BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA

Universidade de São Paulo

20.291

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudo da expressão dos genes de choque térmico
hsp90, *hsp60* e *hsp10* do fungo aquático
Blastocladiella emersonii

Luciana Pugliese da Silva

Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo, 2003

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta tese)

544.88
5586es

DEDALUS - Acervo - CQ

30100005159

Ficha Catalográfica

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

Silva, Luciana Pugliese da
S586e Estudo da expressão dos genes de choque térmico *hsp90*,
hsp60 e *hsp10* do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* /
Luciana Pugliese da Silva. -- São Paulo, 2003.
137p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Bioquímica.
Orientador : Gomes, Suely Lopes

1. Expressão gênica 2. Fungo zoosporico : Micologia
I. T. II. Gomes, Suely Lopes, orientador.

574.88 CDD

***“Estudo da Expressão dos Genes de Choque
Térmico hsp90, hsp60 e hsp10 do Fungo
Aquático Blastocladiella emersonii”***

**LUCIANA PUGLIESE DA
SILVA**

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

Aprovada por:

Profa. Dra. SUELY LOPES GOMES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Profa. Dra. ALINE MARIA DA SILVA
IQ – USP

Prof. Dr. ROBERTO VICENTE SANTELLI
IQ – USP

Prof. Dr. LUIS EDUARDO SOARES NETTO
IB – USP

Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE INACIO RAMOS
LNLS – Laboratório Nacional de Luz Síncrotron

SÃO PAULO
08 DE JANEIRO 2003.

À minha mãe Silvia, por seu amor,
por me ensinar sempre e por estar
ao meu lado em todos os momentos

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, pela orientação competente e por estar sempre disponível para seus alunos.

Ao meu pai Vani e meu irmão André, pelo apoio, incentivo e valor que dão ao meu trabalho.

Ao Prof. Dr. Bayardo Baptista Torres, pelo exemplo de educador e pelas inúmeras oportunidades de eu poder ensinar.

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques, pelas contribuições ao longo do trabalho e pela amizade.

À Regina Lucia Baldini, por estar sempre pronta a ajudar, pela enorme contribuição em meu aprendizado e pela grande amizade.

À Sandra Mara, pela eficiência em cuidar de tudo no laboratório e pela grande amizade.

Ao Luciano Gomes Fietto, pela ajuda, pelas discussões intermináveis sobre nossos trabalhos com *B. emersonii* e sobre ciência, pelo exemplo de dedicação e pela amizade.

À Renata Tonelli pela amizade e pelas conversas nem sempre científicas e também pela ajuda com a imunofluorescência.

À Raphaela por alegrar a nossa bancada, pelas discussões, pelos experimentos conjuntos e pela grande amizade.

Aos colegas atuais: Karina, Rita, Silvia, Cristina, Michelle, Tie, Humberto, Luciano e Luci, e aos antigos: Antônio Carlos, Marcelo, Beto, Mara, Denise e Terumi pela convivência alegre e por fazerem do laboratório um ambiente agradável.

Aos estudantes Aaron e Cristiane, pelo prazer em ensiná-los, pelo interesse em aprender e pela ajuda em alguns experimentos.

À Profa. Dra. Maria Júlia, Ariel e Renata pela ajuda com a imunofluorescência.

Aos colegas do Lab. da Profa. Marilis pelas discussões sobre nossos trabalhos.

Aos professores do Depto de Bioquímica, pela utilização de equipamentos de seus laboratórios e a todos os colegas sempre dispostos a ajudar.

À Ivone e Neusa, por seus trabalhos imprescindíveis

À Elizety, pela ajuda sempre que foi preciso.

Ao apoio financeiro das agências FAPESP e CAPES, incluindo as bolsas concedidas, e CNPq.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. A resposta ao choque térmico.....	1
2. Regulação da resposta ao choque térmico.....	3
3. Hsp90.....	7
4. Hsp60 / Hsp10.....	9
5. O modelo de estudo <i>Blastocladiella emersonii</i>	10
6. A resposta ao choque térmico em <i>Blastocladiella emersonii</i>	14
OBJETIVOS	17
MATERIAIS E MÉTODOS	18
1. Cultivo de <i>Blastocladiella emersonii</i>	18
2. Linhagens, fagos e plasmídeos.....	18
2.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	18
2.2. Vetores de clonagem.....	18
2.3. Vetor de expressão.....	19
3. Enzimas de restrição e demais reagentes.....	19
4. Oligonucleotídeos.....	19
4.1. Reações de seqüenciamento do gene <i>hsp90</i>	19
4.2. Extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa.....	20
4.3. RACE-PCR.....	20
4.4. PCR para amplificação do gene <i>hsp60</i>	20
4.5. Reações de seqüenciamento do cDNA da Hsp60.....	21
5. Meios de cultura.....	21
6. Extração de DNA de <i>Blastocladiella emersonii</i>	21
7. "Southern blot".....	23
8. Extração de RNA total de <i>Blastocladiella emersonii</i>	24
8.1. Esporulação.....	24

