [N. crassa]	29	0.00	-1.86	-1.55	-0.38	0.11
	Trest-A0127	S-Adenosylmethionine synthetase (XP_331856) [N. crassa]	30	0.00	-1.11	-0.72	-0.04	0.71
Cofatores	TrEST-B18C03	Cl tetrahydrofolate synthase (Cl-THFS) (EAL92712) [A. fumigatus]	20	0.00	-1.19	-1.24	-1.05	-0.97
Energia e ciclo de Krebs	Trest-A0519	Putative DER1 protein (EAL85573) [A. fumigatus]	8	0.00	0.84	1.00	1.13	-1.11
	TrFUM	Fumarase [T. reesei]	8	0.00	1.26	1.46	0.86	-0.77
	TrEST-B22D03	Succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit (EAL92794) [A. fumigatus]	10	0.00	0.72	1.14	-0.12	0.12
	TrND2	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 2 (AAL74165) [T. reesei]	13	0.00	1.18	-0.29	0.12	-0.90
	TrND4	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 4 (AAL74179) [T. reesei]	15	0.00	0.56	-0.09	-0.02	-1.90
	TrEST-B27F10	Cytochrome c heme lyase (Holocytochrome-C synthase) (P14187) [N. crassa]	16	0.00	0.22	0.39	0.72	1.46
	Trest-A2387	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase (AAX07694) [M. grisea]	17	0.00	0.23	-0.19	-0.09	-1.04

Metabolismo

Energia e ciclo de Krebs	Trest-A2977	Putative pyruvate decarboxylase (Q09737) [S. pombe]	17	0.00	-0.14	-0.39	-0.47	-1.64
	Trest-A3975	Alternative oxidase precursor (ALTOX) (Q01355) [N. crassa]	17	0.00	-0.02	0.14	-0.60	-1.66
	TrND1	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 1 (AAL74169) [T. reesei]	17	0.00	0.05	-0.22	-0.05	-1.00
	TrND5	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 5 (AAL74164) [T. reesei]	17	0.00	0.14	-0.31	0.01	-1.35
	TrND6	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 6 (AAL74172) [T. reesei]	17	0.00	-0.26	-0.94	-0.81	-1.32
	Trest-A0264	Aldehyde dehydrogenase (ALDDH) (P42041) [A. alternata]	19	0.00	-1.09	-1.50	-0.54	-0.50
	Trest-A0593	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EAA73638) [G. zeae]	19	0.00	-0.82	-1.20	-0.88	-0.34
	Trest-A2300	ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor (P37211) [N. crassa]	19	0.00	-1.34	-1.21	-0.91	-0.11
	TrEST-B14A01	ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (P23704) [N. crassa]	19	0.00	-0.87	-1.14	-0.83	-0.18
	TrEST-B27G05	NADH-ubiquinone oxidoreductase 78 kDa subunit (EAA74075) [G. zeae]	19	0.00	-1.38	-1.48	-0.87	-0.17
	TrALD2	Aldehyde dehydrogenase 2 [T. reesei]	20	0.00	-0.93	-1.37	-0.47	-0.80
	Trest-A0954	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing (EAL86477) [A. fumigatus]	21	0.00	-0.78	-1.18	-1.29	-2.99
	Trest-A3734	Flavohemoglobin (BAA33011) [F. oxysporum]	21	0.00	0.26	-1.89	-2.42	-2.36
	Trest-A2353	Acetyl-coenzyme A synthetase (AcetateCoA ligase) (P16929) [N. crassa]	25	0.00	-0.77	-1.02	-0.73	0.54
	TrEST-B16G08	ATP citrate lyase, subunit 2 (CAB76164) [S. macrospora]	25	0.00	-1.32	-1.36	-0.46	0.71
	TrSUCCOA	Succinyl-CoA synthetase [T. reesei]	25	0.00	-1.08	-1.68	-1.00	0.69
	TrYGR	Succinyl-CoA synthetase [T. reesei]	25	0.00	-0.94	-1.92	-1.07	0.70
	Trest-A3742	Cytochrome c oxidase polypeptide VIb () [A. fumigatus]	30	0.00	-1.02	-0.58	-0.20	0.56
Gliconeogênese	TrPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [T. reesei]	15	0.00	0.37	0.29	-0.02	-1.61
Lipídeos	Trest-A3347	Phospholipase D (BAC67175) [E. nidulans]	5	0.00	1.52	2.23	1.68	-1.02
	TrEST-A1254	Oxysterol binding protein-like protein (AAW69321) [M. grisea]	8	0.00	0.74	1.26	1.11	-0.41
	TrEST-A1896	Related to acyl-CoA thiolesterase (CAE76614) [N. crassa]	9	0.00	0.29	1.16	1.13	0.42
	TrEST-B22D08	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (Q12577) [G. fujikuroi]	9	0.00	1.06	1.52	1.07	0.66
	Trest-A4057	Related to SREBP cleavage activating protein (CAB88621) [N. crassa]	12	0.00	1.09	1.13	1.07	-2.42
	TrEST-A4208	Related to fatty acid hydroxylase (CAD21081) [N. crassa]	14	0.00	-0.19	0.95	0.89	-1.04
	TrEST-B25B12	Putative phospholipase D (PLD) (EAL93951) [A. fumigatus]	17	0.00	-0.20	-0.70	-0.34	-1.19
	TrEST-A4222	Short chain dehydrogenase/reductase family (EAL84601) [A. fumigatus]	18	0.00	-0.31	-0.47	-1.08	0.12
	Trest-A0439	Epoxide hydrolase (AAM77995) [S. carzinostaticus]	20	0.00	-0.71	-0.84	-1.01	-0.94
	Trest-A1302	Putative acyl-CoA dehydrogenase (EAL89939) [A. fumigatus]	23	0.00	-0.69	-1.44	-1.97	0.13
	Trest-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha (P15368) [P. griseofulvum]	25	0.00	-0.82	-1.48	-0.29	0.51
	TrEST-A1958	Related to sphingoid base-phosphate phosphatase (CAD21069) [N. crassa]	29	0.00	-1.96	-2.02	-1.13	0.55
	Trest-A0634	Oleate delta-12 desaturase (AAG36933) [E. nidulans]	30	0.00	-1.24	-0.73	0.50	0.89
	Trest-A4303	Oleate delta-12 desaturase (BAD04850) [A. oryzae]	30	0.00	-1.99	-1.37	0.37	0.79
Nucleotídeos	Trest-A2852	Allantoinase (EAL87322) [A. fumigatus]	7	0.00	1.66	2.15	1.38	-0.17
	Trest-A3683	Phosphoribosylformylglycinamidine synthase (EAL86032) [A. fumigatus]	18	0.00	0.14	-1.05	-1.12	-0.17
	Trest-A0752	Uricase (BAB18098) [T. inflatum]	23	0.00	-0.53	-1.59	-1.45	-0.32
	Trest-A3190	Orotidine 5'-phosphate decarboxylase (UMP synthase) (P21594) [H. jecorina]	24	0.00	-2.43	-2.91	-2.35	-0.08
	TrURA3	Orotidine-5'-phosphate decarboxylase (X55880) [T. reesei]	24	0.00	-2.26	-2.72	-2.29	0.03
	Trest-A3972	Adenylosuccinate synthetase (AAL56637) [E. nidulans]	25	0.00	-0.22	-0.91	-0.68	1.08
	Trest-A3570	Adenylosuccinate lyase (Adenylosuccinase) (Q05911) [S. cerevisiae]	26	0.00	-1.18	-2.13	-1.26	0.94
	Trest-A0026	Putative inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EAL87456) [A. fumigatus]	30	0.00	-1.07	-0.37	0.31	0.78
Açúcares e glicólise	TrEST-A1935	NADP(+)-dependent glycerol dehydrogenase (CAD42649) [E. nidulans]	3	0.00	2.77	3.37	3.21	-0.12
	TrEST-A3541	L-xylulose reductase (Q8NK50) [H. jecorina]	3	0.00	2.01	3.61	4.11	-1.52
	TrGPD	Glycerophosphate dehydrogenase [T. reesei]	5	0.00	0.91	2.86	2.47	-1.53
	TrEST-A1305	Fructose-1,6-biphosphate aldolase (AAL34519) [P. brasiliensis]	8	0.00	1.16	1.53	1.32	-1.03
	Trest-A4093	Probable transaldolase (T43036) [S. pombe]	8	0.00	0.69	0.76	1.07	-0.97

Metabolismo

Açúcares e glicólise	TrFBA	Fructose-1,6-bisphosphate aldolase [T. reesei]	8	0.00	1.13	1.50	1.36	-1.11
,	TrTAL	Transaldolase [T. reesei]	8	0.00	0.60	0.86	1.23	-0.84
	TrEST-A2041	Probable transketolase (CAC18218) [N. crassa]	9	0.00	0.15	0.56	1.46	-0.30
	Trest-A4206	Triosephosphate isomerase (TIM) (Q7S2Z9) [N. crassa]	9	0.00	0.36	0.94	1.24	-0.20
	TrTPI	Triosephosphate isomerase [T. reesei]	9	0.00	0.36	0.95	1.30	-0.05
	TrEST-A0613	Xylitol dehydrogenase (AAO42466) [H. jecorina]	12	0.00	1.10	0.98	0.88	-2.20
	TrGUT	Glycerol kinase [T. reesei]	13	0.00	0.58	0.12	0.24	-1.31
	TrEST-A3061	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (AAP13543) [C. bassiana]	14	0.00	0.21	0.12	0.54	-1.20
	TrPFK	Phosphofructokinase [T. reesei]	14	0.00	0.05	0.86	0.63	-1.23
	TrTKL	Transketolase [T. reesei]	14	0.00	0.10	0.57	1.40	-0.73
	Trest-A0705	L-xylulose reductase (Q8NK50) [H. jecorina]	17	0.00	-0.32	-0.05	-0.08	-1.27
	TrEST-B09F02	6-Phosphogluconate dehydrogenase (BAC06328) [A. oryzae]	17	0.00	-0.11	-0.41	0.09	-1.24
	Trest-B34E03	Alpha-mannosidase IC (AAG18507) [E. nidulans]	19	0.00	-1.87	-0.88	-1.14	0.07
	Trest-A2258	Endochitinase class V precursor (AAL84699) [H. virens]	21	0.00	-0.23	-0.53	-0.75	-3.16
	Trest-A2626	Putative Xu-5-p / Fru-6-P phosphoketolase (AAW46259) [C. neoformans]	21	0.00	-0.78	-1.60	-1.54	-2.09
	Trest-A0086	Related to beta-1, 3 exoglucanase precursor (CAC18170) [N. crassa]	25	0.00	-0.85	-1.70	-1.29	1.15
	Trest-A0750	Xylosidase / arabinosidase (AA076888) [B. thetaiotaomicron]	26	0.00	-1.21	-2.48	-1.74	0.99
	TrPK11	Pyruvate kinase (L07060) [T. reesei]	29	0.00	-1.47	-2.35	-1.34	0.27
	Trest-A0075	Putative malate dehydrogenase (EAL84651) [A. fumigatus]	30	0.00	-1.28	-0.42	-0.25	0.63
Transporte	Trest-A3927	Putative MFS transporter (EAL85184) [A. fumigatus]	6	0.00	2.22	2.12	1.90	0.78
	Trest-A1813	Related to PalI protein (Q9P6T5) [N. crassa]	11	0.00	2.49	2.89	2.00	-2.49
	Trest-A3656	Putative transmembrane transporter (NP_595211) [S. pombe]	12	0.00	1.01	1.12	1.07	-1.71
	Trest-A2756	Putative MSF transporter (EAL88366) [A. fumigatus]	13	0.00	0.82	0.20	0.29	-1.51
	Trest-A1790	MFS phospholipid transporter (Git1), putative (EAL88628) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.16	-0.64	-1.05	0.24
	Trest-A1842	ADP,ATP carrier protein (P02723) [N. crassa]	19	0.00	-1.41	-1.14	-0.63	0.20
	Trest-B06E06	MSTA protein (CAC80843) [E. nidulans]	22	0.00	-1.62	-2.60	-2.23	-1.28
	Trest-A0087	Putative MFS transporter (EAL85766) [A. fumigatus]	23	0.00	-1.37	-1.73	-1.83	0.14
	Trest-A0714	HEX1 (AAQ56234) [H. jecorina]	23	0.00	-0.88	-2.39	-2.29	0.34
	Trest-A1956	Putative mitochondrial ABC-type iron exporter (Atml)(EAL89127) [A. fumigatus]	23	0.00	-0.69	-1.75	-1.93	0.11
	Trest-A1178	Protein transport protein Sec13 (P53024) [P. pastoris]	25	0.00	-0.60	-1.17	-0.62	0.88
	Trest-A0793	Putative peptide transporter (CAD27303) [A. fumigatus]	28	0.00	-1.82	-1.84	-1.57	0.78
	Trest-A0901	Metalloreductase (EAL85037) [A. fumigatus]	28	0.00	-2.07	-1.73	-1.41	1.61
	Trest-A3556	Putative MFS transporter (EAL84203) [A. fumigatus]	29	0.00	-1.71	-2.27	-1.41	0.36
	Trest-B35E06	Putative siderochrome-iron transporter (Sitl) (EAL86866) [A. fumigatus]	30	0.00	-1.34	-0.18	0.04	0.92
Síntese Protéica								
Modificações pós-traducionais e enderecamento	Trest-A0636	Polyubiquitin 5 (UQBY) [S. cerevisiae]	7	0.00	1.96	1.51	0.91	0.20
3	Trest-A4257	41 kDa peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Rotamase) (09P3X9) [N. crassa]	7	0.00	1.44	1.59	0.94	0.16
	Trest-A3488	Putative protein-vacuolar targeting-related protein (AAW40887) [C. neoformans]	12	0.00	0.86	1.47	1.16	-2.15
	Trest-A0364	Putative coatomer subunit zeta (EAL93214) [A. fumigatus]	15	0.00	0.23	-0.09	0.16	-2.33
	Trest-A1647	hnRNP arginine n-methyltransferase (EAL88330) [A. fumigatus]	16	0.00	-0.41	-0.45	-0.26	1.30
	Trest-A3157	Protein transport protein Sec24, putative (EAL89123) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.21	-1.19	-1.48	-0.20
	Trest-A0205	Nuclear transport factor 2 (AAK71467) [A. nidulans]	25	0.00	-0.82	-1.05	-0.40	0.99
	TrEST-A1149	Putative endosomal cargo receptor (P24) (EAL90474) [A. fumigatus]	25	0.00	-1.18	-1.74	-1.08	0.84
			==		-			

Síntese Protéica

Modificações pós-traducionais e endereçamento	Trest-A3562	Protein mannosyltransferase 1 (EAL92923) [A. fumigatus]	29	0.00	-1.39	-1.52	-1.33	0.51
	TrEST-A1274	Putative serine palmitoyltransferase 2 (EAL90517) [A. fumigatus]	30	0.00	-1.41	-0.67	-0.66	0.27
Degradação protéica	Trest-A4209	26S proteasome regulatory subunit-like protein (AAW69328) [M. grisea]	6	0.00	2.80	2.97	1.52	-0.84
	Trest-A4200	Subtilisin-like protease PR1D (CAB89873) [M. anisopliae]	8	0.00	0.95	1.24	1.12	-0.46
	TrEST-A2912	Aminopeptidase (EAL89884) [A. fumigatus]	12	0.00	0.83	0.81	0.73	-1.98
	Trest-A0738	Putative methionine aminopeptidase, type I (EAL85121) [A. fumigatus]	17	0.00	0.15	0.12	-0.22	-1.00
	TrEST-A1821	Autophagy-related ubiquitin-like modifier Atg-8 (Q8WZY7) [N. crassa]	17	0.00	-0.17	-0.02	0.13	-1.29
	Trest-A0595	Subtilisin-like serine protease PR1H (CAC95047) [M. anisopliae]	20	0.00	-1.66	-1.34	-0.89	-1.13
	TrEST-B07H02	Serine protease 2 (CAC85639) [P. brassicae]	20	0.00	-0.96	-1.24	-0.95	-1.05
	Trest-A3560	Aspartic protease (BAC00848) [A. oryzae]	24	0.00	-1.89	-3.24	-2.49	0.28
	TrEST-A4172	Related to endosomal Vps protein complex subunit (CAD21186) [N. crassa]	25	0.00	-1.09	-1.54	-1.34	1.32
	TrEST-A4013	Serine-type carboxypeptidase homolog precursor (JC7666) [E. nidulans]	29	0.00	-1.18	-1.95	-1.00	0.06
Proteínas ribossomais	Trest-A2562	40S ribosomal protein S2-like protein (AAX07689) [M. grisea]	3	0.00	1.85	3.55	4.09	-1.00
	Trest-A0510	Mitochondrial ribosomal protein L2 (EAL89576) [A. fumigatus]	5	0.00	1.80	2.59	2.07	-0.16
	TrEST-B15D12	60S ribosomal protein L27 (EAL88345) [A. fumigatus]	6	0.00	2.71	2.84	1.54	0.05
	Trest-B06A02	Cytosolic small ribosomal subunit S15 (EAL86942) [A. fumigatus]	9	0.00	0.39	0.49	1.60	0.26
	Trest-A2975	40S ribosomal protein S3a (AAT81418) [F. catus]	12	0.00	0.86	1.02	0.93	-1.79
	Trest-A2605	Putative cytosolic large ribosomal subunit L11 (EAL90014) [A. fumigatus]	13	0.00	0.56	0.65	0.25	-1.52
	Trest-A2519	Putative mitochondrial 60S ribosomal protein L15 (EAL90522) [A. fumigatus]	16	0.00	-0.28	-0.57	0.08	1.03
	Trest-A4274	Related to mitochondrial 60S ribosomal protein L5 (CAD11403) [N. crassa]	16	0.00	-0.35	0.37	0.39	1.07
	TrEST-B12E02	60s ribosomal protein L7 subunit (NP_594185) [S. pombe]	16	0.00	-0.28	-0.06	-0.11	1.19
	Trest-A0252	60s ribosomal protein 110a. (NP_587891) [S. pombe]	25	0.00	-0.58	-1.55	-0.90	1.52
	Trest-A0387	40S ribosomal S30/ubiquitin fusion (EAL85794) [A. fumigatus]	25	0.00	-1.08	-1.22	-1.00	0.82
	Trest-A4073	60S ribosomal protein L23-like protein (AAX07639) [M. grisea]	25	0.00	-0.93	-0.66	-0.08	1.25
	TrEST-B08A11	40S ribosomal protein S7 (XP_322344) [N. crassa]	25	0.00	-1.00	-1.22	-0.68	1.47
	TrEST-B08C11	60S ribosomal protein L27a (L29) (EAA78050) [G. zeae]	25	0.00	-0.72	-1.23	-0.79	1.15
	TrEST-B44H09	60S ribosomal protein L23-like protein (AAX07700) [M. grisea]	25	0.00	-1.10	-0.91	-0.57	1.36
	Trest-A0632	40S ribosomal protein S9 (EAL93345) [A. fumigatus]	26	0.00	-1.69	-2.51	-1.24	1.42
	Trest-A0681	60S ribosomal protein L3 (P59671) [N. crassa]	26	0.00	-0.94	-2.91	-1.43	1.22
	Trest-A0866	60s ribosomal protein 12 (EAL86003) [A. fumigatus]	26	0.00	-0.96	-2.79	-1.73	0.59
	Trest-A1100	60S ribosomal protein L17 (XP_323005) [Neurospora crassa]	26	0.00	-1.28	-2.43	-1.19	1.25
	Trest-A1150	Probable 40s ribosomal protein S6.e, cytosolic [N. crassa]	26	0.00	-1.51	-2.97	-1.38	1.31
	TrEST-A1638	60S ribosomal protein Srp1 (AAP58401) [S. sclerotiorum]	26	0.00	-1.47	-2.44	-1.52	1.40
	Trest-A1844	60S ribosomal protein L32 (EAL93935) [A. fumigatus]	26	0.00	-1.73	-3.07	-1.31	1.59
	Trest-A2322	40S ribosomal protein S9 (S7) (EAA70965) [G. zeae]	26	0.00	-1.62	-2.43	-1.39	1.25
	Trest-A2663	60S ribosomal protein L13 (090YV5) [I. pu]	26	0.00	-1.23	-2.71	-1.34	1.61
	Trest-A2843	40S ribosomal protein S4 (S7) (059950) [Y. lipolytica]	26	0.00	-1.44	-2.73	-1.38	1.62
	Trest-A2850	Homology to 60S ribosomal protein L18 (NP 014098) [S. cerevisiae]	26	0.00	-1.24	-2.56	-1.29	1.68
	Trest-A2862	60S ribosomal protein L19B (NP 587807) [S. pombe]	26	0.00	-1.54	-2.59	-1.47	1.07
	Trest-A3403	40s ribosomal protein S10a (EAL89106) [A. fumigatus]	26	0.00	-1.21	-2.20	-1.20	1.27
	TrEST-A3413	Homology to 60S ribosomal protein L14 (L23) (NP 009466) [S. cerevisiae]	26	0.00	-1.57	-2.69	-0.96	1.54
	Trest-A3432	60s ribosomal protein 12 (NP 595879) [S. pombe]	26	0.00	-0.88	-2.74	-1.73	0.87
	Trest-A3445	40S ribosomal protein S5 (XP 329834) [N. crassa]	26	0.00	-1.30	-2.86	-1.15	1.26
	Trest-A3455	60S acidic ribosomal protein P2 (P42037) [A. alternata]	26	0.00	-1.49	-2.80	-1.84	1.56
	Trest-A3716	60S ribosomal protein L3 (AF198447) [E. pidulans]	26	0.00	-0,86	-2.51	-1.39	1.38
		······································	20					

Síntese Protéica

Proteínas ribossomais	Trest-A4246	40S ribosomal protein S9 (S16) (EAL93345) [A. fumigatus]	26	0.00	-1.78	-2.73	-1.30	1.39
	TrEST-A4260	60S ribosomal protein L15 (XP_328215) [N. crassa]	26	0.00	-1.19	-3.16	-1.50	1.18
	TrEST-B12D07	Homology to 60S ribosomal protein L18a (NP_013969) [S. cerevisiae]	26	0.00	-1.34	-2.19	-1.14	1.24
	TrEST-B16E02	40S ribosomal protein S26E (CRP5) (P21772) [N. crassa]	26	0.00	-1.73	-2.75	-1.46	1.20
	TrEST-B25E08	60S acidic ribosomal protein PO (Q96TJ5) [N. crassa]	26	0.00	-0.75	-2.73	-1.86	0.82
	Trest-A0553	Probable 60S ribosomal protein L22 (CAD70890) [N. crassa]	27	0.00	-2.10	-3.22	-2.17	1.09
	Trest-A0689	60S ribosomal protein L34-B-like protein (AAX07647) [M. grisea]	27	0.00	-1.83	-2.96	-1.51	1.01
	TrEST-A0712	60S ribosomal protein L44 (L41) (P52809) [P. ja]	27	0.00	-1.79	-2.78	-1.55	1.02
	Trest-A0756	60S ribosomal protein L31e (EAL89163) [A. fumigatus]	27	0.00	-2.02	-2.75	-1.42	0.92
	TrEST-A2163	40S ribosomal protein S23 (Q9HE74) [N. crassa]	27	0.00	-1.98	-2.88	-1.51	0.94
	Trest-A3248	40S ribosomal protein S18-like protein (AAX07649) [M. grisea]	27	0.00	-2.01	-3.13	-1.48	1.03
	Trest-A3483	40S ribosomal protein S12 (XP_326287) [N. crassa]	27	0.00	-2.33	-3.33	-1.71	1.23
	Trest-A3506	Similar to 60S ribosomal protein L12 (XP_231785) [R. norvegicus]	27	0.00	-2.68	-3.59	-1.43	1.46
	Trest-A4084	60S ribosomal protein L14-A-like protein (AAW69343) [M. grisea]	27	0.00	-2.17	-3.41	-1.76	1.03
	Trest-A4086	60S ribosomal protein L33-A (L37A) (Q9USX4) [S. pombe]	27	0.00	-2.16	-3.40	-1.54	0.92
	TrEST-A4138	60S ribosomal protein L37 (Q9C0T1) [E. nidulans]	27	0.00	-1.72	-3.52	-1.91	0.95
	TrEST-A4225	Probable 60S ribosomal protein L26 (CAD21040) [N. crassa]	27	0.00	-2.29	-3.12	-1.65	1.05
	TrEST-B17H01	Cytosolic 60S ribosomal protein L30 (EAL93216) [A. fumigatus]	27	0.00	-2.43	-2.69	-1.41	1.04
	TrEST-A0192	40S ribosomal protein S21 (CRP7)(XP_329751) [N. crassa]	28	0.00	-2.05	-2.31	-1.46	1.36
	TrEST-A2015	60s ribosomal protein 17-c. (NP_595736) [S. pombe]	28	0.00	-1.69	-2.10	-1.00	1.60
	TrEST-A2187	60S ribosomal protein L39 (Q6BHV8) [D. hansenii]	28	0.00	-1.68	-1.97	-1.12	1.03
	TrEST-B14B08	40S RIBOSOMAL PROTEIN S19 (S16) (gb EAA67435.1) [G. zeae]	28	0.00	-1.71	-2.31	-1.31	1.68
	TrEST-B33G02	40S ribosomal protein S24 (P14249) [R. ra]	28	0.00	-1.89	-2.58	-1.21	1.43
	TrEST-B37B02	60S ribosomal protein L36 (Q9HFR7) [T. hamatum]	28	0.00	-1.75	-2.05	-1.28	1.49
	Trest-A3679	60S ribosomal protein L16 (EAA69730) [G. zeae]	29	0.00	-1.42	-1.85	-1.36	0.08
Fatores de tradução	Trest-A4195	Translation initiation factor SUI1 (EAL92942) [A. fumigatus]	7	0.00	1.07	1.49	1.13	0.04
	TrEST-B39B11	Probable translation elongation factor EF-Tu (CAC28833) [N. crassa]	10	0.00	1.20	-0.22	0.29	0.08
	TrEST-A3815	Translation Elongation factor 2 (EAA77131) [G. zeae]	19	0.00	-1.06	-1.40	-0.65	-0.35
	TrEST-A1154	Related to eIF3 subunit (CAE85545) [N. crassa]	25	0.00	-0.58	-1.22	-0.59	1.45
	TrEST-B23G07	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (eRF1)(EAA76974) [G. zeae]	25	0.00	-0.76	-1.32	-0.60	1.37
	TrEST-A1025	Putative eIF3 subunit EifCe (EAL92445) [A. fumigatus]	29	0.00	-1.58	-1.31	-0.60	0.75
	Trest-A3737	Eukaryotic translation initiation factor 6 (NP_588491) [S. pombe]	29	0.00	-2.20	-1.01	-1.44	-0.09
	TrEST-A1781	eIF3 subunit 6 interacting protein-like protein (AAX07645) [M. grisea]	30	0.00	-1.12	-1.04	-0.14	0.45
Síntese e metabolismo de tRNAs	Trest-A3740	Related to mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase (CAB91431) [N. crassa]	7	0.00	1.22	1.47	1.02	0.00
	Trest-A4154	Putative aspartatetRNA ligase (AAW44431) [C. neoformans]	12	0.00	1.85	2.42	0.77	-1.60
Síntese de RNA								
RNA polimerase	Trest-A3721	Related to DNA-directed RNA polymerase 13.3kDa chain (CAC28816) [N. crassa]	25	0.00	-1.07	-1.23	-0.84	1.02
Processamento de RNAs	TrEST-A4171	Probable component of the U3 small nucleolar RNP (CAC18315) [N. crassa]	17	0.00	-0.40	-0.27	-0.52	-1.16
	TrEST-A1624	rRNA intron-encoded homing endonuclease (AAK13589) [O. sativa]	30	0.00	-1.35	-0.49	-0.75	0.61
Fatores transcricionais	Trest-A0638	Putative C2H2 finger domain protein (EAL89750) [A. fumigatus]	10	0.00	1.47	0.90	0.10	0.08
	Trest-A3675	Multiprotein bridging factor (Q53IP3) [G. fujikuroi]	10	0.00	0.93	1.14	0.09	-0.18
	Trest-A1599	Sulfur metabolite repression control protein (EAA58743) [A. nidulans]	17	0.00	-0.28	-0.61	-0.56	-1.53
	Trest-A3454	Transcription factor HACI (CAC88374) [H. jecorina]	17	0.00	-0.35	-0.09	0.10	-1.07
	Trest-A3379	pH-response transcription factor pacC/RIM101 (Q96X49) [A. chrysogenum]	19	0.00	-0.95	-0.86	-1.25	0.08

Síntese de RNA								
Fatores transcricionais	Trest-A4080	Transcription factor PacC (CAD55803) [G. fujikuroi]	19	0.00	-1.63	-1.00	-1.49	0.21
	Trest-A3600	Transcription factor [H. jecorina]	26	0.00	-1.33	-2.71	-1.41	1.44
	Trest-A3522	Related to the component Tral of the SAGA complex (CAC18279) [N. crassa]	30	0.00	-1.09	-0.71	-0.44	0.39
	Trest-A4069	Related to transcription activator amyR (CAC28588) [N. crassa]	30	0.00	-1.26	0.08	0.00	0.06
Não-classificada								
Outros genes	Trest-A1904	Integral membrane protein [A. fumigatus]	3	0.00	2.24	3.59	3.08	-0.23
	TrEST-A2106	Putative glycosyl transferase (EAL86644) [A. fumigatus]	7	0.00	0.97	1.70	1.10	-0.29
	TrEST-A3021	Ypt-interacting protein yop-1 (Q871R7) [N. crassa]	7	0.00	1.06	1.82	1.79	-0.70
	TrEST-A3544	Sncl gene product (AAT78419) [H. jecorina]	7	0.00	1.52	1.94	1.35	-0.21
	TrEST-A4002	Related to membrane protein (CAC18292) [N. crassa]	7	0.00	1.59	1.60	2.02	0.46
	TrEST-A1902	Aldo/keto reductase family oxidoreductase (NP_594384) [S. pombe]	9	0.00	0.58	1.17	1.09	0.40
	TrEST-A3405	Putatuve phosphoketolase (AAW46259) [C. neoformans var. neoformans]	9	0.00	0.65	1.03	0.73	-0.36
	TrEST-A0888	Exostosin-3 (Q9XZ08) [D. melanogaster]	10	0.00	1.14	0.90	0.42	-0.16
	TrEST-A1116	Nonribosomal peptide synthetase; NRPS (AAM78457) [H. virens]	12	0.00	1.13	1.36	1.24	-1.64
	TrEST-A2617	Integral membrane protein (EAL88317) [A. fumigatus]	12	0.00	1.08	1.38	0.74	-1.50
	TrEST-A2823	Putative short-chain oxidoreductase family protein (EAL85687) [A. fumigatus]	13	0.00	0.59	0.02	0.12	-1.42
	TrEST-A4264	Related to ATROPHIN-1 (CAD21224) [N. crassa]	14	0.00	-0.49	0.77	0.64	-1.07
	TrEST-A0909	Clock-controlled gene-9 protein (AAC64285) [N. crassa]	15	0.00	0.09	0.01	0.06	-1.94
	TrEST-A0020	WD repeat protein (EAL90030) [A. fumigatus]	16	0.00	0.04	-0.15	0.03	1.04
	TrEST-A4055	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial (P38674) [N. crassa]	16	0.00	-0.04	-0.01	0.04	1.04
	TrTRS1	Trichoderma reesei DNA fragment trs1 (Y14562) [T. reesei]	17	0.00	0.25	-0.17	-0.07	-1.58
	TrEST-A0034	Probable gamma-adaptin precursor (CAC28785) [N. crassa]	19	0.00	-0.94	-1.25	-0.55	-0.21
	TrEST-A1949	FAD-dependent oxidoreductase-like protein (AAX07713) [M. grisea]	19	0.00	-1.06	-1.09	-1.00	0.21
	TrEST-B06D08	Aminotransferase class V (EAL90276) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.31	-1.39	-0.70	-0.10
	TrEST-A0174	Phosphoketolase (ZP_00032418) [B. fungorum]	20	0.00	-0.81	-1.31	-1.28	-1.58
	TrEST-A2502	CAP20-like protein (AAK69534) [B. graminis]	20	0.00	-1.04	-0.67	-0.58	-0.81
	TrEST-B42E12	Related to SCJ1 protein (CAD70988) [N. crassa]	20	0.00	-1.26	-1.13	-1.55	-0.90
	TrEST-A2337	Topisomerase II associated protein Patl homolog (EAL91531) [A. fumigatus]	22	0.00	-1.50	-1.60	-1.91	-1.04
	TrEST-A2655	Zinc binding dehydrogenase family protein (EAL90771) [A. fumigatus]	23	0.00	-0.42	-1.22	-1.48	0.02
	TrEST-A3183	Beta-1,3-glucanosyltransferase (AAP91684) [P. brasiliensis]	23	0.00	-0.69	-1.25	-1.61	-0.04
	TrEST-A0728	EsdC protein, required for sexual development (AAM95965) [A. nidulans]	24	0.00	-1.92	-2.60	-2.44	-0.16
	TrEST-B33F12	Probable membrane protein YMR292w (Q03554) [S. cerevisiae]	25	0.00	-0.56	-0.89	-0.35	1.13
	TrEST-A3592	Stomatin-like protein (BAB68403) [G. fujikuroi]	26	0.00	-1.55	-2.86	-1.93	1.42
	TrEST-A3941	Putative mitochondrial DNA replication protein (EAL85883) [A. fumigatus]	28	0.00	-2.20	-2.11	-1.33	1.34
	TrEST-A2501	DUF895 domain membrane protein (EAL85180) [A. fumigatus]	29	0.00	-1.79	-1.42	-0.59	0.33
	Trest-A3687	Related to rasp f 7 allergen (CAD70798) [N. crassa]	29	0.00	-2.00	-2.00	-0.78	-0.67
	Trest-A0922	Haemolysin-III family protein (EAL92524) [A. fumigatus]	30	0.00	-0.62	-1.13	0.05	-0.11
<u>Desconhecida</u>								
Relacionados a ORFs previstas	Trest-A0030	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.31	3.65	3.56	-0.45

lacionados a ORFs previstas	TrEST-A0030	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.31	3.65	3.56	-0.45
	Trest-A0317	Putative protein (CAD71042) [N. crassa]	3	0.00	2.48	3.56	3.49	-0.64
	Trest-A0437	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.28	3.69	3.61	-0.44
	TrEST-A0491	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	3	0.00	2.32	3.67	3.61	-0.62

Função	Clone ID & Ide	entificação	Grupo	0 min	15 min	30 min	60 min	120 min
Relacionados a OREs previstas	₩~₽९₩_እበ5.25	Woothatical protain MC00777 4 (FAR40119) [M. grigas]	3	0.00	2 10	3 69	3 59	-0.63
	Trest_10525	Wrothetical protein MG00777 4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.13	3.62	3.63	-0.62
	TrEST-A0555	Hypothetical protein MG00777 4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.38	3.68	3.57	-0.62
	TrEST_A0555	Hypothetical protein MG00777 4 (EAA49119) [M. grisca]	3	0.00	2.00	3.42	3.33	0.02
	Trest-10860	Wrothetical protein MG00777 4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.00	3.65	3.62	-0.63
	Trest-A0000	Hypothetical protein MG00777 ((EAA49119) [M. grisca]	3	0.00	2.27	3.00	3.57	-0.03
	Trest-A1000	Hypothetical protein MG00777 ((EAA49119) [M. grisca]	3	0.00	2.20	3.72	3.64	-0.52
	TIESI-A1020	Nypothetical protein MG00777.4 (EAA9119) [M. grisea]	3	0.00	2.20	2.72	3.04	-0.30
	Trest-Aluza	Hypothetical protein MG00///.4 (EAA49119) [M. grisea]	о С	0.00	2.23	3.71	3.02	-0.49
	Trest-Allel	Hypothetical protein FG09906.1 (EAA/0132) [G. zeae]	о С	0.00	2.10	3.72	3.04	-0.30
	Trest-A1238	Hypothetical protein FG09906.1 (EAA/0132) [G. zeae]	3	0.00	2.22	3.73	3.47	-0.43
	Trest-A1353	Hypothetical protein MG00/77.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.40	3.57	3.58	-0.58
	Trest-A2567	Hypothetical protein MGUU777.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.29	3.67	3.57	-0.62
	TrEST-A2854	Hypothetical protein MG00'/'/.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	1.95	3.35	3.21	-0.53
	TrEST-A2904	Predicted protein (XP_322451) [N. crassa]	3	0.00	2.72	3.81	3.71	-0.47
	TrEST-A3117	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.26	3.78	3.63	-0.38
	TrEST-A3146	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	3	0.00	2.32	3.77	3.58	-0.46
	TrEST-A3191	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	3	0.00	2.46	3.65	3.59	-0.59
	TrEST-A3794	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	3	0.00	2.44	3.76	3.65	-0.38
	TrEST-A1890	Hypothetical protein (XP_330348) [N. crassa]	5	0.00	1.73	2.42	2.06	-0.31
	TrEST-A2821	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	5	0.00	1.79	2.67	2.60	-0.66
	Trest-A3475	Hypothetical protein FG09623.1 (EAA76515) [G. zeae]	6	0.00	2.40	3.35	1.99	0.03
	TrEST-B12D05	Hypothetical protein FG01866.1 (EAA67401) [G. zeae]	6	0.00	2.26	2.82	1.84	0.17
	Trest-A0456	Hypothetical protein FG01141.1 (EAA68421) [G. zeae]	7	0.00	1.19	2.31	1.84	-0.10
	TrEST-A1887	Hypothetical protein FG08639.1 (EAA72667) [G. zeae]	7	0.00	0.60	1.79	1.71	-0.30
	TrEST-A1903	Hypothetical protein (XP_324032) [N. crassa]	7	0.00	1.28	1.79	1.46	-0.10
	TrEST-A1999	Hypothetical protein FG02234.1 (EAA69401) [G. zeae]	7	0.00	1.08	2.41	0.82	-0.31
	TrEST-A3946	Hypothetical protein FG10202.1 (EAA70045) [G. zeae]	7	0.00	1.06	1.96	1.74	-0.69
	TrEST-A1960	Hypothetical protein MG07171.4 (EAA56816) [M. grisea]	8	0.00	0.99	1.13	0.85	-0.79
	TrEST-A2415	Conserved hypothetical protein (CAC10089) [N. crassa]	8	0.00	1.18	1.50	0.82	-0.57
	TrEST-A2986	Hypothetical protein FG01026.1 (EAA67844) [G. zeae]	8	0.00	0.85	1.17	1.18	-0.34
	Trest-A3680	Predicted protein (XP_329164) [N. crassa]	8	0.00	0.89	1.00	0.55	-1.05
	Trest-A3747	Hypothetical protein FG07160.1 (EAA76619) [G. zeae]	8	0.00	1.23	1.89	1.43	-1.14
	Trest-A0007	Hypothetical protein FG07892.1 (EAA77264) [G. zeae PH-1]	9	0.00	0.79	1.37	1.37	0.27
	TrEST-A0021	Putative HAD superfamily hydrolase (EAL91771) [A. fumigatus]	9	0.00	0.09	1.35	0.67	-0.35
	TrEST-A1173	Hypothetical protein FG04053.1 (EAA70991) [G. zeae]	9	0.00	0.60	1.39	0.79	-0.35
	TrEST-A1229	Hypothetical protein MG06601.4 (EAA56630) [M. grisea]	9	0.00	0.34	1.14	1.14	0.48
	TrEST-A1637	Hypothetical protein FG02564.1 (EAA68807) [G. zeae]	9	0.00	0.32	0.93	1.02	0.07
	TrEST-A1863	Predicted protein (XP_330098) [N. crassa]	9	0.00	0.04	1.39	0.74	-0.22
	Trest-A2820	Hypothetical protein FG06701.1 (EAA76214) [G. zeae]	9	0.00	0.88	1.13	0.92	0.15
	Trest-A3491	Hypothetical protein FG04478.1 (EAA73262) [G. zeae]	9	0.00	0.52	1.23	1.26	-0.11
	Trest-A4005	Hypothetical protein MG01306.4 (EAA55655) [M. grisea]	9	0.00	0.59	1.50	1.05	0.00
	TrEST-B44F04	Hypothetical protein FG00434.1 (EAA68783) [G. zeae]	9	0.00	0.85	1.62	0.69	0.21
	Trest-A0369	Hypothetical protein FG01613.1 (EAA67539) [G. zeae]	10	0.00	0.48	1.04	0.43	-0.01
	Trest-A3480	Predicted protein (XP 324560) [N. crassa]	10	0.00	0.87	1.15	0.18	-0.05
	TrEST-A3646	Hypothetical protein FG08365.1 (EAA72153) [G. zeae]	10	0.00	1.01	0.97	0.79	-0.06
	TrEST-A2618	Hypothetical protein FG01267.1 (EAA70576) [G. zeae]	11	0.00	1.98	2.84	1.98	-3.97
	TrEST-A0684	Hypothetical protein FG06846.1 (EAA76368) [G. zeae]	12	0.00	0.96	1.73	1.00	-1.48
	TrEST-A1094	Hypothetical protein FG06539.1 (AA78324) [G. zeae]	12	0.00	0.86	1.46	1,22	-2.20
		······································						

Desconhecida

Relacionados a ORFs previstas	TrEST-A2606	Hypothetical protein MG07328.4 (EAA56973) [M. grisea]	12	0.00	1.49	2.27	1.36	-1.89
	TrEST-A2918	Hypothetical protein AN2628.2 (EAA62975) [A. nidulans]	12	0.00	1.05	1.23	1.19	-2.20
	Trest-A3377	Hypothetical protein MG05574.4 (EAA54783) [M. grisea]	12	0.00	0.80	1.48	1.25	-2.15
	TrEST-A3619	Hypothetical protein (XP_328245) [N. crassa]	12	0.00	1.17	1.35	1.20	-1.59
	TrEST-A3916	Hypothetical protein FG04153.1 (EAA70807) [G. zeae]	12	0.00	0.55	1.52	0.98	-1.62
	TrEST-A0532	Hypothetical protein FG06022.1 (EAA74132) [G. zeae]	13	0.00	0.50	0.02	0.06	-1.28
	TrEST-A2006	Hypothetical protein FG05186.1 (EAA73899) [G. zeae]	13	0.00	0.94	0.84	0.46	-1.20
	TrEST-A2386	Hypothetical protein FG04031.1 (EAA73499) [G. zeae]	13	0.00	0.75	0.18	0.25	-1.16
	TrEST-A2593	Predicted protein (XP_325742) [N. crassa]	13	0.00	0.85	0.31	0.28	-1.17
	Trest-A3430	Hypothetical protein FG02859.1 (EAA72359) [G. zeae]	13	0.00	1.62	-0.23	0.27	-0.72
	TrEST-A3621	Hypothetical protein FG00925.1 (EAA67702) [G. zeae]	13	0.00	0.78	0.82	0.38	-1.45
	TrEST-A0802	Predicted protein (XP_328533) [N. crassa]	14	0.00	-0.37	0.17	0.11	-1.23
	TrEST-A2812	Hypothetical protein FG01555.1 (EAA68510) [G. zeae]	14	0.00	-0.37	0.72	-0.29	-1.48
	TrEST-A3935	Hypothetical protein MG00432.4 (EAA48774) [M. grisea]	14	0.00	0.11	0.31	0.86	-1.13
	Trest-A0334	Hypothetical protein FG09552.1 (EAA77109) [G. zeae]	15	0.00	0.29	0.04	0.14	-2.50
	Trest-A0834	Predicted protein (EAA33307) [N. crassa]	15	0.00	0.23	0.00	0.17	-2.09
	TrEST-A2035	Predicted protein (XP_329036) [N. crassa]	15	0.00	0.29	0.08	0.15	-2.52
	Trest-A0630	Hypothetical protein (XP_323195) [N. crassa]	16	0.00	-0.17	-0.18	0.01	1.20
	TrEST-A0927	Hypothetical protein MG03520.4 (EAA51925) [M. grisea]	16	0.00	-0.31	-0.31	0.49	2.23
	Trest-A3733	Hypothetical protein MG09899.4 (EAA46678) [M. grisea]	16	0.00	0.09	-0.38	0.09	1.68
	TrEST-A3825	Hypothetical protein FG08885.1 () [G. zeae]	16	0.00	-0.75	-0.40	0.11	1.15
	Trest-B09A07	Hypothetical protein FG02606.1 (EAA67426) [G. zeae]	16	0.00	-0.38	-0.39	0.34	1.08
	TrEST-B20F01	Hypothetical protein FG02233.1 (EAA69400) [G. zeae]	16	0.00	-0.34	0.34	0.00	1.60
	TrEST-B33C01	TruD domain protein (EAL91002) [A. fumigatus]	16	0.00	-0.30	-0.65	-0.04	1.10
	Trest-B34A02	Predicted protein (EAA72476) [G. zeae]	16	0.00	0.22	0.31	0.33	1.49
	Trest-A0101	Hypothetical protein (XP_325380) [N. crassa]	17	0.00	-0.13	-0.82	-0.86	-1.57
	TrEST-A2143	Predicted protein (XP_324593) [N. crassa]	18	0.00	1.16	-0.84	-0.97	-0.34
	TrEST-A4040	Hypothetical protein (EAA29849) [N. crassa]	18	0.00	-0.14	-0.78	-1.69	-0.15
	TrEST-A2343	Hypothetical protein (EAA34675) [N. crassa]	19	0.00	-0.72	-1.38	-0.75	0.05
	TrEST-A2488	Hypothetical protein FG10787.1 (EAA75141) [G. zeae]	19	0.00	-1.40	-1.44	-0.71	-0.56
	TrEST-A4108	Hypothetical protein FG08506.1 (EAA72083) [G. zeae]	19	0.00	-1.15	-1.30	-1.21	0.09
	TrEST-A4163	Hypothetical protein MG01717.4 (EAA56066) [M. grisea]	19	0.00	-1.10	-0.98	-0.94	-0.38
	TrEST-B20G09	Hypothetical protein FG02071.1 (EAA69593) [G. zeae]	19	0.00	-1.35	-1.61	-1.56	-0.20
	TrEST-B24E02	Hypothetical protein FG10848.1 (EAA74301) [G. zeae]	19	0.00	-1.45	-0.82	-0.77	-0.12
	TrEST-B44F09	Hypothetical protein FG04232.1 (EAA73558) [G. zeae]	19	0.00	-0.99	-1.79	-0.81	-0.20
	TrEST-A2336	Hypothetical protein MG00602.4 (EAA48944) [M. grisea]	20	0.00	-1.11	-1.16	-1.50	-0.68
	TrEST-A2382	Predicted protein (XP_325975) [N. crassa]	20	0.00	-0.40	-1.21	-1.24	-0.56
	Trest-A2755	Hypothetical protein (EAA31251) [N. crassa]	20	0.00	-0.37	-0.96	-0.81	-1.35
	TrEST-A3513	Predicted protein (EAA30746) [N. crassa]	20	0.00	-0.52	-1.50	-1.28	-1.02
	TrEST-B08H10	Hypothetical protein FG09286.1 (EAA76927) [G. zeae]	20	0.00	-1.33	-1.32	-1.66	-0.93
	Trest-A0069	Hypothetical protein (XP_322114) [N. crassa]	21	0.00	-0.37	-1.09	-1.10	-2.01
	TrEST-A1356	AN1 zinc finger protein (EAL84575) [A. fumigatus]	21	0.00	-1.20	-1.55	-2.23	-2.55
	TrEST-A3427	Hypothetical protein FG09205.1 (EAA77045) [G. zeae]	21	0.00	-0.21	-1.09	-1.65	-1.65
	TrEST-A0150	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	22	0.00	-0.11	-1.75	-2.12	-1.25
	TrEST-A3863	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	22	0.00	-0.17	-2.14	-3.32	-1.98
	TrEST-A3280	Hypothetical protein (XP_322321) [N. crassa]	23	0.00	-0.42	-1.87	-2.08	0.11