8.2. Germinação.....	25
9. Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e "Northern blot".....	26
10. Preparo de células competentes para transformação.....	27
10.1. Método do CaCl ₂	27
10.2. Método para eletroporação.....	27
11. Transformação de <i>E. coli</i>	28
11.1. Choque térmico.....	28
11.2. Eletroporação.....	28
12. Reação de seqüenciamento de DNA.....	29
13. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose com papel DE81.....	29
14. Obtenção de sonda radioativa.....	30
15. Varredura da biblioteca de expressão em λ gt11.....	30
16. Clonagem do cDNA da Hsp90.....	31
17. Varredura da biblioteca genômica em λ DASH.....	32
18. Construção e varredura de um banco genômico parcial.....	34
19. Reação de extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa.....	34
20. RACE-PCR.....	36
21. Preparação de extrato de proteínas.....	37
22. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e "western blot".....	38
23. Expressão da proteína recombinante fHsp90-His para obtenção de anticorpos.....	39
24. Microscopia de imunofluorescência.....	43
25. PCR com oligonucleotídeos degenerados.....	44
26. Análise computacional.....	44
RESULTADOS	46
1. HSP90	46
1.1. Isolamento do cDNA do gene <i>hsp90</i>	46
1.2. Análise de banco genômico para isolamento do gene <i>hsp90</i>	46
1.3. Construção e análise de um banco genômico parcial.....	47

1.4. O gene <i>hsp90</i> de <i>B. emersonii</i> está presente em cópia única.....	48
1.5. Estrutura do gene <i>hsp90</i> de <i>B. emersonii</i>	48
1.6. Determinação do início de transcrição do gene <i>hsp90</i> por extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa.....	56
1.7. Determinação do início de transcrição do gene <i>hsp90</i> por RACE-PCR e análise do processamento do íntron.....	56
1.8. Análise da região promotora do gene <i>hsp90</i>	57
1.9. Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da Hsp90 de <i>B. emersonii</i> com proteínas homólogas de outros organismos.....	57
1.10. Análise do padrão de expressão do mRNA da Hsp90 durante o desenvolvimento de <i>B. emersonii</i> e sob condições de estresse.....	66
1.11. Níveis relativos da proteína Hsp90 durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i>	71
1.12. Expressão da proteína recombinante Hsp90-His para obtenção de anticorpos.....	72
1.13. Imunolocalização da Hsp90 de <i>B. emersonii</i>	73
2. HSP60	80
2.1. PCR com oligonucleotídeos degenerados para amplificação de parte do gene <i>hsp60</i>	80
2.2. Isolamento do cDNA da Hsp60 de uma biblioteca de choque térmico construída em pSPORT.....	81
2.3. O gene <i>hsp60</i> de <i>B. emersonii</i> está presente em cópia única	82
2.4. Determinação do início de transcrição do gene <i>hsp60</i> por extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa.....	82
2.5. Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da Hsp60 de <i>B. emersonii</i> com proteínas homólogas de outros organismos.....	88
2.6. Análise do padrão de expressão do mRNA da Hsp60 durante o desenvolvimento de <i>B. emersonii</i> e sob condições de estresse.....	93
2.7. Níveis relativos da proteína Hsp60 durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i> ..	98

3. HSP10	104
3.1. Isolamento do cDNA da Hsp10 de uma biblioteca de choque térmico construída em pSPORT.....	104
3.2. O gene <i>hsp10</i> de <i>B. emersonii</i> está presente em cópia única.....	104
3.3. Análise comparativa da sequência de aminoácidos da Hsp10 de <i>B. emersonii</i> com as proteínas homólogas de outros organismos.....	107
3.4. Análise do padrão de expressão do mRNA da Hsp10 durante o desenvolvimento de <i>B. emersonii</i> e sob condições de estresse.....	111
DISCUSSÃO	116
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
CURRICULUM VITAE	137