Desconhecida

Relacionados a ORFs previstas	TrEST-B11D07	Hypothetical protein (XP_327057) [N. crassa]	23	0.00	-0.26	-1.64	-1.87	0.55
	Trest-A0398	Hypothetical protein FG00415.1 (EAA68764) [G. zeae]	24	0.00	-1.10	-2.05	-3.28	-0.29
	Trest-A1748	Hypothetical protein MG04965.4 (EAA52273) [M. grisea]	24	0.00	-1.99	-2.72	-2.56	-0.41
	Trest-A3477	Hypothetical protein (BAC55902) [A. oryzae]	24	0.00	-0.94	-2.30	-3.20	0.35
	Trest-A0451	Hypothetical protein (XP_326319) [N. crassa]	25	0.00	-0.76	-1.45	-0.52	0.72
	Trest-A3751	Hypothetical protein FG08636.1 (EAA72664) [G. zeae]	25	0.00	-0.48	-1.58	-1.08	0.61
	Trest-A0522	Predicted protein (XP_327076) [N. crassa]	26	0.00	-1.30	-2.10	-1.45	1.07
	TrEST-A1688	Hypothetical protein MG09211.4 (EAA55404) [M. grisea]	26	0.00	-1.17	-2.39	-1.13	1.71
	Trest-A3987	Hypothetical protein MG05021.4 (EAA52329) [M. grisea]	26	0.00	-1.25	-2.83	-1.29	1.46
	Trest-A4193	R3H and G-patch domain protein, putative (EAL93030) [A. fumigatus]	26	0.00	-0.71	-2.82	-1.61	0.36
	TrEST-B37C07	Hypothetical protein FG08888.1 (EAA72062) [G. zeae]	26	0.00	-1.35	-2.52	-1.01	1.21
	Trest-A0193	Predicted protein (XP_323446) [N. crassa]	27	0.00	-2.69	-2.65	-1.50	0.30
	Trest-A4130	Hypothetical protein FG01026.1 (EAA67844) [G. zeae]	27	0.00	-2.00	-2.82	-1.72	-0.05
	Trest-A0358	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	28	0.00	-1.93	-1.73	-1.31	1.68
	Trest-A2651	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	28	0.00	-2.39	-1.90	-1.59	1.50
	TrEST-A3914	Hypothetical protein FG02131.1 (EAA69762) [G. zeae]	28	0.00	-2.08	-1.57	-1.48	1.74
	TrEST-A2104	Hypothetical protein FG07929.1 (EAA77301) [G. zeae]	29	0.00	-1.74	-1.46	-1.17	0.20
	Trest-A4047	Hypothetical protein FG08805.1 (EAA72005) [G. zeae]	29	0.00	-1.60	-1.29	-0.93	0.27
	TrEST-A4228	GPR/FUN34 family protein (EAL87502) [A. fumigatus]	29	0.00	-1.77	-2.09	-1.19	0.32
	TrEST-B14G08	Hypothetical protein FG06563.1 (EAA78348) [G. zeae]	29	0.00	-2.00	-0.96	-0.65	0.40
	Trest-A0064	Hypothetical protein FG06697.1 (EAA77633) [G. zeae]	30	0.00	-1.02	-0.74	-0.28	0.71
	Trest-A0503	BolA domain protein (EAL84742) [A. fumigatus]	30	0.00	-1.39	-0.18	0.33	-0.04
	Trest-A1185	Hypothetical protein FG06189.1 (EAA74545) [G. zeae]	30	0.00	-1.16	0.18	0.26	0.17
	Trest-A4111	Hypothetical protein FG00731.1 (EAA70677) [G. zeae]	30	0.00	-1.40	-0.65	-0.44	-0.03
	Trest-B34A09	Hypothetical protein FG04033.1 (EAA73501) [G. zeae]	30	0.00	-1.85	-0.61	-0.35	0.30
Sem Seqüência Similar	Trest-A0883		1	0.00	-0.17	1.01	2.49	2.55
	TrEST-B41D07		1	0.00	0.56	1.32	1.25	1.77
	TrEST-A0444		3	0.00	2.48	3.69	3.63	-0.56
	TrEST-A1465		3	0.00	2.06	3.57	4.07	-1.45
	Trest-A1719		3	0.00	2.43	3.50	3.47	-0.80
	TrEST-A2961		3	0.00	2.38	3.55	3.52	-0.62
	Trest-A3649		3	0.00	2.42	3.50	3.49	-0.70
	Trest-A0066		4	0.00	4.41	3.74	2.45	-0.74
	Trest-A1165		5	0.00	1.46	2.74	2.54	-0.24
	Trest-A1591		5	0.00	1.93	2.64	1.72	-0.33
	Trest-A1783		5	0.00	1.74	3.30	2.23	0.11
	Trest-A2548		5	0.00	1.15	2.33	2.75	-0.62
	Trest-A3011		5	0.00	1.72	2.57	2.30	0.05
	Trest-A3446		5	0.00	1.25	2.63	2.19	-0.56
	Trest-A3846		5	0.00	2.00	2.88	2.79	0.07
	Trest-A4030		5	0.00	1.07	3.06	2.76	-0.36
	TrEST-A0731		6	0.00	4.12	2.59	1.50	0.22
	TrEST-A1788		6	0.00	2.94	3.97	2.20	-0.15
	TrEST-A2323		6	0.00	2.31	2.65	2.08	-0.39
	TrEST-A3112		6	0.00	2.49	3.12	2.16	-0.53
	TrEST-B27G10		6	0.00	3.18	3.32	1.83	-0.22
Sem Seqüência Similar	Trest-A0225	7	0.00	1.23	1.88	1.18	-0.25	
-----------------------	--------------	----	------	-------	------	-------	-------	
	Trest-A0428	7	0.00	1.28	1.43	1.57	-0.57	
	Trest-A0739	7	0.00	1.11	1.87	0.50	-0.23	
	Trest-A0961	7	0.00	0.84	1.66	1.38	-0.26	
	Trest-Al265	7	0.00	1.73	1.84	0.56	-0.20	
	Trest-A1778	7	0.00	1.10	2.09	1.84	0.06	
	Trest-A1802	7	0.00	0.94	1.87	1.17	-0.50	
	Trest-A2525	7	0.00	1.77	2.34	1.07	-0.17	
	Trest-A3034	7	0.00	2.04	2.43	1.15	-0.50	
	Trest-A4109	7	0.00	1.34	1.54	1.05	0.12	
	Trest-B24H08	7	0.00	1.42	1.74	0.99	-0.21	
	Trest-A0629	8	0.00	0.86	1.31	0.80	-1.27	
	Trest-A0680	8	0.00	1.34	1.01	1.04	-0.68	
	Trest-A1223	8	0.00	1.07	1.00	1.09	-0.75	
	Trest-A2285	8	0.00	1.17	1.12	1.14	-0.66	
	Trest-A2578	8	0.00	1.10	0.94	1.05	-0.91	
	Trest-A2818	8	0.00	1.04	0.90	0.87	-0.96	
	Trest-A2999	8	0.00	1.15	0.92	1.00	-0.97	
	Trest-A3013	8	0.00	0.51	1.43	0.83	-0.78	
	Trest-A3944	8	0.00	0.58	1.54	1.67	-0.73	
	Trest-A4256	8	0.00	1.20	1.10	1.18	-0.71	
	Trest-B06F12	8	0.00	1.50	1.31	0.75	-0.43	
	Trest-B09E01	8	0.00	1.07	1.05	0.95	-0.41	
	Trest-A0120	9	0.00	0.53	1.63	0.91	-0.11	
	Trest-A0235	9	0.00	0.70	1.71	0.93	-0.18	
	Trest-A0687	9	0.00	0.50	1.05	0.79	0.59	
	Trest-A1632	9	0.00	0.65	1.10	0.75	0.46	
	Trest-A1752	9	0.00	-0.38	0.80	1.38	0.27	
	Trest-A1770	9	0.00	0.67	1.27	1.09	0.18	
	Trest-A2173	9	0.00	-0.07	0.65	1.12	0.14	
	Trest-A2461	9	0.00	0.61	1.25	1.33	0.07	
	Trest-A3397	9	0.00	0.23	1.39	0.88	-0.34	
	Trest-A3448	9	0.00	0.45	1.11	0.72	0.08	
	Trest-A3520	9	0.00	0.65	1.59	0.94	0.08	
	Trest-A3559	9	0.00	0.62	1.07	0.97	0.58	
	Trest-A3587	9	0.00	0.21	1.08	1.09	-0.30	
	Trest-B09G08	9	0.00	0.86	1.31	1.05	0.25	
	Trest-B28B03	9	0.00	0.62	1.15	1.08	-0.18	
	Trest-B39B10	9	0.00	0.69	1.04	0.75	0.35	
	Trest-B41D08	9	0.00	0.63	1.54	0.99	-0.06	
	Trest-A2379	10	0.00	1.53	1.66	0.50	0.10	
	Trest-A2426	10	0.00	1.12	1.20	0.88	-0.02	
	Trest-A2938	10	0.00	0.81	1.20	0.21	-0.36	
	Trest-A3684	10	0.00	1.07	1.22	0.15	-0.32	
	Trest-A3870	10	0.00	1.23	1.08	0.66	-0.09	
	Trest-B09H06	10	0.00	0.56	1.04	-0.08	0.25	

Sem Seqüência Similar	Trest-B41007	10	0.00	0.71	1.23	0.19	0.12
	Trest-A1667	11	0.00	0.93	1.68	1.31	-3.22
	Trest-A0132	12	0.00	1.16	1.18	0.94	-1.39
	Trest-a0256	12	0.00	1.34	2.13	1.16	-1.79
	Trest-A0878	12	0.00	1.18	1.12	1.03	-2.39
	Trest-a0940	12	0.00	1.09	1.13	1.04	-2.35
	Trest-al651	12	0.00	1.18	1.29	1.11	-1.55
	Trest-A2332	12	0.00	0.82	1.08	0.96	-2.34
	Trest-A2491	12	0.00	1.18	1.18	0.91	-1.93
	Trest-A2520	12	0.00	1.37	1.11	0.36	-1.47
	Trest-A3132	12	0.00	1.34	1.41	1.31	-1.52
	Trest-A3548	12	0.00	1.22	1.36	1.17	-1.92
	Trest-A0637	13	0.00	0.90	0.87	0.39	-1.24
	Trest-A3996	13	0.00	1.03	-0.12	-0.10	-1.62
	Trest-B08A03	13	0.00	0.61	0.39	0.52	-1.20
	Trest-B16A01	13	0.00	1.13	0.38	0.29	-0.94
	TrEST-B26E12	13	0.00	0.98	0.34	0.36	-1.02
	Trest-B41A06	13	0.00	1.24	0.22	0.35	-1.54
	Trest-A2107	14	0.00	0.26	1.21	0.36	-0.76
	Trest-A2250	14	0.00	-0.03	0.23	0.14	-1.09
	Trest-A2398	14	0.00	-0.39	0.28	0.10	-1.08
	Trest-A2819	14	0.00	-0.19	0.57	0.35	-1.02
	Trest-A3894	14	0.00	0.23	0.47	0.46	-1.05
	TrEST-B25C05	14	0.00	0.01	0.19	0.62	-1.01
	Trest-A1327	15	0.00	-0.14	0.36	0.10	-1.67
	Trest-A1819	15	0.00	0.27	0.03	0.02	-1.81
	Trest-A1879	15	0.00	0.26	0.32	0.07	-2.40
	Trest-A1883	15	0.00	0.76	0.55	0.34	-2.18
	Trest-A0822	16	0.00	-0.74	-0.19	-0.32	1.05
	Trest-A3375	16	0.00	-0.06	-0.32	-0.35	1.44
	Trest-A3387	16	0.00	0.03	0.44	0.27	1.18
	Trest-A4034	16	0.00	0.35	0.20	-0.05	1.08
	TreST-B12C02	16	0.00	0.00	0.28	0.80	1.28
	Trest-B20D03	16	0.00	0.17	0.66	0.66	1.19
	Trest-B33H12	16	0.00	-0.07	-0.16	0.57	2.03
	Trest-B38F11	16	0.00	0.38	0.06	-0.04	1.24
	Trest-A0299	17	0.00	-0.37	-0.28	-0.46	-1.05
	Trest-A0394	17	0.00	-0.07	-0.30	-0.37	-1.59
	Trest-A0581	17	0.00	-0.14	-0.25	-0.51	-1.49
	Trest-A0706	17	0.00	-0.33	-0.13	-0.17	-1.21
	Trest-A1670	17	0.00	0.17	-0.73	-1.35	-1.03
	Trest-A2210	17	0.00	-0.38	-0.41	-0.61	-1.24
	Trest-A2309	17	0.00	-0.41	-0.29	-0.49	-1.13
	Trest-A2826	17	0.00	-0.41	-0.10	-0.30	-1.25
	Trest-A3035	17	0.00	0.41	-0.15	-0.04	-1.31
	Trest-A3433	17	0.00	-0.29	-0.28	-0.52	-1.06

Sem Següência Similar	Trest-A3982	17	0.00	-0.23	0.05	-0.77	-1.17
	Trest-A4000	17	0.00	0.07	-0.27	-0.38	-1.11
	Trest-A4215	17	0.00	0.11	-0.01	-0.22	-1.00
	Trest-A0283	18	0.00	-0.45	-0.40	-1.06	0.77
	Trest-A1822	18	0.00	-0.07	-0.57	-1.08	0.52
	Trest-A1893	18	0.00	0.21	-0.70	-1.61	1.00
	Trest-B06E08	18	0.00	0.05	-0.60	-1.10	0.44
	Trest-B08A08	18	0.00	-0.56	-0.80	-1.28	0.36
	Trest-B18G02	18	0.00	-0.65	-0.76	-1.13	0.64
	Trest-A1602	19	0.00	-1.36	-1.28	-0.61	0.29
	Trest-A2514	19	0.00	-1.43	-1.17	-1.59	-0.05
	Trest-A2609	19	0.00	-0.74	-0.79	-1.11	-0.24
	Trest-A3956	19	0.00	-0.73	-1.33	-1.05	-0.03
	Trest-B17B10	19	0.00	-1.44	-1.02	-0.80	-0.04
	Trest-B17G03	19	0.00	-1.20	-1.07	-0.74	-0.20
	Trest-B18C05	19	0.00	-0.93	-1.14	-0.72	0.27
	Trest-B41H02	19	0.00	-0.41	-1.09	-0.76	-0.42
	Trest-B41H07	19	0.00	-1.12	-1.42	-1.42	-0.18
	Trest-B44D09	19	0.00	-1.27	-1.48	-1.42	-0.06
	Trest-A0200	20	0.00	-0.71	-1.12	-0.76	-1.14
	Trest-A2429	20	0.00	-0.84	-0.95	-1.28	-1.11
	Trest-A3450	20	0.00	-1.50	-1.10	-1.16	-1.33
	Trest-B08e01	20	0.00	-1.06	-2.05	-1.27	-1.03
	Trest-B35g01	20	0.00	-1.19	-1.50	-1.28	-1.13
	Trest-A0277	21	0.00	-0.63	-0.24	-1.38	-2.90
	Trest-A2002	22	0.00	-0.69	-2.28	-2.25	-0.60
	Trest-B11C04	22	0.00	-1.60	-2.27	-2.14	-1.12
	Trest-B22H02	22	0.00	-1.71	-2.64	-2.28	-1.51
	Trest-A0175	23	0.00	-0.83	-1.20	-2.41	-0.20
	Trest-A0930	23	0.00	-0.49	-1.68	-2.05	0.36
	Trest-A1059	23	0.00	-0.44	-1.67	-1.97	0.06
	Trest-A2968	23	0.00	-1.08	-2.24	-1.43	-0.09
	Trest-A3695	23	0.00	-0.24	-1.26	-1.54	0.15
	Trest-A3707	23	0.00	-0.97	-1.42	-1.70	0.90
	TrEST-B09F04	23	0.00	-0.11	-1.23	-1.50	-0.30
	Trest-A3804	24	0.00	-2.12	-2.76	-2.65	-0.18
	Trest-B06C07	24	0.00	-2.06	-3.94	-4.73	0.01
	TrEST-B41E04	24	0.00	-1.52	-3.36	-3.35	-0.22
	Trest-A0996	25	0.00	-0.90	-1.14	-0.50	0.93
	Trest-A1050	25	0.00	-0.70	-1.20	-0.54	1.37
	Trest-A2475	25	0.00	-1.15	-1.73	-1.14	0.90
	Trest-A4061	25	0.00	-0.56	-1.57	-0.95	0.72
	TrEST-B12F10	25	0.00	-0.90	-1.22	-0.82	0.72
	TrEST-B12H02	25	0.00	-1.12	-1.91	-0.92	1.20
	Trest-B19e10	25	0.00	-1.16	-1.24	-0.95	1.78
	Trest-B23F08	25	0.00	-1.00	-1.01	-0.84	1.02

Sem Seqüência Similar	TrEST-B28B09		25	0.00	-0.52	-1.11	-0.97	1.03
	TrEST-B33E01		25	0.00	-0.22	-0.93	-0.81	1.03
	TrEST-B33H09		25	0.00	-0.89	-1.06	-0.86	1.68
	TrEST-B34H04		25	0.00	-1.03	-1.27	-0.41	1.35
	TrEST-B41B03		25	0.00	-0.52	-1.62	-0.81	1.70
	TrEST-B43C12		25	0.00	-1.03	-1.15	-1.01	1.37
	TrEST-B43E10		25	0.00	-1.18	-1.66	-1.03	1.10
	Trest-A0583		26	0.00	-1.43	-3.15	-1.54	1.32
	Trest-A3580		26	0.00	-1.37	-2.98	-1.97	1.54
	Trest-A3905		26	0.00	-1.26	-2.04	-0.96	1.05
	TrEST-B08C07		26	0.00	-0.69	-2.41	-1.37	1.36
	TrEST-B10D10		26	0.00	-1.27	-2.10	-1.09	0.94
	TrEST-B18E12		26	0.00	-1.40	-2.79	-1.34	1.37
	TrEST-B22B07		26	0.00	-0.68	-2.54	-1.27	1.02
	TrEST-B39E01		26	0.00	-1.30	-2.31	-1.27	0.83
	TrEST-B41D02		26	0.00	-0.87	-2.78	-1.76	0.95
	TrEST-B41E03		26	0.00	-1.56	-2.92	-1.66	1.19
	TrEST-B16C03		27	0.00	-1.84	-2.49	-1.32	0.69
	TrEST-B18F09		27	0.00	-2.02	-3.45	-1.76	0.84
	TrEST-B41F08		27	0.00	-1.63	-3.05	-1.82	1.06
	Trest-A2868		28	0.00	-1.92	-2.46	-1.08	1.32
	Trest-A2998		28	0.00	-2.76	-2.13	-1.66	1.26
	TrEST-B28C09		28	0.00	-2.13	-1.99	-1.06	0.91
	TrEST-A0571		29	0.00	-2.51	-1.64	-1.01	0.21
	TrEST-A0572		29	0.00	-1.92	-1.29	-1.07	0.82
	Trest-A0824		29	0.00	-2.02	-1.58	-0.66	0.35
	TrEST-A1872		29	0.00	-1.38	-2.04	-1.14	0.35
	TrEST-B07H11		29	0.00	-1.26	-1.94	-0.80	-0.16
	TrEST-B18G01		29	0.00	-1.92	-1.64	-0.86	0.13
	TrEST-B43E09		29	0.00	-2.51	-2.08	-1.23	0.36
	Trest-A0727		30	0.00	-2.31	-0.69	-0.21	0.45
	Trest-A1718		30	0.00	-1.02	-0.72	-0.52	0.33
	Trest-A2450		30	0.00	-1.16	-0.61	-0.12	-0.09
	Trest-A3960		30	0.00	-1.50	-0.71	-0.17	0.45
	TrEST-B28G11		30	0.00	-1.13	-0.50	-0.02	-0.37

Tabela 9: Dados de expressão do experimento de Envenenamento com Cádmio (II). Os clones 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 seqüência similar mais relevante e o organismo da qual proveio. Os dados de expressão são o grupo de padrão de expressão e os valores do logaritmo, na base 2, da razão das fluorescências normalizadas para os pontos de 30, 60 e 120 minutos após a adição de sulfato de cádmio (II) para concentração final de aproximadamente 250 mmol/L.