TABELAS E FIGURAS

<u>Tabela 1</u> : Porcentagens de similaridade e identidade da Hsp90 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp90.....	64
<u>Tabela 2</u> : Porcentagens de similaridade e identidade da Hsp60 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp60.....	91
<u>Tabela 3</u> : Porcentagens de similaridade e identidade da Hsp10 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp10.....	109
 <u>Figura 1</u> : Esquema do ciclo de vida de <i>Blastocladiella emersonii</i>	12
<u>Figura 2</u> : Análise por "Southern blot" dos fagos recombinantes.....	49
<u>Figura 3</u> : Esquema do clone genômico de 15 kb em λ DASH.....	50
<u>Figura 4</u> : Mapa de restrição do fragmento genômico contendo o gene <i>hsp90</i>	51
<u>Figura 5</u> : Sequência de nucleotídeos e aminoácidos da Hsp90 de <i>B. emersonii</i> ..	54
<u>Figura 6</u> : Análise por "Southern blot" de DNA genômico com sonda da Hsp90....	55
<u>Figura 7</u> : Determinação do início de transcrição da Hsp90 por extensão de oligonucleotídeo.....	58
<u>Figura 8</u> : RACE-PCR e processamento correto do íntron.....	59
<u>Figura 9</u> : Região 5' não codificadora do gene <i>hsp90</i> de <i>B. emersonii</i>	60

<u>Figura 10:</u> Comparação da Hsp90 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp90.....	63
<u>Figura 11:</u> Dendrograma da Hsp90 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp90.....	65
<u>Figura 12:</u> Análise dos níveis de mRNA da Hsp90 durante a germinação.....	68
<u>Figura 13:</u> Análise dos níveis de mRNA da Hsp90 durante a esporulação.....	69
 <u>Figura 14:</u> Análise dos níveis de mRNA da Hsp90 durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i>	 70
<u>Figura 15:</u> Níveis da proteína Hsp90 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante a germinação.....	74
<u>Figura 16:</u> Níveis da proteína Hsp90 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante o crescimento vegetativo.....	75
<u>Figura 17:</u> Níveis da proteína Hsp90 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante a esporulação.....	76
<u>Figura 18:</u> Níveis da proteína Hsp90 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i>	77
<u>Figura 19:</u> Indução da Hsp90-His.....	78
<u>Figura 20:</u> Imunolocalização da Hsp90 em zoósporos de <i>B. emersonii</i>	79
<u>Figura 21:</u> PCR da Hsp60 com oligonucleotídeos degenerados.....	83
<u>Figura 22:</u> Seqüência do clone HSR12A06, cDNA da Hsp60.....	85
<u>Figura 23:</u> "Southern blot" genômico com sonda de um fragmento da Hsp60.....	86
<u>Figura 24:</u> Determinação do início de transcrição da Hsp60 por extensão de oligonucleotídeo.....	87
<u>Figura 25:</u> Comparação da Hsp60 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp60.....	90
<u>Figura 26:</u> Dendrograma da Hsp60 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp60.....	92
<u>Figura 27:</u> Análise dos níveis de mRNA da Hsp60 durante a germinação.....	95
<u>Figura 28:</u> Análise dos níveis de mRNA da Hsp60 durante a esporulação.....	96
<u>Figura 29:</u> Análise dos níveis de mRNA da Hsp60 durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i>	97
<u>Figura 30:</u> Níveis da proteína Hsp60 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante a germinação.....	100

<u>Figura 31</u> : Níveis da proteína Hsp60 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante o crescimento vegetativo.....	101
<u>Figura 32</u> : Níveis da proteína Hsp60 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante a esporulação.....	102
<u>Figura 33</u> : Níveis da proteína Hsp60 de <i>Blastocladiella emersonii</i> durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i>	103
<u>Figura 34</u> : Seqüência do clone HSR08-c04A06, cDNA da Hsp10.....	105
<u>Figura 35</u> : "Southern blot" genômico com sonda do cDNA da Hsp10.....	106
<u>Figura 36</u> : Comparação da Hsp10 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp10.....	108
<u>Figura 37</u> : Dendrograma da Hsp10 de <i>B. emersonii</i> com outras Hsp10.....	110
<u>Figura 38</u> : Análise dos níveis de mRNA da Hsp10 durante a germinação.....	113
<u>Figura 39</u> : Análise dos níveis de mRNA da Hsp10 durante a esporulação.....	114
<u>Figura 40</u> : Análise dos níveis de mRNA da Hsp10 durante o ciclo de vida de <i>B. emersonii</i>	115

ABREVIATURAS

ATP	adenosina trifosfato
ATPase	adenosina trifosfatase
BCIP	5'-bromo, 4'-cloro, 3'-indolil fosfato
BSA	albumina acetilada de soro bovino
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
cpm	contagens por minuto
cDNA	DNA complementar
dATP	2'-desoxirribonucleotídeo- 5'-trifosfato de adenosina
dCTP	2'-desoxirribonucleotídeo - 5'-trifosfato de citidina
dGTP	2'-desoxirribonucleotídeo - 5'-trifosfato de guanidina
dTTP	2'-desoxirribonucleotídeo - 5'-trifosfato de timina
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucléico
DO	densidade óptica
DOC	desoxicolato de sódio
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
g	aceleração da gravidade
IPTG	isopropil β -D-galactopiranosídeo
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
min	minutos
μ L	microlitros
mL	mililitros
MOPS	ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
M-MLV-RT	transcriptase reversa do vírus da leucemia de camundongo
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
NBT	nitro-azul de tetrazólio
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida

PIPES	piperazina-N,N'-bis-[ácido 2-etanosulfônico]
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato salina
PCR	reação de polimerização em cadeia
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfona
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	ribonuclease
RNAsin	inibidor de RNAse
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
TBE	tampão Tris borato EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TEMED	N,N,N',N' Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-(hidroxometil)-aminometano
x	vezes concentrado
X-Gal	5-bromo, 4-cloro, 3-indolil β-D-galactosídeo

RESUMO

A proteína de choque térmico Hsp90 é uma chaperone molecular encontrada no citosol. O cDNA incompleto desta proteína foi isolado de uma biblioteca construída a partir de mRNA de células de esporulação de *B. emersonii* submetidas a choque térmico. Um clone genômico contendo a seqüência completa do gene *hsp90* também foi isolado, seqüenciado e caracterizado. A região codificadora do gene *hsp90* é interrompida por um único íntron de 184 nucleotídeos. A seqüência de aminoácidos deduzida indicou uma proteína de 710 resíduos, com massa molecular calculada de 80.792 Da e um pI médio de 4,85. Experimentos de extensão de oligonucleotídeo e RACE-PCR demonstraram um sítio único de início de transcrição localizado a -65 e -70 nucleotídeos do ATG da metionina iniciadora, respectivamente. Motivos similares ao consenso do elemento de choque térmico eucariótico (HSE) e do elemento responsivo a estresse (STRE) foram encontrados na região promotora do gene a -395 e -98 nucleotídeos do ATG, respectivamente. Experimentos de "Northern blot" revelaram que o mRNA para a Hsp90 apresenta níveis máximos aos 90 minutos da fase de esporulação do fungo. Análise por "western blot" mostrou que a proteína Hsp90 está presente durante todo o ciclo de vida do fungo e os níveis máximos de acúmulo foram observados aos 90 minutos da esporulação, indicando um controle transcricional do gene. Tanto a proteína quanto o mRNA são altamente induzidos quando as células são submetidas a choque térmico e a cádmio.

As proteínas Hsp60 e Hsp10 são chaperones moleculares mitocondriais (chaperoninas). Os cDNAs completos destas proteínas foram isolados e totalmente seqüenciados. A seqüência de aminoácidos deduzida da Hsp60 corresponde a uma proteína de 559 resíduos, com massa molecular calculada em 58.741 Da e um pI médio de 8,7. Experimentos de "Northern blot" revelaram que o mRNA para Hsp60 tem níveis máximos de expressão aos 90 minutos da esporulação. Análise por "western blot" mostrou que a Hsp60 está presente durante todo o ciclo de vida do fungo, com níveis máximos da proteína 90 minutos após a indução da esporulação. Tanto a proteína quanto o mRNA são bastante induzidos quando as células são

submetidas ao choque térmico. A seqüência de aminoácidos deduzida da Hsp10 corresponde um polipeptídeo de 101 resíduos com massa molecular calculada em 10.688 Da e um pI médio de 6,25. Experimentos de "Northern blot" revelaram que o mRNA para Hsp10 tem níveis máximos de expressão aos 120 minutos da germinação e é bastante induzido quando as células são submetidas ao choque térmico.