Função	Clone ID & Ide	ntificação	Grupo Cd ²⁺ 0 min Cd ²⁺ 30 min Cd ²⁺ 60 min C			60 min Cd ²⁺ 120 min	
<u>Defesa Celular</u>							
Destoxificação	Trest-A2590	Antioxidant protein LsfA (EAL89931) [A. fumigatus]	7	0.00	0.82	1.08	0.02
Resposta a estresse	Trest-A3340	30 kDa heat shock protein (P19752) [N. crassa]	1	0.00	2.54	3.18	2.14
-	Trest-A0004	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	2	0.00	2.20	2.20	1.47
	Trest-A0191	Stress response Rci peptide (EAL92348) [A. fumigatus]	2	0.00	2.33	2.36	1.75
	Trest-A0074	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	3	0.00	1.99	1.99	1.19
	Trest-A2012	Probable DnaJ-like heat-shock protein (EAK98400) [C. albicans]	7	0.00	1.19	0.61	0.21
	Trest-A2428	Molecular chaperone Hsp90 (EAL85888) [A. fumigatus]	7	0.00	1.26	0.69	-0.27
<u>Divisão Celular</u>							
Ciclo celular	Trest-A4128	Cell division control protein Cdc48 (EAL94007) [A. fumigatus]	8	0.00	0.91	1.25	0.56
	TrEST-A0415	Cell division control protein Cdc48 (EAL94007) [A. fumigatus]	9	0.00	0.62	1.08	0.72
	Trest-A0011	Piml protein (EAL84622) [A. fumigatus]	9	0.00	0.49	0.74	1.03
Sinalização Celular							
Efetores e moduladores	Trest-A1813	Related to PalI protein (Q9P6T5) [N. crassa]	4	0.00	1.80	1.47	1.15
Modificação protéica	Trest-A1058	Calnexin (EAL89509) [A. fumigatus]	5	0.00	1.80	1.57	0.01
<u>Metabolismo</u>							
Aminoácidos	TrEST-B43C07	Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase (EAL92780) [A. fumigatus]	1	0.00	2.91	3.55	1.58
	Trest-A2908	Glycine cleavage system T protein (EAL90405) [A. fumigatus]	6	0.00	1.37	1.05	0.76
	TrEST-B06D08	Aminotransferase class V (EAL90276) [A. fumigatus]	12	0.00	-0.45	-1.00	-0.57
	Trest-A0758	Probable glycine decarboxylase P subunit (CAE76410) [N. crassa]	13	0.00	-1.03	-0.90	-0.27
Cofatores	Trest-A0231	Pyridoxine biosynthesis protein Pdx1 (059905) [C. nicotianae]	12	0.00	-0.40	-0.73	-1.71
Energia e ciclo de Krebs	TrATP8	ATP synthase protein 8 (AAL74177) [T. reesei]	10	0.00	0.39	0.09	1.15
	TrND5	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 5 (AAL74164) [T. reesei]	10	0.00	0.50	-0.03	1.24
	TrND4	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 4 (AAL74179) [T. reesei]	11	0.00	0.11	0.06	1.14
Lipídeos	TrEST-A3165	NADP-dependent leukotriene b4 12-hydroxydehydrogenase (AAC24957) [B. fuckeliana]	9	0.00	0.53	0.72	1.30
	Trest-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha (P15368) [P. griseofulvum]	12	0.00	-0.55	-1.08	-0.60
Açúcares e glicólise	Trest-A2258	Endochitinase class V precursor (AAL84699) [H. virens]	3	0.00	1.37	2.15	1.43
	TrEST-A3142	Putative N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (EAL87759) [A. fumigatus]	6	0.00	1.07	0.72	0.55
	Trest-A0137	Probable myo-inositol 1-phosphate synthase (CAD70896) [N. crassa]	7	0.00	0.95	1.13	0.16
	TrEST-B34B10	Glycogenin (AAS68518.1) [N. crassa]	13	0.00	-1.21	-0.96	-0.17
Transporte	Trest-A1842	ADP,ATP carrier protein (P02723) [N. crassa]	13	0.00	-0.58	-1.13	-0.27
	Trest-A3037	Ctr copper transporter family protein (EAL87467) [A. fumigatus]	13	0.00	-1.20	-0.93	0.08
	Trest-A0901	Metalloreductase (EAL85037) [A. fumigatus]	15	0.00	-2.53	-2.86	0.28

Clone ID & Identificação

Modificações pós-traducionais e endereçamento	Trest-A3488	Putative protein-vacuolar targeting-related protein (AAW40887) [C. neoformans]	3	0.00	2.06	1.97	1.39
	Trest-A0636	Polyubiquitin 5 (UQBY) [S. cerevisiae]	8	0.00	0.97	1.29	0.48
	TrEST-B17F07	Probable phosphomannomutase (EAA34550) [N. crassa]	8	0.00	0.87	1.36	0.44
Degradação protéica	Trest-A4209	26S proteasome regulatory subunit-like protein (AAW69328) [M. grisea]	3	0.00	1.20	1.98	1.39
	Trest-A0595	Subtilisin-like serine protease PR1H (CAC95047) [M. anisopliae]	4	0.00	1.52	1.33	0.93
	TrEST-B07H02	Serine protease 2 (CAC85639) [P. brassicae]	6	0.00	1.10	1.10	0.83
	TrEST-A1821	Autophagy-related ubiquitin-like modifier Atg-8 (Q8WZY7) [N. crassa]	8	0.00	0.88	1.14	0.60
Proteínas ribossomais	TrEST-B15D12	Ribosomal protein L27 (EAL88345) [A. fumigatus]	5	0.00	1.53	1.19	0.17
	TrEST-B06A02	Cytosolic small ribosomal subunit S15 (EAL86942) [A. fumigatus]	8	0.00	0.77	1.19	0.17
	TrEST-B14D06	60S ribosomal protein L27a (L29) (EAA78050) [G. zeae]	13	0.00	-1.04	-0.89	-0.03
RNA ribossomal	Tr25S	25S ribosomal RNA (X77580) [T. reesei]	9	0.00	0.64	1.15	0.95
<u>Síntese de RNA</u>							
Fatores transcricionais	Trest-A3454	Transcription factor (CAC88374) [H. jecorina]	7	0.00	1.00	0.80	0.14
	Trest-A3675	Multiprotein bridging factor (Q53IP3) [G. fujikuroi]	7	0.00	1.04	1.02	0.20
Não-classificada							
Outros genes	Trest-A0896	Putative senescence-associated protein (BAB33421) [P. sativum]	9	0.00	0.43	1.14	1.08
	TrTRS1	Trichoderma reesei DNA fragment trs1 (Y14562) [T. reesei]	11	0.00	0.06	-0.14	1.03
<u>Desconhecida</u>							
Relacionados a ORFs preditas	Trest-B34D05	Hypothetical protein AN2200.2 (EAA63857) [A. nidulans]	1	0.00	2.94	3.73	1.59
	Trest-A2618	Hypothetical protein FG01267.1 (EAA70576) [G. zeae]	3	0.00	1.80	2.05	1.32
	Trest-A3747	Hypothetical protein FG07160.1 (EAA76619) [G. zeae]	3	0.00	1.57	1.75	1.19
	Trest-A2812	Hypothetical protein FG01555.1 (EAA68510) [G. zeae]	4	0.00	1.60	1.80	1.01
	Trest-A3651	Hypothetical protein FG06162.1 (EAA74726) [G. zeae]	4	0.00	1.39	1.61	0.64
	TrEST-A3863	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	4	0.00	1.17	1.95	0.74
	Trest-A3427	Hypothetical protein FG09205.1 (EAA77045) [G. zeae]	5	0.00	1.29	1.24	0.42
	Trest-A3764	Hypothetical protein FG00925.1 (EAA67702) [G. zeae]	5	0.00	1.50	1.28	0.55
	TrEST-A1999	Hypothetical protein FG02234.1 (EAA69401) [G. zeae]	6	0.00	1.12	0.89	0.70
	Trest-A2606	Hypothetical protein MG07328.4 (EAA56973) [M. grisea]	6	0.00	1.13	1.22	0.68
	Trest-A3946	Hypothetical protein FG10202.1 (EAA70045) [G. zeae]	6	0.00	1.12	1.03	0.42
	TrEST-B12D05	Hypothetical protein FG01866.1 (EAA67401) [G. zeae]	7	0.00	1.00	0.90	0.41
	Trest-A0150	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	8	0.00	0.95	1.50	0.51
	Trest-A0326	Hypothetical protein FG09503.1 (EAA76292) [G. zeae]	8	0.00	0.86	1.15	0.25
	Trest-A3430	Hypothetical protein FG02859.1 (EAA72359) [G. zeae]	8	0.00	0.46	1.39	0.56
	Trest-A0140	Unnamed protein product (CAH00942) [K. lactis]	9	0.00	0.60	1.04	0.87
	TrEST-A1668	Hypothetical protein FG01169.1 (EAA68635) [G. zeae]	10	0.00	0.46	0.49	1.19
	Trest-A0897	Hypothetical protein FG07275.1 (EAA77508) [G. zeae]	13	0.00	-1.09	-0.97	-0.05
	Trest-A3914	Hypothetical protein FG02131.1 (EAA69762) [G. zeae]	14	0.00	-1.87	-1.87	0.04
	TrEST-B14G08	Hypothetical protein FG06563.1 (EAA78348) [G. zeae]	14	0.00	-1.76	-1.48	0.01

_	~
EU	ncan
ıч	ncao

Relacionados a ORFs preditas	Trest-A0358	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	15	0.00	-2.58	-2.80	0.31
	Trest-A2651	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	15	0.00	-2.63	-2.84	0.36
Sem Seqüência Similar	Trest-A0066		2	0.00	2.11	2.20	1.40
	Trest-A0277		2	0.00	2.58	2.05	1.60
	Trest-A1667		2	0.00	2.26	2.40	1.85
	Trest-A1879		2	0.00	2.22	2.67	1.81
	TrEST-B42A11		2	0.00	2.42	2.18	1.52
	Trest-A2520		3	0.00	2.03	1.76	1.12
	TrEST-B11E01		4	0.00	1.84	1.64	0.70
	TrEST-A3112		6	0.00	1.17	1.07	0.53
	TrEST-B06F12		6	0.00	0.99	1.02	0.91
	TrEST-B27G10		6	0.00	1.28	1.02	0.73
	TrEST-B41H03		6	0.00	0.99	1.02	0.46
	TrEST-A2091		7	0.00	1.01	1.07	0.14
	TrEST-A2609		7	0.00	1.01	0.90	0.20
	Trest-A2747		7	0.00	1.07	1.04	0.13
	TrEST-B28B09		7	0.00	0.85	1.05	0.22
	TrEST-B35B11		7	0.00	1.32	0.77	0.22
	TrEST-B38F03		7	0.00	0.90	1.03	0.32
	TrEST-B18G08		8	0.00	0.70	1.01	0.48
	Trest-A0373		9	0.00	0.65	1.18	0.93
	TrEST-A2965		9	0.00	0.53	1.15	1.12
	TrEST-B35G01		9	0.00	0.61	1.00	1.25
	TrEST-A3996		11	0.00	-0.05	0.24	1.01
	Trest-A3804		12	0.00	-0.52	-1.17	-0.70
	Trest-A4034		13	0.00	-1.22	-1.12	-0.16
	TrEST-B06C07		13	0.00	-0.48	-1.08	0.24
	TrEST-B33B06		13	0.00	-1.08	-0.74	-0.24
	TrEST-B33H12		13	0.00	-1.26	-1.22	0.29
	TrEST-A0678		14	0.00	-1.94	-1.85	-0.34
	Trest-A1718		14	0.00	-1.77	-1.39	-0.08
	TrEST-A1982		14	0.00	-1.66	-1.43	0.07
	Trest-A2367		14	0.00	-1.36	-1.34	-0.39

Tabela 10: Dados de expressão do experimento de Limitação de Fonte de Nitrogênio e Pulso de sulfato de amônio. Os clones 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 seqüência similar mais relevante e o organismo da qual proveio. Os dados de expressão são o grupo de padrão de expressão e os valores do logaritmo, na base 2, da razão das fluorescências normalizadas para os pontos de 2 horas sem fonte de carbono, e 30 e 60 minutos após a adição de sulfato de amônio para concentração final de aproximadamente 15,0 mmol/L.

Função	Clone ID & Ide	entificação	Grupo	noN 0 min	noN 120 min	N 30 min	N 60 min
<u>Defesa Celular</u>							
Destoxificação	TrEST-A1642	Probable protein disulfide-isomerase precursor (T47259) [N. crassa]	8	0.00	1.28	0.38	0.06
-	Trest-A0620	Related to glyoxal oxidase precursor (CAE76318) [N. crassa]	10	0.00	0.32	-1.35	-0.72
	TrEST-A4158	Related to glyoxal oxidase precursor (CAE76318) [N. crassa]	10	0.00	0.32	-1.17	-0.75
	TrEST-A1817	Aureobasidin A resistance protein homolog (Q10142) [S. pombe]	14	0.00	-2.58	-2.47	-3.64
	TrEST-A2601	Related to phenol 2-monooxygenase (CAE76270) [N. crassa]	16	0.00	-1.17	-1.04	-1.54
	TrEST-A3699	Related to phenol 2-monooxygenase (CAE76270) [N. crassa]	17	0.00	-2.22	-0.95	-2.25
	TrEST-A2590	Antioxidant protein LsfA (EAL89931) [A. fumigatus]	20	0.00	-2.54	0.74	0.33
	Trest-A3477	Hypothetical protein (BAC55902) [A. oryzae]	24	0.00	-1.33	1.70	1.60
Resposta a estresse	TrEST-A0074	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	10	0.00	0.24	-1.04	-0.58
ivisão Celular	Trest-A0004	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	11	0.00	0.16	-1.42	-0.92
	Trest-A0191	Stress response Rci peptide (EAL92348) [A. fumigatus]	12	0.00	-2.22	-1.81	-2.12
<u>Divisão Celular</u>							
Ciclo celular	Trest-A0415	Cell division control protein Cdc48 (EAL94007) [A. fumigatus]	4	0.00	1.05	0.86	0.87
	TrEST-A4128	Cell division control protein Cdc48 (EAL94007) [A. fumigatus]	8	0.00	1.40	0.81	0.05
	TrEST-A1043	Septin B (EAL86934) [A. fumigatus]	10	0.00	0.62	-0.79	0.39
	TrEST-A2598	Probable nucleosome assembly protein I (CAD70974) [N. crassa]	10	0.00	0.39	-0.63	-0.27
	TrEST-A4264	Related to ATROPHIN-1 (CAD21224) [N. crassa]	11	0.00	-0.07	-0.57	-1.44
	Trest-A0423	Checkpoint forkhead associated with RING 2 (DAA05594) [S. cerevisiae]	18	0.00	-1.80	-0.98	-0.20
Sinalização Celular							
Canais e proteínas de transporte	Trest-A1513	Putative transport protein (NP_588478) [S. pombe]	8	0.00	1.09	0.11	-0.35
	Trest-A3656	Putative transmembrane transporter (NP_595211) [S. pombe]	12	0.00	-2.16	-2.93	-2.69
	Trest-A2883	Vacuolar H+/Ca2+ exchanger (EAL87625) [A. fumigatus]	22	0.00	-0.83	0.38	0.21
	Trest-A0089	Putative membrane transporter (CAC36925) [S. pombe]	24	0.00	-1.19	1.47	0.95
Efetores e moduladores	Trest-A3985	Rabl1 binding protein (AAD21616) []	16	0.00	-1.51	-1.68	-1.74
Sinalizadores intracelulares	Trest-A2439	Rhol GTP-binding protein (AAM03110) [M. rouxii]	4	0.00	1.54	0.84	1.18
	Trest-A1694	G protein alpha subunit (AAO18659) [H. virens]	10	0.00	0.29	-0.97	-0.69
Mnodificação protéica	Trest-A0709	Serine/threonine protein phosphatase PP1-1 (P20604) [S. cerevisiae]	4	0.00	1.07	1.19	1.19
	Trest-A2346	Negative regulator of sexual conjugation and meiosis (Ran1) (P08092) [S. pombe]	4	0.00	1.03	1.79	0.92
	TrEST-A3919	Related to protein tyrosine phosphatase PPS1 (CAD21139) [N. crassa]	8	0.00	1.45	0.78	0.23
	Trest-A0880	Serine threonine protein kinase SNF1 (AAK69560) [H. jecorina]	10	0.00	0.48	-0.32	-0.76
	TrEST-A1058	Calnexin (EAL89509) [A. fumigatus]	10	0.00	0.85	-1.03	0.25
	Trest-A3568	Putative histidine kinase M27Mp (AAR30136) [G. moniliformis]	19	0.00	-1.05	-0.55	-0.04

Função	Clone ID & Idea	ntificação	Grupo	noN 0 min	noN 120 min	N 30 min	N 60 min
Estrutura Celular							
Parede celular	Trest-A3010	Trihydrophobin precursor (CFTH1) (Q9UVI4) [C. fusiformis]	1	0.00	6.20	5.67	6.00
	TrHFB2	Hydrophobin II (Y11894) [T. reesei]	1	0.00	4.84	4.78	4.54
	Trest-A1070	Putative glycosyl transferase (EAL86644) [A. fumigatus]	11	0.00	-0.18	-1.52	-1.00
	Trest-A3360	1,3-beta-glucanosyltransferase Gel2 (EAL88984) [A. fumigatus]	14	0.00	-2.96	-3.12	-2.73
	Trest-A3572	Probable family 17 glucosidase SCW11 precursor (P53189) [S. cerevisiae]	16	0.00	-1.47	-2.11	-1.29
Citoesqueleto	Trest-A1698	Cofilin (P78929) [S. pombe]	10	0.00	0.40	-0.79	-0.60
	TrEST-B15F04	Actin (P78711) [N. crassa]	17	0.00	-1.69	-1.00	-1.52
<u>Metabolismo</u>							
Aminoácidos	Trest-B06D08	Aminotransferase class V (EAL90276) [A. fumigatus]	5	0.00	1.26	0.98	0.41
	Trest-A2564	4-Aminobutyrate (GABA) aminotransferase (EAL91927) [A. fumigatus]	8	0.00	1.15	-0.12	-0.38
	Trest-A3986	Probable carbamoyl-phosphate synthase large chain (CAE76486) [N. crassa]	8	0.00	1.10	0.21	-0.33
	Trest-A0224	Aspartate aminotransferase 1 (P28011) [M. sa]	10	0.00	0.36	-0.92	-0.48
	Trest-A2767	Glutamine synthetase (Glutamateammonia ligase) (Q9UUN6) [N. haematococca]	10	0.00	0.26	-1.35	0.24
	TrEST-B22B10	ATP phosphoribosyltransferase (ATP-PRT) (P40373) [S. pombe]	10	0.00	0.44	-1.07	0.26
	Trest-A0758	Probable glycine decarboxylase P subunit (CAE76410) [N. crassa]	11	0.00	-0.79	-1.27	-1.85
	Trest-A0206	Putative phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonate aldolase (Q09755) [S. pombe]	15	0.00	-3.60	-1.43	-2.08
	TrEST-B36E04	3-Isopropylmalate dehydrogenase (Q6TWC4) [S. ma]	15	0.00	-2.87	-1.50	-1.56
	Trest-A3669	2-Isopropylmalate synthase (EAL90831) [A. fumigatus]	17	0.00	-2.11	-0.58	-1.38
	Trest-A4066	Putative aspartate aminotransferase [A. fumigatus]	17	0.00	-2.29	-1.13	-1.33
	TrEST-B40C09	3-Isopropylmalate dehydrogenase (IMDH) (P34738) [N. crassa]	17	0.00	-1.99	-0.07	-1.38
	Trest-A2008	Chorismate synthase (Q12640) [N. crassa]	18	0.00	-1.07	-0.52	-0.96
	TrEST-B21C05	Cobalamin-independent methionine synthase (AAF82115) [A. nidulans]	18	0.00	-1.27	-0.61	-1.07
	TrEST-B43C09	Probable threonine synthase (CAD21138) [N. crassa]	18	0.00	-2.09	-0.31	-0.80
	Trest-A4055	Ketol-acid reductoisomerase, mitochondrial precursor (P38674) [N. crassa]	19	0.00	-1.68	-0.27	-0.43
	Trest-A4078	Homocitrate synthase, mitochondrial precursor (Q12726) [Y. lipolitica]	19	0.00	-2.02	0.00	-0.53
	TrEST-B33G12	Putative thiosulfate sulfurtransferase (EAL84757) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.80	-0.11	0.06
	TrEST-B16G02	Sulfite reductase [NADPH] flavoprotein component (P39692) [S. cerevisiae]	24	0.00	-0.40	1.48	1.14
	TrEST-B43C07	Alpha-ketoqlutarate-dependent taurine dioxygenase (EAL92780) [A. fumigatus]	25	0.00	-2.66	1.31	1.47
Cofatores	TrEST-B27F10	Cytochrome c heme lyase (Holocytochrome-C synthase) (P14187) [N. crassa]	8	0.00	0.55	-0.59	0.72
	Trest-A0365	Thiazole biosynthetic enzyme (Sti35) (P23618) [F. oxysporum]	12	0.00	-1.74	-2.63	-2.93
	Trest-A0014	Probable coproporphyrinogen oxidase precursor (CAD21231) [N. crassa]	14	0.00	-3.25	-3.25	-3.41
	Trest-A3414	Probable coproporphyrinogen III oxidase (O9UTE2) [S. pombe]	14	0.00	-2.51	-2.99	-3.16
	Trest-A0231	Pyridoxine biosynthesis protein Pdx1 (059905) [C. nicotianae]	16	0.00	-1.74	-1.32	-1.30
	Trest-A3748	Related to alpha-ribazole-5'-phosphate phosphatase (CAE75728) [N. crassa]	16	0.00	-1.37	-1.48	-1.21
Eneraia e ciclo de Krebs	TrALD2	Aldehvde dehvdrogenase 2 [T. reesei]	3	0.00	2.44	2.93	1.15
		2-Methylcitrate synthase, mitochondrial precursor (O9TEM3) [E. nidulans]	8	0.00	0.88	-0.06	-0.21
	TrEST-B16G08	ATP citrate lyase, subunit 2 (CAB76164) [S. macrospora]	10	0.00	0.29	-0.27	-0.78
	Trest-A3036	Acetate kinase (Acetokinase) (O9F1X7) [L sn]	11	0.00	-0.67	-1.30	-2.25
	Trest-A2977	Putative pyruvate decarboxvlase (009737) [S. pombe]	12	0.00	-2.06	-2.23	-2.92
	Trest-A1365	Cytochrome c549 (BAA85768) [F oxysporum]	15	0.00	-3.48	-2 71	-1.91
	TrEST-A3734	Flavohemoglobin (BAA33011) [F oxysporum]	16	0.00	-1.86	-1 70	-1.57
	Trest-23975	Alternative oxidase predursor (ALTOX) (001355) [Neurospora crassa]	16	0.00	-1 73	-1.82	-1 64
	TrEST-24211	ATP synthese 9 (CAC27323) [C gloeosporioides]	16	0.00	-1 89	-1.37	-1 21
	Trest-R18H08	Dihydrolipoamide succinyltransferase (AAD47296) [A fumicatus]	16	0.00	-2.25	-1 72	-1.32
	TreTT	Citrate synthese [T_reesei]	18	0.00	-1 62	-0 71	-0.68
	Trest-20697	Ubiquinol-qutochrome a reductase iron-sulfur subunit (D07056) [N grassa]	18	0.00	-1.39	-0 74	-0.67
	TrEST_12740	Cytochrome c oxidase nolymentide WID () [A fumicatus]	18	0.00	-1 18	-1 01	-1 00
	TIDOI AJ/12	Creating a contraine polypeptide vib (/ [A. funityatus]	10	0.00		1.01	1.00