ABSTRACT

The heat shock protein 90 (Hsp90) is a cytosolic molecular chaperone. The incomplete cDNA of this protein was isolated by immunoblot screening of a heat shock cDNA expression library. The complete genomic clone was also isolated and completely sequenced and characterized. The coding sequence is interrupted by a single intron with 184 nucleotides. The deduced amino acid sequence corresponds to a 710-residue polypeptide with a calculated molecular mass of 80,792 Da and an average pI of 4.85. Primer extension and RACE-PCR experiments demonstrated a single transcription start site localized -65 and -70 nucleotides from the ATG of the initiator methionine, respectively. Sequence motifs resembling the standard eukaryotic heat shock element (HSE) and the stress responsive element (STRE) were evident in the regulatory region -395 and -98 nucleotides from the ATG, respectively. Northern blot analysis revealed that the Hsp90 mRNA presents maximum levels by 90 minutes of the sporulation stage. Immunoblot analysis indicated that the Hsp90 is present during the entire life cycle of the fungus and maximum levels were observed 90 minutes after the induction of sporulation, indicating a transcriptional control. During heat shock both the mRNA and the Hsp90 protein are highly induced.

Proteins Hsp60 and Hsp10, are mitochondrial molecular chaperones (chaperonins). The complete cDNAs encoding these proteins were and completely sequenced. The deduced amino acid sequence for Hsp60 corresponds to a 559-residue polypeptide with a calculated molecular mass of 58,741 Da and an average pI of 8.7. Immunoblot analysis showed that Hsp60 is present during the entire life cycle of the fungus and presents maximum levels by 90 minutes of the sporulation. Northern blot analysis indicated maximum levels of the Hsp60 mRNA by 90 minutes of sporulation too. Both mRNA and the protein are highly induced during heat shock. The deduced amino acid sequence for Hsp10 corresponds to a 101-residue polypeptide with a calculated molecular mass of 10,688 Da and an average pI of 6.25. Northern blot analysis indicated maximum mRNA levels by 120 minutes of germination and high levels of expression when the cells are exposed to heat shock.

INTRODUÇÃO

1. A resposta ao choque térmico

A resposta ao choque térmico é uma resposta universal das células a um aumento brusco de temperatura. As células, desde bactéria até o homem, respondem induzindo a síntese de um conjunto de 20 a 25 proteínas denominadas proteínas de choque térmico (Hsps) (Lindquist & Craig, 1988). Estas proteínas podem ser divididas em duas classes principais quanto à função por elas desempenhadas: proteases e chaperones moleculares.

O enovelamento protéico é o processo pelo qual a informação contida na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo origina uma estrutura tridimensional que é responsável pelo funcionamento da proteína. Devido à capacidade de algumas alcançarem seu estado nativo espontaneamente *in vitro* (Anfinsen, 1973), foi assumido que o enovelamento (aquisição da estrutura terciária) e a montagem (formação de complexos oligoméricos) de polipeptídeos recém sintetizados *in vivo* também fossem processos essencialmente independentes de catalisadores e sem consumo de energia. Porém essa visão foi modificada pela descoberta de que, na célula o enovelamento correto de muitas proteínas depende do funcionamento de complexos protéicos pré-existentes denominados Sistemas de Chaperones Moleculares (Ellis, 1987).

As chaperones moleculares constituem um grupo de proteínas relacionadas pela sua função de auxiliar o enovelamento protéico na célula, tanto em condições fisiológicas com em condições de estresse. Essas proteínas reconhecem e se ligam transientemente e não-covalentemente a polipeptídeos nascentes e proteínas não-enoveladas prevenindo a agregação e ajudando-as a atingirem seus estados nativos. A cooperação de diferentes maquinarias de chaperones moleculares cria uma rede que age sinergisticamente no enovelamento protéico da célula, mantendo sua homeostase sob condições não permissivas ao enovelamento espontâneo (revisado por Beissinger & Buchner, 1998). As chaperones moleculares também estabilizam conformações instáveis de outras proteínas que, dependentes da hidrólise de ATP,

facilitam seu enovelamento, montagem em complexos oligoméricos, transporte para compartimentos subcelulares ou disponibilidade para degradação (Gething & Sambrook, 1992).