<u>Metabolismo</u>

Energia e ciclo de Krebs	TrEST-A4179	Malate dehydrogenase-like protein (AAX07691) [M. grisea]	18	0.00	-1.41	-1.30	-0.89
	Trest-B06H05	Citrate synthase, mitochondrial precursor (P34085) [N. crassa]	18	0.00	-1.55	-0.84	-0.81
	Trest-A0075	Putative malate dehydrogenase (EAL84651) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.11	-0.28	-0.17
	Trest-A2353	Acetyl-coenzyme A synthetase (AcetateCoA ligase) (P16929) [N. crassa]	19	0.00	-1.02	0.04	-0.16
	TrEST-B08D10	Plasma membrane ATPase (CAB82547) [Glomus mosseae]	19	0.00	-0.86	-0.55	0.27
	TrEST-B25G04	Citrate synthase, mitochondrial precursor (000098) [E. nidulans]	19	0.00	-1.28	-0.45	-0.26
	TrND5	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 5 (AAL74164) [T. reesei]	22	0.00	-0.95	0.14	0.59
	TrND6	NADH::ubiquinone oxidoreductase chain 6 (AAL74172) [T. reesei]	22	0.00	-1.07	0.25	0.26
	TrATP9	ATP synthase subunit 9 [T. reesei]	23	0.00	-0.38	0.41	0.85
	Trest-A0333	Cytochrome c oxidase polypeptide VI (Q01359) [N. crassa]	23	0.00	-0.08	1.33	0.86
Ciclo do glioxilato	TrICL	Isocitrate lyase [T. reesei]	3	0.00	1.91	1.88	1.12
	Trisocly	Isocitrate lyase [T. reesei]	3	0.00	2.25	2.17	1.25
	TrMLS	Malate synthase [T. reesei]	3	0.00	2.68	2.03	1.36
Lipídeos	Trest-A4263	Phosphatidylserine decarboxylase-related (EAM63286) [C. phaeobacteroides]	2	0.00	2.40	3.69	2.35
	Trest-A2547	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial precursor (O8BH95) [M. musculus]	7	0.00	1.74	0.31	-0.23
	Trest-A2798	Probable 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (CAE76156) [N. crassa]	7	0.00	1.81	0.18	0.08
	Trest-A3347	Phospholipase D (BAC67175) [E. nidulans]	8	0.00	1.14	0.57	0.47
	Trest-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha (P15368) [P. griseofulvum]	10	0.00	0.36	-0.44	-0.71
	Trest-A0439	Epoxide hydrolase (AAM77995) [S. carzinostaticus]	11	0.00	0.04	-1.43	-1.76
	Trest-A0634	Oleate delta-12 desaturase (AAG36933) [E. nidulans]	11	0.00	-0.05	-0.88	-1.16
	Trest-A4303	Oleate delta-12 desaturase (BAD04850) [A orvzae]	11	0.00	-0.08	-1 23	-1 78
	Trest-A4057	Related to SREEP cleavage activating protein (CAB88621) [N_crassa]	13	0.00	-3 70	-5.00	-4 63
	TrEST-24208	Related to fatty acid hydroxylase (CAD21081) [N. crassa]	16	0.00	-1 64	-1 46	-1 48
	TrEST-A1935	NADP(+)-dependent glygerol dehydrogenase (CAD42649) [E nidulans]	18	0.00	-1.61	-1.01	-1 04
	TrEST-A3749	Probable C-5 sterol desaturase (O7SBB6) [N_crassa]	18	0.00	-1.39	-1 29	-0.95
	Trest_14136	Putative isoflavone reductase (CAE47972) [A fumicatus]	24	0.00	-0.06	2 11	2 13
Nucleotídeos	Trest_12852	Allantoinage (FAL97322) [A fumigatus]	7	0.00	2 44	-0.84	-0.22
Nucleon acos	Trest A2052	Irigage (BAD19009) [T_ inflatum]	10	0.00	1.40	-0.74	-0.69
	TTEST-A0752	Adomylogugginato gymthotago (ANIE6627) [F nidulang]	10	0.00	-1.40	-0.77	-0.03
	TIESI-AS972	Drobable dibudreerstage (DUCage) (OUTITE) [2. neutralis]	10	0.00	-1.40	-0.21	-0.74
	TIESI-A0005	Monuleguaginete lunge (Monuleguaginese) (005011) [C. gerevicies]	19	0.00	-1.20	-0.21	-0.50
	TIESI-ASS/U	Adenyiosuccinate lyase (Adenyiosuccinase) (005911) [S. cereviside]	19	0.00	-1.24	0.10	0.15
Acúsoros o alisólios	TIESI-A0020	Putative inosine-5 -monophosphate denydrogenase (EAL6/456) [A. fumigatus]	21	0.00	-1.90	2.20	0.39
Açucares e gilcolise	TrEST-A0264	Aldenyde denydrogenase (ALDDH) (P42041) [A. alternata]	3	0.00	0.05	2.30	0.03
	TrEST-A3422	Glucoamylase precursor (P14804) [N. crassa]	3	0.00	0.95	2.39	1.09
	TTEST-AUI3/	Probable myo-inositoi i-phosphate synthase (CAD/0896) [N. crassa]	4	0.00	1.00	0.73	1.50
	TTARAB	Arabinosidase [T. reesel]	4	0.00	1.20	1.52	1.80
	Trest-AL3/3	Giucosamine-6-phosphate deaminase (Q8A094) [B. th]	5	0.00	0.14	1.71	-0.11
	TrEST-A3541	L-xylulose reductase (Q8NK50) [H. jecorina]	5	0.00	0.18	1.60	-0.82
	TrEST-A2258	Endochitinase class V precursor (AAL84699) [H. virens]	9	0.00	0.37	-0.17	-1.33
	TrGLYP	Glycogen phosphorylase [T. reesel]	9	0.00	0.17	-0.32	-1.61
	TrGPH	Glycogen phosphorylase [T. reesei]	9	0.00	0.45	-0.10	-1.39
	TrEST-A2499	Glycogen phosphorylase-like protein (AAU06197) [M. haptotylum]	10	0.00	0.36	-1.07	-0.49
	TrEST-A0909	Clock-controlled gene-9 protein (AAC64285) [N. crassa]	12	0.00	-1.54	-1.99	-2.29
	TrEST-A0613	Xylitol dehydrogenase (AAO42466) [H. jecorina]	14	0.00	-2.81	-3.16	-3.32
	Trest-A1895	Enolase (AAK51201) [P. citrinum]	16	0.00	-1.84	-1.22	-1.27
	Treno	Enolase [T. reesei]	17	0.00	-1.90	-1.22	-1.34
	Trest-A2626	Putative Xu-5-P / Fru-6-P phosphoketolase (AAW46259) [C. neoformans]	17	0.00	-2.26	-0.46	-2.17
	TrEST-B34B10	Glycogenin (AAS68518.1) [N. crassa]	17	0.00	-1.83	-0.63	-2.67
	TrTDH	Triose-phosphate dehydrogenase [T. reesei]	17	0.00	-1.60	-1.04	-1.61

Metabolismo

Acúcares e glicólise	Trest-A0174	Phosphoketolase (ZP 00032418) [B. fungorum]	17	0.00	-1.64	-0.18	-1.50
,	Trest-A0750	Xylosidase / arabinosidase (AA076888) [B. thetaiotaomicron]	18	0.00	-2.35	-1.01	-0.50
	TrEST-B42H12	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase 2 (P40510) [S. cerevisiae]	18	0.00	-1.86	-0.97	-0.82
	TrEST-B34E03	Alpha-mannosidase IC (AAG18507) [E. nidulans]	19	0.00	-1.12	-0.66	-0.47
	TrXYLAN1	Endo-beta-1,4-xylanase I (S51973) [T. reesei]	22	0.00	-0.91	0.94	0.73
	Trest-B14C06	Glucokinase (AAY83347) [H. jecorina]	23	0.00	0.14	1.20	1.51
	TrGLK	Glucokinase [T. reesei]	23	0.00	0.18	1.31	1.25
	TrGPD	Glycerophosphate dehydrogenase [T. reesei]	23	0.00	-0.28	0.89	0.96
Transporte	Trest-B06E06	MSTA protein (CAC80843) [E. nidulans]	2	0.00	1.37	3.54	3.36
	TrEST-B21B12	Related to triose phosphate/phosphate translocator (CAD70482) [N. crassa]	4	0.00	1.67	1.22	1.06
	Trest-A0793	Putative peptide transporter (CAD27303) [A. fumigatus]	7	0.00	1.96	0.86	-0.27
	TrEST-A3961	Proline-specific permease (P18696) [E. nidulans]	7	0.00	1.92	0.12	0.13
	Trest-A1813	Related to PalI protein (Q9P6T5) [N. crassa]	10	0.00	-0.12	-1.91	-0.08
	Trest-A4185	Putative amino acid permease family protein (EAL84500) [A. fumigatus]	10	0.00	0.43	-1.08	-0.57
	Trest-A1890	Hypothetical protein (XP_330348) [N. crassa]	16	0.00	-1.67	-1.83	-1.66
	Trest-A3556	Putative MFS transporter (EAL84203) [A. fumigatus]	16	0.00	-2.11	-1.92	-0.85
	Trest-B06A05	MDR-like ABC transporter (AAF65762) [B. fuckeliana]	16	0.00	-1.22	-1.75	-1.89
	Trest-A3927	Putative MFS transporter (EAL85184) [A. fumigatus]	17	0.00	-1.93	-1.26	-1.61
	TrEST-B34E01	Argininosuccinate synthase (EAL87525) [A. fumigatus]	18	0.00	-1.53	-0.46	-0.76
	TrEST-A1842	ADP,ATP carrier protein (P02723) [N. crassa]	19	0.00	-1.49	-0.12	-0.34
	TrEST-A4068	Mitochondrial phosphate carrier protein (P23641) [S. cerevisiae]	19	0.00	-1.75	-0.80	-0.21
	TrEST-B07C11	ADP,ATP carrier protein (ADP/ATP translocase) (P02723) [N. crassa]	19	0.00	-1.47	-0.14	-0.32
	TrEST-A4172	Related to endosomal Vps protein complex subunit (CAD21186) [N. crassa]	22	0.00	-1.32	0.51	0.49

Modificações pós-traducionais e	TrEST-B23E11	Probable 26S ATP/ubiquitin-dependent proteinase chain S4 (CAB88559) [N. crassa]	8	0.00	0.98	-0.17	-0.16
endereçamento							
	Trest-A0636	Polyubiquitin 5 (UQBY) [S. cerevisiae]	10	0.00	0.58	-0.60	0.16
	Trest-A2933	Ubiquitin C-terminal hydrolase L3 (EAL87650) [A. fumigatus]	10	0.00	1.61	-0.74	-1.28
	Trest-A3562	Protein mannosyltransferase 1 (EAL92923) [A. fumigatus]	10	0.00	0.32	-0.92	-0.05
	Trest-A0364	Putative coatomer subunit zeta (EAL93214) [A. fumigatus]	11	0.00	-0.57	-1.27	-2.06
Degradação protéica	Trest-A0595	Subtilisin-like serine protease PR1H (CAC95047) [M. anisopliae]	6	0.00	3.82	1.08	1.32
	TrEST-B07H02	Serine protease 2 (CAC85639) [P. brassicae]	6	0.00	3.47	0.75	1.12
	Trest-A0041	Vacuolar protease A precursor (Q01294) [N. crassa]	7	0.00	2.04	0.67	0.47
	Trest-A1821	Autophagy-related ubiquitin-like modifier Atg-8 (Q8WZY7) [N. crassa]	7	0.00	1.63	0.55	0.33
	Trest-A4013	Serine-type carboxypeptidase homolog precursor (JC7666) [E. nidulans]	7	0.00	2.43	0.68	0.58
	Trest-A4075	Autophagy-related protein 11 (Q7S055) [N. crassa]	8	0.00	0.94	-0.09	0.22
	Trest-A4289	Related to beta-N-acetylglucosaminidase (CAE85548) [N. crassa]	8	0.00	1.23	0.78	0.18
	Trest-A1696	Beta-TrCP (Beta-transducin repeat-containing protein) (Q91854) [X. laevis]	10	0.00	0.50	-1.02	-0.60
	Trest-A1711	Lysosomal aspartic protease precursor (Q03168) [A. aegypti]	10	0.00	0.49	-0.93	-0.37
	Trest-A1882	Carboxypeptidase S (P27614) [S. cerevisiae]	10	0.00	0.91	-0.91	-0.47
	Trest-A3028	Probable proteasome subunit alpha type 5 (Q9UT97) [S. pombe]	10	0.00	0.57	-1.18	-0.60
	Trest-A2912	Aminopeptidase (EAL89884) [A. fumigatus]	12	0.00	-1.93	-2.26	-2.13
	Trest-A3560	Aspartic protease (BAC00848) [A. oryzae]	22	0.00	-1.19	0.16	0.23
Proteínas ribossomais	Trest-A2562	40S ribosomal protein S2-like protein (AAX07689) [M. grisea]	5	0.00	0.65	1.66	-0.42
	Trest-A0210	Related to ribosomal protein YmL20, mitochondrial (CAD36998) [N. crassa]	10	0.00	0.51	-1.01	-0.47
	Trest-A3633	40S ribosomal protein S3 (060128) [S. pombe]	10	0.00	0.48	-0.85	-0.39
	TrEST-B16E08	Related to 60S ribosomal protein L1 (CAD71231) [N. crassa]	19	0.00	-1.03	-0.01	-0.08

Proteínas ribossomais	Trest-A3413	Homology to 60S ribosomal protein L14 (L23) (NP_009466) [S. cerevisiae]	20	0.00	-2.49	0.45	0.56
	Trest-A0252	60s ribosomal protein 110a. (NP_587891) [S. pombe]	20	0.00	-2.52	0.47	0.44
	Trest-A0553	Probable 60S ribosomal protein L22 (CAD70890) [N. crassa]	20	0.00	-2.79	0.52	0.50
	TrEST-A0681	60S ribosomal protein L3 (P59671) [N. crassa]	20	0.00	-3.42	0.27	0.11
	Trest-A0712	60S ribosomal protein L44 (L41) (P52809) [P. ja]	20	0.00	-2.48	-0.05	0.22
	Trest-A0756	60S ribosomal protein L31e (EAL89163) [A. fumigatus]	20	0.00	-2.55	0.17	0.19
	Trest-A0866	60s ribosomal protein 12 (EAL86003) [A. fumigatus]	20	0.00	-2.73	0.28	0.15
	Trest-A1844	60S ribosomal protein L32 (EAL93935) [A. fumigatus]	20	0.00	-2.58	0.77	0.85
	Trest-A2015	60s ribosomal protein 17-c. (NP_595736) [S. pombe]	20	0.00	-2.64	0.51	0.62
	Trest-A2163	40S ribosomal protein S23 (Q9HE74) [N. crassa]	20	0.00	-2.48	0.41	0.47
	TrEST-A2663	60S ribosomal protein L13 (Q90YV5) [I. punctatus]	20	0.00	-2.68	0.51	0.55
	TrEST-A2843	40S ribosomal protein S4 (S7) (059950) [Y. lipolytica]	20	0.00	-2.74	0.53	0.47
	Trest-A2850	Homology to 60S ribosomal protein L18 (NP_014098) [S. cerevisiae]	20	0.00	-2.83	0.53	0.42
	Trest-A3248	40S ribosomal protein S18-like protein (AAX07649) [M. grisea]	20	0.00	-2.62	0.03	0.24
	Trest-A3432	60s ribosomal protein 12 (NP 595879) [S. pombe]	20	0.00	-2.64	0.65	0.46
	Trest-A3445	40S ribosomal protein S5 (XP 329834) [N. crassa]	20	0.00	-2.54	0.24	0.28
	Trest-A3455	60S acidic ribosomal protein P2 (P42037) [A. alternata]	20	0.00	-2.72	0.62	0.69
	Trest-A3483	40S ribosomal protein S12 (XP 326287) [N. crassa]	20	0.00	-2.75	0.33	0.40
	Trest-A3506	Similar to 60S ribosomal protein L12 (XP 231785) [R. norvegicus]	20	0.00	-2.31	0.42	0.39
	Trest-A3716	60S ribosomal protein L3 (AF198447) [E. nidulans]	20	0.00	-3.25	0.48	0.33
	TrEST-A4084	60S ribosomal protein L14-A-like protein (AAW69343) [M. grisea]	20	0.00	-2.49	0.35	0.47
	Trest-A4086	60S ribosomal protein L33-A (L37A) (O9USX4) [S. pombe]	20	0.00	-2.48	0.62	0.64
	Trest-A4138	60S ribosomal protein L37 (O9COTI) [E. nidulans]	20	0.00	-2.53	0.43	0.40
	Trest-A4225	Probable 60S ribosomal protein L26 (CAD21040) [N. crassa]	20	0.00	-2.94	-0.03	0.22
	Trest-A4246	40S ribosomal protein S9 (S16) (EAL93345) [A. fumigatus]	20	0.00	-2.59	0.39	0.41
	Trest-A4260	60S ribosomal protein L15 (XP 328215) [N. grassa]	20	0.00	-2.64	0.42	0.16
	Trest-B06A02	Cytosolic small ribosomal subunit S15 (EAL86942) [A. fumigatus]	20	0.00	-3.13	0.85	0.58
	TrEST-B14B08	40S ribosomal protein S19 (S16) (EAA67435) [G. zeae]	20	0.00	-2.51	0.17	0.29
	Trest-B16E02	40S ribosomal protein S26E (CRP5) (P21772) [N. crassa]	20	0.00	-2.42	0.52	0.66
	Trest-B17H01	Cytosolic 60S ribosomal protein L30 (EAL93216) [A. fumigatus]	20	0.00	-2.50	0.40	0.76
	Trest-B22F11	40S ribosomal protein S7 (043105) [N. crassa]	20	0.00	-2.33	0.35	0.50
	Trest-825e08	60S acidic ribosomal protein PO (096TJ5) [N. crassa]	20	0.00	-2.47	-0.01	0.31
	TrEST-B33G02	40S ribosomal protein S24 (P14249) [R ra]	20	0.00	-2.48	0.40	0.73
	Trest-A0192	40S ribosomal protein S21 (CRP7)(XP 329751) [N. crassa]	21	0.00	-2.01	0.43	0.72
	Trest-A0632	40S ribosomal protein S9 (EAL93345) [A. fumigatus]	21	0.00	-2.25	0.52	0.36
	Trest-A0689	60S ribosomal protein L34-B-like protein (AAX07647) [M. grisea]	21	0.00	-2.19	0.00	0.21
	Trest-A1100	60S ribosomal protein L17 (XP 323005) [N. crassa]	21	0.00	-2.14	0.25	0.21
	Trest-A1150	Probable 40s ribosomal protein S6.e, cytosolic [N. crassa]	21	0.00	-2.18	0.17	0.21
	Trest-A1638	60S ribosomal protein Srp1 (AAP58401) [S. sclerotiorum]	21	0.00	-1.74	0.60	0.68
	Trest-A2187	60S ribosomal protein L39 (O6BHV8) [D. hansenii]	21	0.00	-2.16	0.52	0.60
	TrEST-A2322	40S ribosomal protein S9 (S7) (EAA70965) [G. zeae]	21	0.00	-2.22	0.40	0.38
	TrEST-A2862	60S ribosomal protein L19B (NP 587807) [S. pombe]	21	0.00	-1.99	0.27	0.33
	Trest-A4073	60S ribosomal protein L23-like protein (AAX07639) [M. grisea]	21	0.00	-2.02	0.38	0.15
	TrEST-B07B05	40S ribosomal protein S14 (P48150) [C. elegans]	21	0.00	-1.78	1.01	0.80
	TrEST-B08A11	40S ribosomal protein S7 (XP 322344) [N. crassa]	21	0.00	-2.11	0.33	0.24
	TrEST-B08C11	60S ribosomal protein L27a (L29) (EAA78050) [G. zeae]	21	0.00	-1.57	0.84	1.04
	TrEST-B12D07	Homology to 60S ribosomal protein L18a (NP 013969) [S. cerevisiae]	21	0.00	-2.11	0.51	0.58
	TrEST-B20B05	60S ribosomal protein L30-1 (L32) (P52808) [S. pombe]	21	0.00	-1.80	0.20	0.71
	TrEST-B37B02	60S ribosomal protein L36 (O9HFR7) [T. hamatum]	21	0.00	-1.75	0.49	0.61

Proteínas ribossomais	Trest-A3403	40s ribosomal protein S10a (EAL89106) [A. fumigatus]	22	0.00	-0.76	0.61	0.75
	TrEST-A2282	60S ribosomal protein L10a (P62907) [R. novergicus]	22	0.00	-1.40	0.38	0.03
	Trest-A3798	40S ribosomal protein S27 (074330) [S. pombe]	22	0.00	-1.24	0.55	0.32
	Trest-A3820	60S ribosomal protein L9-B (L8) (P51401) [S. cerevisiae]	22	0.00	-1.28	0.59	0.50
	TrEST-B12E02	60s ribosomal protein L7 subunit (NP_594185) [S. pombe]	22	0.00	-0.83	0.82	0.48
	TrEST-B17D10	60S ribosomal protein L5 (CPR4) (059953) [N. crassa]	22	0.00	-1.29	0.54	0.62
	Trest-A0387	40S ribosomal S30/ubiquitin fusion (EAL85794) [A. fumigatus]	23	0.00	-0.64	0.97	0.98
	TrEST-A0983	Probable ribosomal protein 10, cytosolic (CAD70957) [N. crassa]	23	0.00	-0.24	0.87	1.09
	TrEST-B06H01	Putative 60S ribosomal protein L35 (AAM92709) [T. aestivum]	23	0.00	-0.31	0.59	0.94
	TrEST-B14D06	60S ribosomal protein L27a (L29) (EAA78050) [G. zeae]	23	0.00	0.16	0.40	1.62
	TrEST-B25D02	60S ribosomal protein L8 (L7a) (013672) [S. pombe]	23	0.00	-0.20	1.07	1.04
	TrEST-B43A11	60S ribosomal protein L37A (AAK52799) [B. belcheri]	23	0.00	-0.34	0.14	0.92
	TrEST-B44H09	60S ribosomal protein L23-like protein (AAX07700) [M. grisea]	24	0.00	-1.16	1.14	1.15
Fatores de tradução	TrEST-A3417	Translation initiation factor eIF1; Suilp (NP_014155) [S.cerevisiae]	8	0.00	0.84	-0.57	0.26
	TrEST-A4195	Translation initiation factor SUI1 (EAL92942) [A. fumigatus]	10	0.00	0.70	-0.65	-0.03
	TrEST-B23G07	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (eRF1) (EAA76974) [G. zeae]	21	0.00	-1.75	0.30	0.53
	TrEST-A1025	Putative eIF3 subunit EifCe (EAL92445) [A. fumigatus]	22	0.00	-1.02	0.56	0.39
	TrEST-A1208	Translation release factor eRF3 (AAC01748) [P. anserina]	22	0.00	-0.52	0.52	0.13
	TrEST-A1781	Eukaryotic eiF3 subunit 6 interacting protein-like protein (AAX07645) [M. grisea]	22	0.00	-0.76	0.71	0.45
	TrEST-A3815	Elongation factor 2 (EAA77131) [G. zeae]	22	0.00	-1.11	0.49	0.17
	TrEST-B17H05	Putative sterigmatocystin biosynthesis protein stcT (Q00717) [E. nidulans]	22	0.00	-0.54	1.00	0.27
	TrEST-B39B11	Probable translation elongation factor EF-Tu, mitochondrial (CAC28833) [N. crassa]	22	0.00	-1.12	0.58	0.41
	TrTEF1	Translation elongation factor 1a (Z23012) [T. reesei]	22	0.00	-0.95	0.85	0.43
Síntese e metabolismo de tRNAs	Trest-A0538	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (Q05506) [S. cerevisiae]	10	0.00	0.49	-1.03	-0.51
	TrEST-A1878	Phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain (013432) [C. albicans]	18	0.00	-1.10	-0.46	-0.75
	TrEST-A3843	Leucyl-tRNA synthetase, mitochondrial precursor (P15181) [N. crassa]	18	0.00	-1.46	-1.00	-0.76
	Trest-b25A02	Probable isoleucyl-trna synthetase (CAD29604) [A. fumigatus]	19	0.00	-1.18	0.08	-0.98
	Trest-A0265	Putative lysyl-trna synthetase (NP_595892) [S. pombe]	22	0.00	-0.91	0.53	-0.18
<u>Síntese de RNA</u>							
Processamento de RNA	TrEST-A1624	rRNA intron-encoded homing endonuclease (AAK13589) [O. sativa]	7	0.00	1.87	0.87	-0.29
	Trest-A4276	Probable ATP-dependent RNA helicase DBP3 (Helicase CA3) (P20447) [S. cerevisiae]	18	0.00	-1.13	-1.11	-1.02
	TrEST-A4151	Putative helicase C6F12.16c (014232) [S. pombe]	23	0.00	-0.43	0.84	0.95
Fatores transcricionais	TrEST-A3454	Transcription factor (CAC88374) [H. jecorina]	4	0.00	1.27	1.51	1.33
	TrEST-A0314	ATF/CREB-family transcription factor atf21 (T40132) [S. pombe]	5	0.00	0.95	1.13	-0.07
	TrEST-A0464	Related to cAMP-dependent transcription factor atf-2 (CAD70949) [N. crassa]	5	0.00	1.12	1.67	0.36
	TrEST-A4069	Related to transcription activator amyR (CAC28588) [N. crassa]	5	0.00	0.94	2.50	0.63
	TrEST-A1599	Sulfur metabolite repression control protein (EAA58743) [A. nidulans]	16	0.00	-1.22	-1.25	-1.95
	TrEST-A3600	Transcription factor (CAC88374) [H. jecorina]	20	0.00	-3.01	0.27	0.23
	TrEST-A0013	Putative transcription factor (Snd1/p100) (EAL91676) [A. fumigatus]	23	0.00	0.41	0.61	1.88
Não-classificada							
Outros genes	Trest-A3021	Ypt-interacting protein yop-1 (Q871R7) [N. crassa]	2	0.00	3.05	2.57	2.85
	Trest-A0896	Putative senescence-associated protein (BAB33421) [P. sativum]	4	0.00	1.32	1.41	1.65
	TrEST-A1949	FAD-dependent oxidoreductase-like protein (AAX07713) [M. grisea]	5	0.00	1.33	1.41	0.19
	TrEST-A1854	MSP1 protein (TAT-binding homolog 4) (P28737) [S. cerevisiae]	8	0.00	0.88	-0.19	0.52
	Trest-A0310	Hypothetical protein (XP_324581) [N.crassa]	10	0.00	0.78	-0.52	-0.91

Função	Clone ID & Ide	ntificação	Grupo	noN 0 min	noN 120 min	N 30 min	N 60 min
Não-classificada							
Outros genes	Trest-A1902	Aldo/keto reductase family oxidoreductase (NP_594384) [S. pombe]	10	0.00	0.58	-0.87	-0.43
	TrEST-A2106	Putative glycosyl transferase (EAL86644) [A. fumigatus]	10	0.00	0.18	-1.12	-0.43
	TrEST-A3941	Putative mitochondrial DNA replication protein (Yhm2) (EAL85883) [A. fumigatus]	10	0.00	0.55	-0.77	-0.12
	TrEST-B20F07	Putative lectin family integral membrane protein (EAL93512) [A. fumigatus]	10	0.00	0.32	-0.72	0.13
	Trest-A0700	Related to tol protein (CAB98221) [N. crassa]	12	0.00	-1.84	-2.42	-2.31
	Trest-A0954	Alcohol dehydrogenase, zinc-containing (EAL86477) [A. fumigatus]	12	0.00	-1.97	-1.65	-2.49
	TrEST-A1904	Integral membrane protein [A. fumigatus]	14	0.00	-2.85	-3.15	-2.87
	TrEST-A0922	Haemolysin-III family protein (EAL92524) [A. fumigatus]	16	0.00	-1.12	-1.67	-2.01
	TrEST-A1576	Conserved hypothetical protein (EAL92224) [A. fumigatus]	17	0.00	-1.61	-0.95	-1.69
	Trest-A3592	Stomatin-like protein (BAB68403) [G. fujikuroi]	20	0.00	-2.53	0.54	0.57
	TrEST-B33C02	Chlorophyll a-b binding protein 91R (LHCP) (P04783)	20	0.00	-2.65	0.63	0.80
	Trest-A3687	Related to rasp f 7 allergen (CAD70798) [N. crassa]	24	0.00	0.11	1.21	2.01
<u>Desconhecida</u>							
Relacionados a ORFs putativas	Trest-A2986	Hypothetical protein FG01026.1 (EAA67844) [G. zeae]	2	0.00	3.14	2.83	3.13
	Trest-A0334	Hypothetical protein FG09552.1 (EAA77109) [G. zeae]	3	0.00	1.93	2.93	0.98
	Trest-A0834	Predicted protein (EAA33307) [N. crassa]	3	0.00	1.59	2.46	0.89
	TrEST-A2035	Predicted protein (XP_329036) [N. crassa]	3	0.00	1.84	2.88	0.84
	TrEST-A0326	Hypothetical protein FG09503.1 (EAA76292) [G. zeae]	4	0.00	1.06	1.14	0.67
	TrEST-A0889	Hypothetical protein FG00314.1 (EAA68704) [G. zeae]	4	0.00	1.61	1.34	2.49
	TrEST-A1185	Hypothetical protein FG06189.1 (EAA74545) [G. zeae]	4	0.00	1.24	0.92	0.64
	TrEST-A2445	Hypothetical protein FG05653.1 (EAA75224) [G. zeae]	4	0.00	1.96	1.45	1.20
	Trest-A3430	Hypothetical protein FG02859.1 (EAA72359) [G. zeae]	4	0.00	1.51	1.39	1.08
	TrEST-A3998	Hypothetical protein FG09950.1 (EAA67688) [G. zeae]	4	0.00	1.05	1.17	0.95
	TrEST-A4005	Hypothetical protein MG01306.4 (EAA55655) [M. grisea]	4	0.00	1.02	1.16	0.89
	TrEST-B39A04	Hypothetical protein MG02573.4 () [M. grisea]	4	0.00	1.08	1.30	1.00
	TrEST-A0087	Putative MFS transporter (EAL85766) [A. fumigatus]	4	0.00	1.66	0.33	1.59
	TrEST-A0459	Hypothetical protein FG08467.1 (EAA70782) [G. zeae]	5	0.00	1.16	1.32	0.63
	Trest-A3935	Hypothetical protein MG00432.4 (EAA48774) [M. grisea]	5	0.00	0.82	1.69	-0.72
	Trest-A1000	Hypothetical protein MG02574.4 (EAA47331) [M. grisea]	6	0.00	2.99	0.60	1.30
	TrEST-A2501	DUF895 domain membrane protein (EAL85180) [A. fumigatus]	6	0.00	3.72	2.44	0.54
	Trest-A4046	Conserved fungal protein () [A. fumigatus]	6	0.00	4.06	1.05	-0.29
	Trest-A0150	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	7	0.00	1.95	0.33	0.04
	TrEST-A1593	Hypothetical protein FG10260.1 (EAA69958) [G. zeae]	7	0.00	2.01	0.60	-0.26
	Trest-A3863	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	7	0.00	2.44	0.32	0.27
	TrEST-A0275	Predicted protein (EAA76942) [G. zeae]	8	0.00	0.99	-0.20	0.76
	TrEST-A0694	Hypothetical protein FG09552.1 (EAA77109) [G. zeae]	8	0.00	1.14	-0.41	0.93
	Trest-A0787	Hypothetical protein FG09308.1 (EAA76055) [G. zeae]	8	0.00	1.05	0.84	0.46
	Trest-A2559	Conserved hypothetical protein (CAC18240)	8	0.00	1.06	-0.43	0.18
	TrEST-A2812	Hypothetical protein FG01555.1 (EAA68510) [G. zeae]	8	0.00	1.31	0.30	0.28
	Trest-A3280	Hypothetical protein (XP_322321) [N. crassa]	8	0.00	1.33	0.45	0.41
	Trest-A3491	Hypothetical protein FG04478.1 (EAA73262) [G. zeae]	8	0.00	1.34	0.01	0.40
	TrEST-A3821	Putative integral membrane protein, Mpv17/PMP22 family (EAL90362) [A. fumigatus]	8	0.00	1.39	-0.07	0.33
	TrEST-B11D07	Hypothetical protein (XP_327057) [N. crassa]	8	0.00	1.27	0.47	0.50
	TrEST-B33F12	Probable membrane protein YMR292w (Q03554) [S. cerevisiae]	8	0.00	0.73	-0.45	0.62
	TrEST-A2637	Hypothetical protein FG08396.1 (EAA71148) [G. zeae]	9	0.00	1.16	0.74	-0.87
	Trest-A0030	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.79	0.75	-1.07
	TrEST-A0317	Putative protein (CAD71042) [N. crassa]	9	0.00	0.57	0.55	-1.16
			-				-

Relacionados a ORFs putativas	Trest-A0437	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.74	0.71	-1.49
	Trest-A0456	Hypothetical protein FG01141.1 (EAA68421) [G. zeae]	9	0.00	0.38	0.11	-0.68
	Trest-A0525	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.64	0.56	-1.93
	Trest-A0555	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.61	0.57	-1.63
	Trest-A0860	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.74	0.74	-1.70
	Trest-A0962	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.73	0.72	-1.58
	TrEST-A1008	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.64	0.59	-1.34
	Trest-A1020	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.49	0.42	-1.86
	Trest-A1028	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.56	0.51	-1.74
	TrEST-A1181	Hypothetical protein FG09906.1 (EAA70132) [G. zeae]	9	0.00	0.76	0.75	-1.59
	Trest-A1238	Hypothetical protein FG09906.1 (EAA70132) [G. zeae]	9	0.00	0.77	0.71	-1.30
	TrEST-A2567	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.70	0.66	-1.71
	Trest-A2618	Hypothetical protein FG01267.1 (EAA70576) [G. zeae]	9	0.00	0.53	1.00	-0.85
	Trest-A2854	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.51	0.41	-1.18
	Trest-A3117	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.78	0.77	-1.64
	Trest-A3146	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	9	0.00	0.63	0.60	-1.65
	Trest-A3191	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.51	0.44	-1.94
	Trest-A3573	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	9	0.00	0.67	0.68	-1.40
	Trest-A3794	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	9	0.00	0.81	0.80	-1.31
	Trest-A0007	Hypothetical protein FG07892.1 (EAA77264) [G. zeae]	10	0.00	0.53	-1.03	-0.39
	Trest-A0115	Hypothetical protein FG08440.1 (EAA71917) [G. zeae]	10	0.00	0.39	-0.44	-0.80
	Trest-A1280	Predicted protein (XP_324663) [N. crassa]	10	0.00	0.92	-0.73	-0.96
	Trest-A1360	Hypothetical protein MG05446.4 (EAA54654) [M. grisea]	10	0.00	0.58	-1.10	-0.37
	Trest-A1637	Hypothetical protein FG02564.1 (EAA68807) [G. zeae]	10	0.00	0.55	-0.66	-0.29
	Trest-A2317	Hypothetical protein FG00935.1 (EAA67712) [G. zeae]	10	0.00	0.68	-0.67	-0.15
	Trest-A3916	Hypothetical protein FG04153.1 (EAA70807) [G. zeae]	10	0.00	0.37	-1.43	0.09
	TrEST-B19E03	Hypothetical protein FG06558.1 (EAA78343) [G. zeae]	10	0.00	0.42	-1.23	-0.62
	Trest-A1094	Hypothetical protein FG06539.1 (AA78324) [G. zeae]	11	0.00	-0.52	-1.67	-0.96
	Trest-A3427	Hypothetical protein FG09205.1 (EAA77045) [G. zeae]	11	0.00	-0.13	-0.65	-1.15
	Trest-A3733	Hypothetical protein MG09899.4 (EAA46678) [M. grisea]	11	0.00	0.74	-3.00	-2.20
	Trest-A3946	Hypothetical protein FG10202.1 (EAA70045) [G. zeae]	11	0.00	0.36	-1.41	-1.85
	Trest-A4133	Hypothetical protein FG00855.1 (EAA70448) [G. zeae]	11	0.00	-0.25	-0.40	-1.48
	Trest-A0009	Hypothetical protein FG04866.1 (EAA74194) [G. zeae]	12	0.00	-1.65	-2.58	-1.74
	Trest-A2918	Hypothetical protein AN2628.2 (EAA62975) [A. nidulans]	13	0.00	-3.59	-5.21	-4.30
	Trest-A2904	Predicted protein (XP_322451) [N. crassa]	14	0.00	-3.25	-3.61	-3.32
	Trest-A3619	Hypothetical protein (XP_328245) [N. crassa]	14	0.00	-2.93	-3.62	-3.20
	Trest-A2382	Predicted protein (XP_325975) [N. crassa]	15	0.00	-2.76	-2.26	-2.54
	Trest-A3513	Predicted protein (EAA30746) [N. crassa]	15	0.00	-2.81	-2.27	-2.60
	Trest-A2915	Hypothetical protein FG02456.1 (EAA70531) [G. zeae]	16	0.00	-1.05	-1.62	-1.69
	Trest-A0779	Hypothetical protein FG10755.1 (EAA75012) [G. zeae]	17	0.00	-2.59	-0.40	-1.13
	Trest-A3311	Probable gamma-butyrobetaine dioxygenase (Q98KKO)	17	0.00	-1.71	-1.09	-1.71
	Trest-A4228	GPR/FUN34 family protein (EAL87502) [A. fumigatus]	17	0.00	-2.10	-0.93	-1.48
	Trest-A0064	Hypothetical protein FG06697.1 (EAA77633) [G. zeae]	18	0.00	-1.16	-0.76	-0.78
	TrEST-A1229	Hypothetical protein MG06601.4 (EAA56630) [M. grisea]	18	0.00	-1.20	-0.81	-0.48
	TrEST-A2651	Hypothetical protein FG04780.1 (EAA75739) [G. zeae]	18	0.00	-1.08	-1.37	-0.91
	Trest-A3914	Hypothetical protein FG02131.1 (EAA69762) [G. zeae]	18	0.00	-1.05	-1.44	-0.94
	Trest-A4016	Hypothetical protein FG07229.1 (EAA77827) [G. zeae]	18	0.00	-1.16	-0.57	-1.01
	Trest-A4048	Hypothetical protein FG01472.1 (EAA67585) [G. zeae]	18	0.00	-1.15	-0.86	-1.01
	TrEST-A0193	Predicted protein (XP_323446) [N. crassa]	19	0.00	-1.02	-0.81	-0.13

Relacionados a ORFs putativas	Trest-A0398	Hypothetical protein FG00415.1 (EAA68764) [G. zeae]	19	0.00	-1.07	-0.90	0.24
	Trest-A0788	Hypothetical protein FG10744.1 (EAA75001) [G. zeae]	19	0.00	-1.57	0.03	-0.03
	Trest-A3824	Hypothetical protein (XP_324614) [N. crassa]	19	0.00	-1.21	-0.41	-0.42
	Trest-A3825	Hypothetical protein FG08885.1 () [G. zeae]	19	0.00	-1.19	-0.66	-0.32
	TrEST-A1688	Hypothetical protein MG09211.4 (EAA55404) [M. grisea]	20	0.00	-2.77	0.46	0.45
	TrEST-A3987	Hypothetical protein MG05021.4 (EAA52329) [M. grisea]	20	0.00	-3.12	-0.09	0.05
	TrEST-A4221	Hypothetical protein FG03903.1 (EAA73371) [G. zeae]	21	0.00	-1.78	0.23	0.36
	TrEST-B18F01	Putative protein (CAC28806) [N. crassa]	21	0.00	-2.08	0.12	0.66
	TrEST-B37C07	Hypothetical protein FG08888.1 (EAA72062) [G. zeae]	21	0.00	-1.99	0.21	0.14
	Trest-A0451	Hypothetical protein (XP_326319) [N. crassa]	22	0.00	-0.79	0.90	0.47
	TrEST-B14D12	Hypothetical protein MG07175.4 (EAA56820) [M. grisea]	22	0.00	-1.15	0.80	0.99
	Trest-A0088	Hypothetical protein FG01059.1 (EAA69205) [G. zeae]	23	0.00	-0.08	1.26	1.26
	TrEST-A0821	Hypothetical protein FG06664.1 (EAA77600) [G. zeae]	23	0.00	-0.24	1.10	0.47
	Trest-A1748	Hypothetical protein MG04965.4 (EAA52273) [M. grisea]	23	0.00	-0.11	0.56	1.15
	TrEST-A1994	Predicted protein (XP_331725) [N. crassa]	23	0.00	-0.16	1.04	0.78
	Trest-A4130	Hypothetical protein FG01026.1 (EAA67844) [G. zeae]	23	0.00	-0.51	1.43	0.39
	TrEST-B34D05	Hypothetical protein AN2200.2 (EAA63857) [A. nidulans]	25	0.00	-2.72	1.02	1.82
Sem Seqüência Similar	Trest-A1595		1	0.00	6.23	5.67	6.04
	Trest-A2146		1	0.00	5.39	5.48	5.07
	Trest-A3707		1	0.00	5.77	5.25	5.67
	Trest-A4253		1	0.00	6.24	6.66	6.61
	Trest-A0200		2	0.00	3.07	3.03	1.96
	Trest-A1537		2	0.00	4.64	3.28	3.48
	Trest-A3046		2	0.00	4.01	3.64	4.14
	TrEST-B06C07		2	0.00	3.34	3.39	3.31
	TrEST-B22H02		2	0.00	1.52	3.73	3.58
	Trest-A0003		3	0.00	2.32	2.59	1.82
	Trest-A0113		3	0.00	1.76	2.80	1.51
	TrEST-A0319		3	0.00	1.87	2.73	2.55
	TrEST-A1751		3	0.00	1.76	2.61	2.27
	TrEST-A1883		3	0.00	1.62	2.63	0.75
	Trest-A2354		3	0.00	2.29	2.62	2.22
	TrEST-B11C04		3	0.00	1.56	2.58	2.33
	TrEST-A0120		4	0.00	1.11	1.37	1.17
	TrEST-A1050		4	0.00	1.36	1.52	2.00
	Trest-A1059		4	0.00	1.41	0.73	0.66
	Trest-A1066		4	0.00	2.17	0.72	1.48
	Trest-A2965		4	0.00	1.38	1.52	1.77
	TrEST-A3019		4	0.00	1.70	1.38	1.70
	Trest-A3520		4	0.00	1.01	1.33	1.11
	TrEST-B07H11		4	0.00	1.18	0.68	1.56
	TrEST-B28G11		4	0.00	1.43	1.63	2.05
	TrEST-B35G01		4	0.00	1.67	1.20	0.95
	Trest-A0618		5	0.00	1.27	2.02	0.56
	Trest-A1031		5	0.00	1.28	1.93	0.35
	Trest-A1035		5	0.00	1.60	1.46	0.09
	Trest-A1077		5	0.00	1.12	1.75	0.15
	Trest-A1465		5	0.00	0.32	1.66	-0.56
	Trest-A3074		5	0.00	0.72	1.42	-0.31