A função geral das chaperones moleculares no enovelamento de proteínas foi obtida do estudo das Hsp70 e das chaperoninas (Hsp60 e Hsp10). Estas proteínas, originalmente identificadas pelo aumento de sua síntese em células submetidas ao choque térmico, foram implicadas no reparo de polipeptídeos que se desnaturam sob o estresse de temperatura (Pelham, 1986; Hightower, 1991) e atuam na prevenção da agregação de polipeptídeos recém-sintetizados, participando do enovelamento destes para sua forma nativa, num processo dependente de ATP (Frydman & Hartl, 1994).

A Hsp70 e suas co-chaperones (Hsp40 e GrpE) auxiliam nos processos de enovelamento e montagem de intermediários recém-sintetizados no citosol, retículo endoplasmático e em bactérias (Beckman *et al.*, 1990). Por sua vez, a Hsp60 e sua co-chaperone Hsp10 são fundamentais na biogênese de muitas proteínas que são importadas para mitocôndrias e cloroplastos ou proteínas bacterianas (Hemmingsen *et al.*, 1988). A Hsp90, que também pertence à classe dos chaperones, liga-se a polipeptídeos desenovelados e silencia sua função ou promove o endereçamento para o compartimento celular adequado; seus substratos preferenciais são proteínas transdutoras de sinal.

A maioria das proteínas de choque térmico também podem ser classificadas em famílias protéicas de acordo com seu peso molecular: as proteínas de alto peso molecular, variando entre 83-90 kDa (Hsp90), a família das Hsp70, variando entre 66-78 kDa, a famílias das Hsp60, presente em bactérias, mitocôndrias e cloroplastos, as quais têm sido chamadas de "chaperoninas" (Hemmingsen *et al.*, 1988) e as proteínas de baixo peso molecular, um grupo diversificado, variando entre 15-40 kDa. Existem ainda algumas proteínas, com propriedades diferentes daquelas das outras famílias descritas, de aproximadamente 100-110 kDa que têm sido caracterizadas em mamíferos com função de proteases (Subjectek *et al.*, 1983; Shyy *et al.*, 1986).

2. Regulação da resposta ao choque térmico

O mecanismo pelo qual as células eucarióticas respondem ao choque térmico é altamente conservado. Esta resposta, que também protege a célula de outras formas de estresses, manteve-se conservada ao longo da evolução para que, durante a seleção natural, as células tivessem a capacidade de sobreviver ao estresse. O aspecto mais importante da resposta ao choque térmico é a indução da transcrição dos genes que codificam para as proteínas de choque térmico. Esta indução é controlada transcricionalmente pelos fatores de transcrição de choque térmico (HSF - heat shock factor) que se ligam aos sítios de ligação no DNA chamados elementos de choque térmico (HSE - heat shock element), que são similares em todos os eucariotos já estudados. Este sítio de ligação é encontrado na região promotora dos genes de proteínas de choque térmico e consiste de repetições da seqüência pentamérica nGAAn (Amin *et al.*, 1988).

Em particular, em *S. cerevisiae* dois elementos distintos são responsáveis pela ativação da transcrição em resposta ao choque térmico: o HSE e um outro elemento denominado STRE (Stress Responsive Element) cuja seqüência consenso é formada pelas bases "AGGGG" ou "CCCCT". A ativação da transcrição pelas seqüências STRE, encontradas na região promotora de muitos genes que são induzidos por calor depende da ligação dos fatores de transcrição Msn2 e Msn4, como foi demonstrado *in vitro*. STREs, em contraste aos HSEs, são ativados não somente por choque térmico, mas também na presença de muitas outras condições de estresse incluindo estresse osmótico, estresse oxidativo, carência de nitrogênio e exposição a ácidos orgânicos fracos, pHs extremamente baixos ou etanol (revisado por Morano *et al.*, 1998).