Sem Següência Similar	Trest-A3267	5	0.00	1.09	1.65	0.28
	Trest-A1285	6	0.00	3.19	2.26	1.36
	TrEST-A1602	6	0.00	2.89	0.50	1.48
	Trest-A1872	7	0.00	2.48	-0.35	0.54
	Trest-A1893	7	0.00	2.62	-0.04	-0.35
	Trest-821807	7	0.00	2.93	-0.35	0.56
	TrEST-A0138	8	0.00	1.13	0.76	0.60
	TrEST-A0283	8	0.00	0.82	-0.54	0.57
	Trest-A0571	8	0.00	1.30	0.59	0.39
	Trest-A0695	8	0.00	0.83	-0.54	0.56
	Trest-A0828	8	0.00	0.61	-0.50	0.38
	TreST-A0961	8	0.00	1.25	-0.20	0.14
	Trest-A1449	8	0.00	1.01	0.51	0.36
	Trest-A1511	8	0.00	1.04	0.30	-0.12
	Trest-Al632	8	0.00	1.31	0.62	0.77
	Trest-Al662	8	0.00	0.87	0.34	-0.14
	Trest-A1851	8	0.00	0.70	-0.51	0.30
	Trest-A1879	8	0.00	1.01	0.64	0.75
	Trest-A3956	8	0.00	0.87	0.39	-0.19
	Trest-B17A08	8	0.00	0.74	-0.32	-0.13
	Trest-82809	8	0.00	1.28	0.12	0.38
	TreST-B40E09	8	0.00	0.83	-0.09	-0.18
	Trest-b41H02	8	0.00	1.06	0.41	0.13
	Trest-a0444	9	0.00	0.52	0.49	-1.82
	Trest-A1719	9	0.00	0.30	0.18	-2.23
	Trest-A1775	9	0.00	0.57	0.54	-1.61
	Trest-A2961	9	0.00	0.60	0.52	-1.85
	Trest-A3649	9	0.00	0.48	0.38	-1.59
	Trest-B06F07	9	0.00	0.77	0.58	-0.62
	Trest-A0066	10	0.00	0.28	-1.13	-0.62
	Trest-A0225	10	0.00	1.16	-1.05	0.06
	Trest-A0277	10	0.00	0.27	-0.73	-0.79
	Trest-A0594	10	0.00	-0.14	-2.03	-0.21
	Trest-A0629	10	0.00	0.64	-0.52	-0.28
	Trest-A0687	10	0.00	0.72	-0.67	-0.15
	Trest-A2607	10	0.00	0.80	-0.89	-0.53
	Trest-A2889	10	0.00	0.48	-1.13	-0.62
	Trest-A3270	10	0.00	0.58	-1.06	-0.53
	Trest-A3559	10	0.00	0.04	-1.23	-0.67
	Trest-A3844	10	0.00	0.79	-0.37	-0.63
	Trest-A3920	10	0.00	1.10	-0.54	-0.59
	Trest-A4210	10	0.00	0.19	-1.22	-0.48
	Trest-A4281	10	0.00	0.31	-0.88	-0.59
	Trest-B07G05	10	0.00	0.15	-1.01	-0.23
	Trest-B09D12	10	0.00	0.49	-0.19	-0.55
	Trest-B38F03	10	0.00	0.80	-0.65	-0.34
	Trest-B43C02	10	0.00	0.40	-0.71	-0.78
	Trest-A1670	11	0.00	-0.32	-1.35	-1.38
	Trest-A1667	12	0.00	-2.00	-1.96	-2.19

Sem Seqüência Similar	TrEST-A2505		12	0.00	-1.90	-2.12	-2.15
	TrEST-B41A05		12	0.00	-1.35	-1.91	-2.07
	Trest-A0878		13	0.00	-3.69	-5.40	-4.57
	Trest-A0940		13	0.00	-3.80	-5.45	-4.72
	Trest-A2332		13	0.00	-3.75	-5.56	-4.70
	Trest-A1651		14	0.00	-3.03	-4.17	-3.91
	TrEST-A2491		14	0.00	-2.02	-3.97	-3.42
	TrEST-A3548		14	0.00	-3.05	-4.18	-3.69
	TrEST-A3846		14	0.00	-2.95	-3.01	-2.96
	Trest-A0883		15	0.00	-3.59	-2.44	-2.08
	Trest-A3655		15	0.00	-2.88	-2.45	-2.28
	Trest-A0068		16	0.00	-1.43	-1.62	-1.85
	Trest-A0109		16	0.00	-1.43	-1.23	-1.30
	TrEST-A0175		16	0.00	-1.81	-1.91	-0.65
	TrEST-A0996		16	0.00	-1 25	-2 16	-1 00
	TrEST-11629		16	0.00	-2 14	-1 51	-1 71
	Trest_13055		16	0.00	-1.96	-2.00	-1 33
	TrEST_B22C07		16	0.00	-1.96	-1 45	-1.00
	TTEST-B22C07		10	0.00	-1.30	-1.45	-1.20
	TTEST-B33001		10	0.00	-1.57	-0.97	-1.31
	TILSI-AZI/S		17	0.00	-1.57	-0.97	-1.77
	TIESI-B41007		17	0.00	-2.00	-1.55	-0.93
	TTEST-A1822		10	0.00	-1.05	-0.83	-0.05
	TILSI-A2799		10	0.00	-1.51	-0.93	-1.10
	TrEST-A2968		18	0.00	-1.82	-0.62	-0.80
	TrEST-A2998		18	0.00	-1.04	-1.11	-0.05
	Trest-A3136		18	0.00	-1.37	-1.25	-1.10
	1rES1-A4170		18	0.00	-1.64	-0.36	-0.72
	TrEST-BOSEO1		18	0.00	-1.10	-0.61	-1.09
	TrEST-B41D12		18	0.00	-1.77	-1.14	-0.89
	TrEST-B41H11		18	0.00	-1.10	-1.08	-1.19
	TrEST-A0822		19	0.00	-0.98	-0.45	0.42
	Trest-A4034		19	0.00	-1.32	-0.46	0.17
	TrEST-B07F08		19	0.00	-1.35	-0.22	0.02
	TrEST-B16D08		19	0.00	-1.43	-0.52	-0.22
	TrEST-B18G02		19	0.00	-1.19	-0.70	0.49
	TrEST-B20G02		19	0.00	-1.08	-0.58	0.26
	TrEST-B41C02		19	0.00	-1.56	-0.20	-0.08
	TrEST-B43E09		19	0.00	-1.03	-0.76	-0.23
	TrEST-B44A12		19	0.00	-1.31	-0.49	-0.22
	TrEST-A0583		20	0.00	-2.54	0.47	0.54
	Trest-A2868		20	0.00	-2.56	0.41	0.57
	TrEST-B08C07		20	0.00	-2.38	0.34	-0.05
	TrEST-B22B07		20	0.00	-3.07	0.31	0.17
	TrEST-B28D02		20	0.00	-3.12	0.29	-0.55
	TrEST-B41B03		20	0.00	-2.59	-0.17	-0.12
	TrEST-B41E03		20	0.00	-2.54	0.12	0.31
	TrEST-B41F08		20	0.00	-2.70	0.30	0.48
	TrEST-B10D10		21	0.00	-1.66	0.44	0.52
	TrEST-B12H02		21	0.00	-1.68	0.27	0.87

Sem Següência Similar	TrEST-B18E12		21	0.00	-2.04	0.76	0.69
	TrEST-B18F09		21	0.00	-1.99	0.66	0.73
	TrEST-B19E10		21	0.00	-1.97	0.96	0.69
	TrEST-B33H11		21	0.00	-2.22	0.34	0.48
	TrEST-B39E01		21	0.00	-1.54	0.33	0.31
	TrEST-B41B08		21	0.00	-2.03	0.09	0.21
	TrEST-B41D02		21	0.00	-2.31	0.77	0.77
	TrEST-B41H07		21	0.00	-1.55	0.23	0.42
	TrEST-B43C12		21	0.00	-1.88	0.09	0.34
	TrEST-B44D09		21	0.00	-1.49	0.39	0.57
	Trest-A2548		22	0.00	-1.37	0.77	0.02
	Trest-A2609		22	0.00	-1.12	0.99	0.79
	Trest-A2894		22	0.00	-1.13	0.34	0.37
	Trest-A3375		22	0.00	-1.32	0.70	0.62
	Trest-A4027		22	0.00	-1.38	0.61	0.49
	Trest-A4220		22	0.00	-0.72	-0.11	0.64
	Trest-B09H06		22	0.00	-0.78	-0.05	0.37
	TrEST-B10H03		22	0.00	-1.05	0.26	0.32
	TrEST-B16B07		22	0.00	-1.28	0.55	0.61
	TrEST-B18C11		22	0.00	-1.31	0.76	0.66
	TrEST-B21D12		22	0.00	-0.85	0.60	0.72
	TrEST-B22D10		22	0.00	-0.97	0.44	0.46
	TrEST-B23F08		22	0.00	-0.88	0.53	0.81
	TrEST-B33H09		22	0.00	-1.43	0.42	0.58
	TrEST-B37B12		22	0.00	-1.06	0.36	0.52
	TrEST-B38A02		22	0.00	-0.88	0.38	0.68
	TrEST-B38F11		22	0.00	-0.89	0.63	0.60
	TrEST-B41A09		22	0.00	-0.92	0.55	0.43
	TrEST-B41C06		22	0.00	-1.08	0.36	0.52
	TrEST-B41F03		22	0.00	-0.91	0.78	0.53
	TrEST-B43E10		22	0.00	-1.04	0.25	0.48
	TrEST-A1222		23	0.00	0.24	0.52	1.63
	Trest-A3033		23	0.00	0.25	0.46	1.59
	Trest-A3387		23	0.00	-0.39	0.34	1.26
	Trest-A4038		23	0.00	-0.44	0.71	1.01
	TrEST-B09C11		23	0.00	-0.34	0.81	1.18
	TrEST-B16B10		23	0.00	-0.42	0.74	0.68
	TrEST-B34H04		23	0.00	-0.54	0.91	0.74
	TrEST-B39C04		23	0.00	0.08	0.46	1.30
	TrEST-B41C07		23	0.00	-0.20	0.61	1.10
	TrEST-A2367		24	0.00	0.12	1.68	1.21
	Trest-A2747		24	0.00	-0.29	2.25	1.79
	TrEST-B33B06		24	0.00	-1.09	1.34	1.27
	TrEST-B33H12		24	0.00	-0.74	1.52	1.85
	TrEST-B12G08		25	0.00	-2.50	1.82	1.96

Tabela 11: Dados de expressão do experimento de Limitação de Fonte de Carbono e Pulso de Glicose. Os clones 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 seqüência similar mais relevante e o organismo da qual proveio. Os dados de expressão são o grupo de padrão de expressão e os valores do logaritmo, na base 2, da razão das fluorescências normalizadas para os pontos de 2 horas sem fonte de carbono, e 30 e 90 minutos após a adição de glicose para concentração final de aproximadamente 110 mmol/L.

Função	Clone ID & Identificação		Grupo	Glu1%	noC 120 min	C 30 min	C 90 min
<u>Defesa Celular</u>							
Detoxificação	TrEST-A1642	Probable protein disulfide-isomerase precursor (T47259) [N. crassa]	8	0.00	0.16	0.63	1.21
3	TrEST-A1697	Putative heavy metal ion transporter (EAL90217) [A. fumigatus]	9	0.00	0.11	2.61	1.05
	TrEST-A3343	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial precursor (Q9Y783) [N. crassa]	10	0.00	-0.01	1.70	0.55
	TrEST-A1817	Aureobasidin A resistance protein homolog (Q10142) [S. pombe]	13	0.00	0.21	2.12	-1.71
	TrEST-A2590	Antioxidant protein LsfA (EAL89931) [A. fumigatus]	15	0.00	-0.17	0.83	-1.88
	TrEST-A0803	Monooxygenase (EAL84931) [A. fumigatus]	16	0.00	-0.04	-0.34	-1.10
	TrEST-A3699	Related to phenol 2-monooxygenase (CAE76270) [N. crassa]	16	0.00	0.26	-0.07	-0.84
Resposta a estresse	TrEST-B16D11	Related to Hsp90 associated co-chaperone (CAD21185) [N. crassa]	11	0.00	-0.35	0.99	0.17
	TrEST-A0004	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	13	0.00	0.14	1.27	-1.15
	TrEST-A0074	Heat shock protein Hsp98 (P31540) [N. crassa]	14	0.00	0.03	0.78	-1.05
	Trest-A3340	30 kDa heat shock protein (P19752) [N. crassa]	15	0.00	-0.09	0.57	-1.72
Divisão Celular							
Ciclo celular	Trest-A0423	Checkpoint forkhead associated with RING 2 (DAA05594) [S. cerevisiae]	9	0.00	-0.09	2.87	1.14
	TrEST-A2337	Topisomerase II associated protein Patl homolog (EAL91531) [A. fumigatus]	10	0.00	0.17	1.30	0.97
	TrEST-A0139	Related to cell cycle regulation and aging protein (CAE76477) [N. crassa]	11	0.00	-0.06	0.99	-0.08
Estrutura do cromossomo	Trest-A3720	Histone H4 (EAA65376) [A. nidulans]	10	0.00	0.20	1.22	0.84
Sinalização celular							
Canais e proteinas de transporte	TrEST-A1513	Putative transport protein (NP_588478) [S. pombe]	10	0.00	0.02	1.27	1.03
	TrEST-A3656	Putative transmembrane transporter (NP_595211) [S. pombe]	14	0.00	0.27	0.78	-1.33
Efetores e moduladores	TrEST-A3985	Rabl1 binding protein (AAD21616) []	16	0.00	0.04	-0.32	-1.19
Sinalizadores intracelulares	TrEST-A1694	G protein alpha subunit (AAO18659) [H. virens]	14	0.00	0.00	0.32	-1.03
Modificação protéica	TrEST-A2346	Negative regulator of sexual conjugation and meiosis (Ran1) (P08092) [S. pombe]	18	0.00	0.69	-0.63	0.41
Estrutura Celular							
Parede celular	TrEST-A1272	Hydrophobin II precursor (HFBII) (P79073) [T. reesei]	10	0.00	-0.23	1.31	0.88
	TrEST-A3010	Trihydrophobin precursor (CFTH1) (Q9UVI4) [C. fusiformis]	10	0.00	-0.15	1.23	0.67
	TrHFB2	Hydrophobin II (Y11894) [T. reesei]	10	0.00	-0.23	1.40	1.15
	TrEST-A3572	Probable family 17 glucosidase SCWll precursor (P53189) [S. cerevisiae]	11	0.00	-0.02	1.25	-0.23
Citoesqueleto	TrEST-B15F04	Actin (P78711) [N. crassa]	11	0.00	-0.22	1.16	-0.35
<u>Metabolismo</u>							
Aminoácidos	TrEST-A0061	Probable branched-chain amino acids aminotransferase (CAC18611) [N. crassa]	10	0.00	0.27	1.47	1.00
	TrEST-A2564	4-Aminobutyrate aminotransferase (EAL91927) [A. fumigatus]	10	0.00	0.07	1.54	1.00
	TrEST-A3986	Probable carbamoyl-phosphate synthase large chain (CAE76486) [N. crassa]	10	0.00	-0.03	1.21	1.13
	TrEST-B43C07	Alpha-ketoglutarate-dependent taurine dioxygenase (EAL92780) [A. fumigatus]	12	0.00	-0.37	1.91	-3.98
	TrEST-B40C09	3-Isopropylmalate dehydrogenase (IMDH) (P34738) [N. crassa]	17	0.00	0.01	-0.53	-2.03
Cofatores	TrEST-A0231	Pyridoxine biosynthesis protein Pdx1 (059905) [C. nicotianae]	7	0.00	-0.20	2.13	1.56
	TrEST-A3766	Thiamine biosynthesis protein NMT-1 (AAG23338) [N. crassa]	7	0.00	0.25	1.67	2.01
	TrEST-B18C03	Cl tetrahydrofolate synthase (Cl-THFS) (EAL92712) [A. fumigatus]	8	0.00	-0.04	0.69	0.97
	TrEST-A3414	Probable coproporphyrinogen III oxidase (Q9UTE2) [S. pombe]	11	0.00	0.27	1.33	0.16

<u>Metabolismo</u>

Energia e ciclo do TCA	TrCIT	Citrate synthase [T. reesei]	11	0.00	-0.10	1.00	0.52
	TrEST-A4311	ATP synthase 9 (CAC27323) [C. gloeosporioides]	11	0.00	-0.11	1.38	-0.05
	TrEST-B25G04	Citrate synthase, mitochondrial precursor (000098) [E. nidulans]	11	0.00	-0.32	0.71	0.02
	Trest-A2977	Putative pyruvate decarboxylase (Q09737) [S. pombe]	13	0.00	0.17	1.29	-0.99
	TrEST-A3975	Alternative oxidase precursor (ALTOX) (Q01355) [Neurospora crassa]	16	0.00	0.75	-0.28	-0.52
	TrSUCCOA	Succinyl-CoA synthetase [T. reesei]	18	0.00	-0.04	-1.42	0.20
	TrYGR.	Succinyl-CoA synthetase [T. reesei]	20	0.00	-0.13	-1.55	-0.19
Gliconeogênesis	TrEST-A3061	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (AAP13543) [C. bassiana]	4	0.00	1.29	-0.85	1.00
-	TrPCK	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [T. reesei]	18	0.00	1.09	-1.16	0.52
Ciclo do glioxilato	TrICL	Isocitrate lyase [T. reesei]	5	0.00	2.43	-0.02	2.24
Lipídeos	TrEST-A2798	Probable 3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (CAE76156) [N. crassa]	6	0.00	1.27	0.30	2.82
	TrEST-A2142	Probable leukotriene A-4 hydrolase (Q10740) [S. cerevisiae]	8	0.00	0.22	0.81	1.40
	TrEST-A0439	Epoxide hydrolase (AAM77995) [S. carzinostaticus]	10	0.00	0.19	1.89	0.96
	Trest-A4057	Related to SREBP cleavage activating protein (CAB88621) [N. crassa]	15	0.00	0.21	1.02	-1.96
	Trest-A1254	Oxysterol binding protein-like protein (AAW69321) [M. grisea]	18	0.00	0.29	-0.74	-0.20
	Trest-A3165	NADP-dependent leukotriene b4 12-hydroxydehydrogenase (AAC24957) [B. fuckeliana]	20	0.00	-0.06	-1 15	-0.38
	TrEST-A3673	Fatty acid synthase subunit alpha (P15368) [P. griseofulyum]	20	0.00	-0.18	-1.82	-0.46
Nucleotídeos	TrEST-A3671	Nucleoside diphosphate kinase (AAP85295) [A. fumigatus]	10	0.00	-0.20	1.02	0.10
	TrEST-A0264	Aldebyde debydrogenase (ALDDH) (P4204) [A alternata]	10	0.00	-0.20	1.27	2.74
Açucales e glicolise	TrEST-A1305	Fructose-1 6-binboshate aldolase (ALI, 44519) [D. brasiliensis]	0	0.00	0.00	0.89	1 22
	TrEST-A1895	Enclase (JakS1201) [D_citrinum]	0	0.00	0.00	0.03	0.17
	TrEST-30086	Delated to beta-1 3 evoducance preducer (CAC18170) [N crassa]	9	0.00	-0.08	2.33	0.17
	TYEST A0000	Exhearboar (construction) (construct	10	0.00	-0.12	1.20	0.03
	TTEST-A0090	Dynobalo twanakotologo (CAC1921) [N. gradadi	10	0.00	-0.14	1.74	0.50
	TIESI-A2041	Flobable (Fallsket) as (CAC10210) [N. Classa]	11	0.00	-0.20	1.29	0.02
	TIESI-ASSOO	Giucose-o-phosphale i-denydrogenase (P40020) [A. higer]	11	0.00	-0.23	1.18	0.15
	IIESI-A4093	Characterizationase (14006) [5, pointer]	11	0.00	0.02	1.27	0.30
	Trest-A3422	Glucoamylase precursor (P14804) [N. crassa]	19	0.00	0.34	-2.00	1.32
	TrEST-A4050	Glucoamylase i precursor (P231/b) [A. ka]	19	0.00	0.51	-2.13	0.50
	TrEST-A3541	L-xylulose reductase (Q8NK5U) [H.]ecorina]	5	0.00	1.64	-0.97	2.17
	TrALD2	Aldehyde dehydrogenase 2 [T. reesel]	6	0.00	1.70	1.49	3.91
	TrGPH	Glycerophosphate dehydrogenase [T. reesei]	8	0.00	0.15	1.24	1.46
	TrENO	Enolase [T. reesel]	9	0.00	-0.16	2.24	0.08
	TrEST-B09F02	6-Phosphogluconate dehydrogenase (BAC06328) [A. oryzae]	10	0.00	-0.13	1.65	0.68
	TrEST-B34B10	Glycogenin (AAS68518.1) [N. crassa]	10	0.00	-0.25	1.19	0.74
	Trest-A3326	Phosphoglycerate kinase (P14228) [T. reesei]	11	0.00	-0.18	1.05	0.43
	TrPFK	Phosphofructokinase [T. reesei]	11	0.00	-0.23	1.48	-0.45
	TrPGDH	Phosphogylecrate dehydrogenase [T. reesei]	11	0.00	-0.34	1.39	0.17
	TrTAL	Transaldolase [T. reesei]	11	0.00	0.04	1.16	0.20
	TrTDH	Triose-phosphate dehydrogenase [T. reesei]	11	0.00	0.02	1.55	0.40
	TrTKL	Transketolase [T. reesei]	11	0.00	-0.10	1.62	0.21
	TrEST-A0613	Xylitol dehydrogenase (AAO42466) [H. jecorina]	15	0.00	0.20	0.44	-1.75
	Trest-A2626	Putative Xu-5-P / Fru-6-P phosphoketolase (AAW46259) [C. neoformans]	16	0.00	0.51	-0.09	-1.49
	TrGPD	Glycerophosphate dehydrogenase [T. reesei]	17	0.00	0.11	-1.06	-1.51
	TrXYLAN2	Endoxylanase II (S67387) [T. reesei]	17	0.00	-0.28	-0.85	-1.87
	Trest-A0705	L-xylulose reductase (Q8NK50) [H. jecorina]	20	0.00	-0.29	-1.71	-0.81
Transporte	TrEST-A1790	MFS phospholipid transporter (Gitl), putative (EAL88628) [A. fumigatus]	4	0.00	0.71	-0.91	1.16
	TrEST-A0901	Metalloreductase (EAL85037) [A. fumigatus]	9	0.00	0.02	3.13	0.41
	Trest-A3037	Ctr copper transporter family protein (EAL87467) [A. fumigatus]	9	0.00	-0.07	2.17	0.55
	TrEST-A3961	Proline-specific permease (P18696) [E. nidulans]	9	0.00	0.32	2.18	0.84
	Trest-A0205	Nuclear transport factor 2 (AAK71467) [A. nidulans]	11	0.00	-0.18	1.13	0.38
	Trest-A3556	Putative MFS transporter (EAL84203) [A. fumigatus]	11	0.00	-0.19	0.93	-0.10
	TrEST-B06A05	MDR-like ABC transporter (AAF65762) [B. fuckeliana]	11	0.00	-0.21	0.81	0.43
				0.00	· ·	0.0.	00

-	~
Eu	ncan
ıч	ncao

Transporte	TrEST-B06E06	MSTA protein (CAC80843) [E. nidulans]	19	0.00	0.22	-1.90	0.88
Moficações pós-traducionais e	TrEST-A2457	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial (Rotamase) (P10255) [N. crassa]		0.00	0.09	1.01	1.12
endereçamento			8				
	TrEST-A3562	Protein mannosyltransferase 1 (EAL92923) [A. fumigatus]	8	0.00	0.31	0.35	1.42
	TrEST-B23E11	Probable 26S ATP/ubiquitin-dependent proteinase chain S4 (CAB88559) [N. crassa]	8	0.00	0.05	0.71	1.20
Degradação protéica	TrEST-A0595	Subtilisin-like serine protease PR1H (CAC95047) [M. anisopliae]	3	0.00	1.01	0.44	0.49
	TrEST-B27H11	Ubiquitin-activating enzyme El 1 (P22515) [S. cerevisiae]	8	0.00	0.02	0.95	1.48
	TrEST-A3560	Aspartic protease (BAC00848) [A. oryzae]	10	0.00	0.06	1.22	0.78
	TrEST-A1882	Carboxypeptidase S (P27614) [S. cerevisiae]	11	0.00	0.00	1.01	-0.09
	TrEST-A2912	Aminopeptidase (EAL89884) [A. fumigatus]	16	0.00	0.06	-0.17	-1.14
P`roteínas ribossomais	TrEST-A2562	40S ribosomal protein S2-like protein (AAX07689) [M. grisea]	4	0.00	1.27	-1.10	1.58
	TrEST-B06A02	Cytosolic small ribosomal subunit S15 (EAL86942) [A. fumigatus]	15	0.00	-0.10	1.08	-1.75
	TrEST-A2605	Putative cytosolic large ribosomal subunit Lll (EAL90014) [A. fumigatus]	16	0.00	0.42	-0.42	-1.30
	TrEST-A2975	40S ribosomal protein S3a (AAT81418) [F. catus]	17	0.00	0.18	-0.15	-1.83
RNA ribossomal	Tr25S	25S ribosomal RNA (X77580) [T. reesei]	20	0.00	-0.26	-1.46	-0.77
Síntese e metabolismo de tRNAs	Trest-b25A02	Probable isoleucyl-trna synthetase (CAD29604) [A. fumigatus]	11	0.00	-0.12	1.00	0.01
	Trest-A0538	Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (Q05506) [S. cerevisiae]	14	0.00	-0.07	0.55	-1.16
Síntese de RNA							
Processamento de PNA	TrEST-A1624	rRNA intron-encoded homing endonuclease (AAK13589) [0 sativa]	4	0.00	0.54	-1 31	1.01
r rocessamento de rava	TrEST-20539	Similar to rENA intron-encoded homing endonuclease (XP 525925) [P troglodytes]	4	0.00	0.34	-1.31	0.20
	TrEST-24171	Probable component of the U3 small nucleolar PND (CAC1315) [N_crassa]	10	0.00	0.32	-1.25	-0.20
Entores transcrisionais	TrEST-20188	Transcription factor (C2C88374) [H jecorina]	20	0.00	-0.49	-1.00	-1.24
Falores transcrictorials	TYPET ALEGO	Sulfur metabolite represented protein (FARE9742) [A miduland]	10	0.00	-0.23	0.94	0.05
	TTEST-A1599	Transprintion factor (CAC8274) [H jacorina]	10	0.00	0.32	-0.03	-1.40
	11591-49494	Transcription factor (CAC66374) [h. jecorina]	18	0.00	0.35	-1.38	0.31
Não-classificada							
Outros genes	TrEST-A0728	EsdC protein, required for sexual development (AAM95965) [A. nidulans]	7	0.00	0.26	2.74	2.63
	TrEST-A1949	FAD-dependent oxidoreductase-like protein (AAX07713) [M. grisea]	7	0.00	0.57	1.30	2.23
	TrEST-A0076	Putative ER membrane protein (Pkrl) (EAL87612) [A. fumigatus]	8	0.00	0.16	0.48	1 43
	Trest-A3724	Cvanovirin-N-like protein (AAV85993) [T. borchii]	8	0.00	-0.03	0.43	1 74
	TrEST-A0620	Related to glyoxal oxidase precursor (CAE76318) [N. grassa]	9	0.00	-0.15	3.21	0.46
	Trest-A4158	Related to glyoxal oxidase precursor (CAE76318) [N. crassa]	9	0.00	0.18	3 14	1 24
	TrEST-B06D08	Aminotransferase class V (FAL90276) [A. fumigatus]	10	0.00	0.10	1.62	1.24
	Trest-A0014	Probable coproporphyringen oxidase precursor (CAD21231) [N. crassa]	13	0.00	0.00	1.02	-0.63
	TrEST-A1116	Nonribosomal pertide synthetase: NRPS (AAM78457) [H virens]	15	0.00	-0.02	0.27	-2.62
	TrEST-20174	Phosphoketolase (ZP 00032418) [B_fungorum]	15	0.00	-0.02	0.27	-2.02
	TrEST-A0896	Putative senescence-associated protein (BAB33421) [P. sativum]	18	0.00	0.00	-1.21	-0.14
<u>Desconhecida</u>							
Polocionados a OPEs putativas	TreeT-73035	Humothetical protein MCOO432 4 (FAN48774) [M. gricea]	4	0.00	E 00	4.06	4 20
Nelacionados a Orres pulativas	TrEST_10217	Dutative protein (CD71042) [N crassa]	1	0.00	5.00	4.00	4.39
	TYEST A0317	Humothetical protein (GAD/1012) [M. Glassa]	2	0.00	1.94	1.71	0.15
	TTEOT-AUTO/	hypothetida piotein mouo///.i (EARAJI/) [M. glista]	2	0.00	2.34	1.92	0.53
	11E01-AU491 Tweet-A0E25	Humothatical protein (AF_225054) [N. Classa]	2	0.00	2.20	2.25	0.32
	TTEST-AUSZS	hypothetical protein MC007774 (EAA4917) [M. grisea]	2	0.00	2.60	2.21	0.93
	TIEST-AUSZO	hypothetical protein MODOTTA (EARAPILA [M. grisea]	2	0.00	2.17	2.40	0.20
	11501-AU555	hypothetical protein MCOUTTA (EARASIS) [M. grisea]	2	0.00	2.41	2.12	0.57
	ITEST-AU/5/	nypolmetical protein MGUU///.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	1.90	1.95	0.52

Relacionados a ORFs putativas	TrEST-A0860	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.66	2.08	1.00
	TrEST-A0962	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.30	1.92	0.22
	TrEST-A1008	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.12	1.81	0.33
	TrEST-A1020	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.30	2.14	0.30
	TrEST-A1028	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.24	1.96	0.43
	Trest-A1181	Hypothetical protein FG09906.1 (EAA70132) [G. zeae]	2	0.00	2.55	2.06	0.83
	Trest-A1238	Hypothetical protein FG09906.1 (EAA70132) [G. zeae]	2	0.00	2.52	1.98	0.90
	TrEST-A1353	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.21	2.63	0.43
	TrEST-A2567	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.72	2.29	1.21
	TrEST-A2821	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.09	2.09	0.58
	TrEST-A2854	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	1.84	1.61	0.65
	TrEST-A3117	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.55	2.10	0.78
	TrEST-A3146	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	2	0.00	2.32	2.29	0.61
	TrEST-A3191	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.20	2.46	0.25
	TrEST-A3573	Hypothetical protein MG00777.4 (EAA49119) [M. grisea]	2	0.00	2.42	2.16	1.03
	TrEST-A3794	Predicted protein (XP_323654) [N. crassa]	2	0.00	2.20	1.95	0.06
	Trest-A0334	Hypothetical protein FG09552.1 (EAA77109) [G. zeae]	3	0.00	1.73	0.72	1.34
	TrEST-A0834	Predicted protein (EAA33307) [N. crassa]	3	0.00	1.24	0.38	0.99
	TrEST-A2035	Predicted protein (XP_329036) [N. crassa]	3	0.00	1.95	0.90	1.77
	TrEST-B44E06	Hypothetical protein FG08526.1 (EAA72103) [G. zeae]	4	0.00	0.36	-0.50	1.60
	TrEST-A1356	AN1 zinc finger protein (EAL84575) [A. fumigatus]	5	0.00	3.07	-0.18	2 55
	TrEST-A2143	Predicted protein (XP 324593) [N. crassa]	5	0.00	2 30	-0.43	2 28
	Trest-A0150	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	6	0.00	0.79	0.93	2 47
	TrEST-A3863	Hypothetical protein FG03319.1 (EAA71063) [G. zeae]	6	0.00	0.71	0.63	2.62
	TrEST-A0456	Hypothetical protein FG01141.1 (EAA68421) [G. zeae]	7	0.00	1.06	1 84	1 43
	TrEST-A2597	Hypothetical protein FG00260.1 (EAA69670) [G. zeae]	7	0.00	0.39	1.01	1.10
	TrEST-A4133	Hypothetical protein FG00855.1 (FAA70448) [G. zeae]	7	0.00	0.06	2 25	1.10
	TrEST-A4228	GPR/FUN34 family protein (EAL87502) [A fumigatus]	7	0.00	0.00	2.23	1 00
	Trest-A0115	Hypothetical protein FG08440.1 (EAA71917) [G. zeae]	/ 8	0.00	-0.19	1.01	1.30
	TrEST-23427	Hypothetical protein FG09205 1 (FAD77045) [G. zeae]	8	0.00	-0.13	0.70	1.20
	TrEST-13651	Hypothetical protein FG06162 1 (FAD74726) [G. zeae]	8	0.00	0.30	1 15	1.55
	TrEST-A0358	Hypothetical protein FG04780 1 (EAA75739) [G. zeae]	8	0.00	0.09	3.24	0.61
	TrEST_12651	Hypothetical protein $FG04780 + (FAA75739) = [G_7222]$	9	0.00	0.00	3.24	0.01
	TYEST A2051	Hypothetical protein FG00909 1 (FAA67802) [G. zeae]	9	0.00	0.17	3.41	0.00
	TTEST-A1232	Hypothetical protein FG00999.1 (EAA07002) [G. Zeae]	10	0.00	0.16	1.33	0.67
	TIESI-A3/4/	Hypothetical protein FG09506 1 (FAA70019) [G. zeae]	10	0.00	0.07	1.18	0.85
	TIESI-A4100	Rypothetical protein (VD 220522) [N. grades]	10	0.00	0.06	1.26	1.25
	TIESI-AUGUZ	Wrethetical protein (AP_520555) [N. Classa]	11	0.00	0.07	1.08	0.14
	TIESI-A1550	Hypothetical protein FG07804.1 (EAA78058) [G. 2eae]	11	0.00	0.09	1.48	0.18
	TrEST-AL576	Conserved hypothetical protein (EAL92224) [A. fumigatus]	11	0.00	0.02	1.55	0.09
	TTEST-A2853	Predicted protein (EAA/5560) [G. zeae]	11	0.00	-0.06	0.96	0.03
	TTEST-A3311	Probable gamma-butyrobetaine dioxygenase (Q98KKU) [R. 10]	11	0.00	-0.07	1.36	-0.14
	TrEST-B34D05	Hypothetical protein AN2200.2 (EAA63857) [A. hidulans]	12	0.00	0.03	2.88	-3.17
	Trest-Al360	Hypothetical protein MGU5446.4 (EAA54654) [M. grisea]	14	0.00	-0.12	0.39	-1.42
	Trest-A231/	Hypothetical protein FGUU935.1 (EAA6//12) [G. zeae]	14	0.00	-0.09	0.27	-1.21
	TrEST-A2445	Hypothetical protein FG05653.1 (EAA/5224) [G. zeae]	14	0.00	0.02	0.36	-1.13
	TrEST-A2559	Conserved hypothetical protein (CAC18240) []	14	0.00	-0.05	0.28	-1.15
	TrEST-B18F01	Putative protein (CAC28806) [N. crassa]	14	0.00	-0.09	0.59	-1.47
	TrEST-A3619	Hypothetical protein (XP_328245) [N. crassa]	15	0.00	0.05	0.47	-2.05
	TrEST-A1738	Hypothetical protein FG02244.1 (EAA69411) [G. zeae]	16	0.00	0.26	-0.31	-0.79
	TrEST-A2566	Hypothetical protein FG09308.1 (EAA76055) [G. zeae]	16	0.00	0.00	-0.28	-1.30
	TrEST-B17D01	Hypothetical protein FG01228.1 (EAA68089) [G. zeae]	16	0.00	-0.28	-0.54	-1.35
	TrEST-A1864	Hypothetical protein MG01070.4 (XP_368174) [M. grisea]	17	0.00	-0.21	-0.17	-1.89

Relacionados a ORFs putativas	TrEST-A2006	Hypothetical protein FG05186.1 (EAA73899) [G. zeae]	17	0.00	0.11	-1.09	-2.29
	Trest-A2755	Hypothetical protein (EAA31251) [N. crassa]	17	0.00	0.28	-1.13	-1.86
	TrEST-A3621	Hypothetical protein FG00925.1 (EAA67702) [G. zeae]	17	0.00	0.29	-0.97	-1.92
	Trest-A3680	Predicted protein (XP_329164) [N. crassa]	17	0.00	0.13	-0.98	-2.32
	Trest-A3733	Hypothetical protein MG09899.4 (EAA46678) [M. grisea]	17	0.00	0.05	-0.07	-1.97
	TrEST-B07A06	Hypothetical protein MG00201.4 (XP_369043) [M. grisea]	17	0.00	-0.17	-0.72	-1.52
	TrEST-B07E08	Unknown function protein (BAA97098) [A. thaliana]	17	0.00	-0.17	-0.57	-1.58
	TrEST-A0413	Hypothetical protein FG01047.1 (EAA69193) [G. zeae]	18	0.00	0.77	-1.05	-0.23
	TrEST-A0459	Hypothetical protein FG08467.1 (EAA70782) [G. zeae]	18	0.00	0.50	-0.84	0.61
	TrEST-A1159	Hypothetical protein UM05244.1 (EAK82857) [U. maydis]	18	0.00	0.37	-0.89	-0.11
	TrEST-A1652	Hypothetical protein (XP_329199) [N. crassa]	18	0.00	-0.11	-1.46	0.22
	TrEST-A2510	Unnamed protein product (CAH00932) [K. lactis]	18	0.00	0.20	-0.81	0.23
	TrEST-A2969	Hypothetical protein FG05229.1 (EAA75465) [G. zeae]	18	0.00	0.91	-0.25	0.52
	TrEST-A3140	Hypothetical protein FG09564.1 (EAA77121) [G. zeae]	18	0.00	0.50	-0.69	0.00
	TrEST-B39A04	Hypothetical protein MG02573.4 () [M. grisea]	18	0.00	0.23	-1.01	0.32
	TrEST-A2501	DUF895 domain membrane protein (EAL85180) [A. fumigatus]	19	0.00	1.26	-1.61	0.37
Sem següência similar	TrEST-A3074		1	0.00	4.50	3.78	3.87
	Trest-A0444		2	0.00	2.07	2.26	0.02
	Trest-A0680		2	0.00	2.17	2.22	0.87
	TrEST-A1223		2	0.00	2.16	2.27	1.12
	TrEST-A1719		2	0.00	2.52	3.24	0.96
	TrEST-A1753		2	0.00	2.00	1.88	0.60
	Trest-A1775		2	0.00	2 13	2.36	0.00
	TrEST-A2042		2	0.00	1.87	1.65	1.08
	Trest-A2285		2	0.00	2.06	2 13	0.88
	Trest-A2578		2	0.00	2.00	2.10	1.26
	TrEST-A2961		2	0.00	2.20	2.10	1 14
	TrEST-A2999		2	0.00	2.00	2.04	1.14
	TrEST-A3649		2	0.00	2.11	2.20	0.87
	TrEST-A4256		2	0.00	1 03	1 01	0.50
	TrEST-A0077		2	0.00	1.50	1.01	0.50
	TrEST-A0428		3	0.00	1.00	0.76	-0.02
	TrEST-A1883		3	0.00	1.40	0.70	0.02
	TrEST-A0241		3	0.00	1.03	-0.48	0.50
	TrEST-A0883		4	0.00	0.00	-0.40	1.88
	TrEST-11174		4	0.00	0.00	-0.55	1.00
	TrEST-11465		4	0.00	1.45	-0.91	1.10
	TrEST-A1752		4	0.00	0.62	-0.52	1.04
	TrEST-13956		4	0.00	0.02	-0.52	1.40
	TrEST-20277		4	0.00	1.30	-0.70	2.96
	TrEST-A1066		0	0.00	1.20	1.45	2.00
	TrEST-11893		0	0.00	0.10	2.02	2.42
	TrEST-B06F07		/	0.00	0.10	2.03	2.17
	TrEST-B08B06		0	0.00	-0.12	0.05	2.30
	TrEST_B16C03		0	0.00	-0.15	0.95	1.72
	TrEST-B35G01		8	0.00	-0.08	1.21	1.57
	TrEST_B41204		8	0.00	0.48	0.08	1.00
	Treer_B41000		8	0.00	0.03	0.77	1.02
	TTEST-DHIDUZ		8	0.00	0.19	0.30	1.30
	TTEST AU1/5		9	0.00	0.03	2.74	0.35
	TTEDI-ALJUZ		g	0.00	-0.20	2.30	0.34
	11E01-A2334		g	0.00	0.71	2.00	1.13
	IIEGI-AUUI0		10	0.00	-0.04	1.84	1.06

Sem seqüência similar	Trest-A1595	10	0.00	-0.17	1.12	0.69
	Trest-A2994	10	0.00	-0.08	1.51	1.39
	Trest-A2998	10	0.00	-0.28	1.78	0.79
	Trest-A3452	10	0.00	0.09	1.53	1.15
	Trest-A3844	10	0.00	0.55	1.61	0.89
	Trest-B08D11	10	0.00	0.26	1.51	1.13
	Trest-B08E01	10	0.00	0.18	1.45	1.43
	Trest-B10D03	10	0.00	-0.19	1.96	0.82
	Trest-B33G01	10	0.00	0.11	1.28	1.30
	Trest-B41A05	10	0.00	-0.18	1.05	0.91
	Trest-A1603	11	0.00	-0.12	1.27	-0.35
	Trest-A3055	11	0.00	-0.07	1.01	0.44
	Trest-A3631	11	0.00	0.44	1.59	0.10
	Trest-A3920	11	0.00	0.12	1.56	0.31
	Trest-A4210	11	0.00	0.11	1.21	-0.36
	Trest-B08A08	11	0.00	-0.21	0.90	-0.39
	TrEST-B09D12	11	0.00	-0.10	0.93	0.22
	Trest-B17A08	11	0.00	-0.01	1.31	0.29
	Trest-822007	11	0.00	-0.04	1.58	0.09
	TrEST-B41D12	11	0.00	-0.35	0.94	-0.50
	TrEST-B41H11	11	0.00	-0.09	0.98	0.10
	Trest-A0066	13	0.00	0.21	1 23	-0.85
	Trest-A2609	13	0.00	-0.06	1.85	-0.95
	Trest-A4027	13	0.00	0.01	2 80	-0.87
	TrEST-A0132	14	0.00	0.01	0.38	-1 45
	TrEST-A0601	14	0.00	0.57	0.00	-1 10
	TrEST-A1223	14	0.00	-0.07	0.58	-1 10
	TrEST-A2846	14	0.00	-0.13	0.37	-1.51
	TrEST-A2889	14	0.00	-0.07	0.59	-1 10
	TrEST-A2936	14	0.00	-0.13	0.00	-1 16
	TrEST-A3655	14	0.00	0.10	1.00	-1.26
	TrEST-A4300	14	0.00	-0.14	0.35	-1.51
	TrEST-80722	15	0.00	0.01	0.00	-2.33
	TrEST-A0878	15	0.00	0.07	0.70	-2.00
	TrEST-A0940	15	0.00	0.07	0.86	-2.31
	TrEST-A1651	15	0.00	0.01	0.00	-2.25
	Trest-A2332	15	0.00	0.01	0.65	-2 41
	TrEST-A2491	15	0.00	0.04	0.00	-1.93
	TrEST-A3548	15	0.00	0.02	0.44	-2 11
	TrEST-A0637	16	0.00	0.51	-0.83	-1.52
	TrEST-A2505	16	0.00	0.53	-0.09	-0.50
	TrEST-82548	16	0.00	0.57	-0.31	-1 35
		16	0.00	0.07	-0.85	-0.89
		17	0.00	-0.16	-0.23	-2.66
	TrEST-A3132	17	0.00	-0.39	-0.32	-2.00
		17	0.00	0.03	-0.32	-1 60
		17	0.00	-0.40	-0.33	-2.64
		17	0.00	-0.40	-0.21	-2.04
	 TrEST-A0594	19	0.00	0.20	-0.95	0.44
		18	0.00	0.13	-0.64	0.13
		18	0.00	0.00	-0.83	0.13
		10	0.00	0.40	-0.00	0.03
		10	0.00	0.04	-0.59	0.04

Função

Sem seqüência similar	TrEST-A1491		18	0.00	0.39	-0.89	-0.22
	TrEST-A1761		18	0.00	0.07	-0.98	0.04
	TrEST-A2401		18	0.00	0.50	-1.12	-0.14
	TrEST-A2951		18	0.00	0.22	-0.81	0.48
	TrEST-A2965		18	0.00	0.94	-0.92	0.22
	TrEST-A3601		18	0.00	0.30	-1.03	0.28
	TrEST-A3652		18	0.00	0.56	-0.93	0.08
	TrEST-B07A07		18	0.00	0.32	-0.73	0.05
	TrEST-B12A04		18	0.00	0.43	-0.64	0.06
	TrEST-B18H10		18	0.00	0.16	-0.84	-0.46
	TrEST-B24C12		18	0.00	0.32	-0.98	-0.36
	TrEST-B28B03		18	0.00	0.41	-0.65	0.15
	TrEST-B28B09		18	0.00	0.29	-1.08	0.66
	TrEST-B28D02		18	0.00	-0.03	-1.10	0.06
	TrEST-B36B02		18	0.00	0.34	-0.69	0.01
	TrEST-B22H02		19	0.00	0.04	-2.37	0.39
	Trest-A0299		20	0.00	-0.40	-1.56	-0.69
	Trest-A0373		20	0.00	0.01	-1.61	-0.91
	TrEST-A0618		20	0.00	-0.07	-1.25	-0.82
	Trest-A0706		20	0.00	-0.41	-1.79	-1.12
	TrEST-A1031		20	0.00	-0.08	-1.15	-0.37
	TrEST-A2146		20	0.00	-0.08	-1.23	-1.39
	Trest-A2250		20	0.00	-0.36	-1.67	-1.20
	Trest-A2309		20	0.00	-0.35	-1.63	-0.89
	TrEST-A2810		20	0.00	-0.17	-1.29	-0.74
	TrEST-A2826		20	0.00	-0.32	-1.56	-0.86
	TrEST-A3804		20	0.00	0.49	-1.55	-0.56