O HSE é composto de muitas repetições invertidas contíguas da seqüência de cinco pares de bases "nGAAn" (onde n significa qualquer nucleotídeo) (Booner *et al.*, 1994). O número de unidades pentaméricas no HSE varia, sendo que pelo menos três é o número mínimo necessário para a resposta ao choque térmico *in vivo*. O consenso mínimo para o HSE foi então denominado cHSE e é determinado pela seqüência "nGAAnnTTCnnGAAn" (Fernandes *et al.*, 1994). No entanto, o HSE pode

ainda ser funcional com a inserção de 5 pares de base entre duas unidades repetidas, se o espaçamento e a orientação dos elementos pentaméricos for mantida, isto é, "nGAAn-(5 pb)-nGAAn" (Amin *et al.*, 1988). Foram descritas algumas outras variações no consenso, sendo chamadas de ncHSE (HSE não consenso). A sequência presente na região promotora do gene *CUP1* de *S. cerevisiae*, gene que codifica para uma metalotioneína (proteína que se liga a metais exercendo um papel importante na destoxificação e proteção contra o estresse oxidativo), é composta pela sequência "nTCCnnGAA-(5 pb)-nGAGn" (Liu & Thiele, 1996, Santoro *et al.*, 1998) e elementos similares a este também regulam a expressão dos genes *HSP82* e *HSC82* (Borkovich *et al.*, 1989, Erkin *et al.*, 1995). Até então não estava claro se o contato imediato de pelo menos dois motivos "nGAAn" era necessário para a resposta ao choque térmico *in vivo*. Também em *S. cerevisiae*, a região promotora do gene *MDJ1*, que codifica para uma proteína mitocondrial homóloga a DnaJ (Hsp40), contém um ncHSE que consiste de três sequências pentaméricas separadas "nTTCn-(11 pb)-nGAAn-(5 pb)-nGAAn", sendo a primeira evidência de que o contacto imediato de pelo menos duas sequências repetidas não se mostrou necessário para a ativação da transcrição pelo HSF *in vivo* (Tachibana *et al.*, 2002).

O HSF é codificado por um único gene (*HSF-1*) em leveduras e em *Drosophila melanogaster*, enquanto dois a três diferentes HSFs podem co-existir em plantas, aves e células de mamíferos (Morimoto *et al.*, 1994). O HSF é composto de dois domínios conservados: um domínio de ligação ao DNA na forma de hélice-volta-hélice e um domínio necessário à trimerização, composto de repetições hidrofóbicas "coiled-coil" (Harrison *et al.*, 1994; Rabindran *et al.*, 1993).

Em *Schizosaccharomyces pombe* e em todos os eucariotos superiores estudados, a ativação do HSF dá-se em dois estágios. Sob condições normais, o fator HSF está presente no citoplasma ou no núcleo em forma monomérica e possui baixa afinidade de ligação ao DNA. Em resposta ao aumento de temperatura e outros estresses, o HSF assume rapidamente uma forma trimérica, acumula-se no núcleo e ativa a transcrição dos genes de choque térmico (Westood *et al.*, 1991). Em contraste, nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, o HSF

está constitutivamente presente na forma trimérica e somente ativa a transcrição após o choque térmico (Jakobsen & Pelham, 1988).

Em *S. cerevisiae*, o HSF é um dos fatores responsáveis pela manutenção da expressão basal de certos promotores de genes de choque térmico devido em parte por estar constitutivamente ligado ao HSE. A deleção do gene que codifica o HSF dos genomas de *S. cerevisiae* e de *K. lactis* é letal em condições normais de crescimento, sendo este fenótipo atribuído à importante função do HSF na expressão basal dos genes de choque térmico (Jakobsen & Pelham, 1988).

O HSF de *S. pombe* possui um domínio estrutural que é mais próximo à estrutura dos HSFs humanos e de *D. melanogaster* do que a estrutura dos HSF de leveduras, sendo assim a regulação do HSF em *S. pombe* é a que mais reflete como deve ocorrer a regulação nos metazoários. Supreendentemente, o HSF de *S. pombe* é necessário para o crescimento em temperaturas normais, mesmo possuindo uma ativação diferente de *S. cerevisiae*, isto é, o HSF não está constitutivamente ligado ao HSE. A substituição do HSF de *S. pombe* pelo HSF de *D. melanogaster* não altera significativamente a viabilidade das células desta cepa, nem os níveis dos transcritos induzidos pelo calor, quando as células são submetidas transientemente ao choque térmico. Entretanto, esta mesma cepa apresentou diminuição nos níveis de crescimento e alterações morfológicas em temperaturas normais de crescimento. Estes resultados demonstram que a conservação funcional dos domínios do HSF é necessária para a resposta ao choque térmico, e que o HSF desempenha uma ampla função durante o crescimento das células eucarióticas sob condições normais de crescimento (Gallo *et al.*, 1993).

Em *S. cerevisiae* mostrou-se que o aumento da transcrição dos genes de choque térmico está associado a modificações pós-traducionais do HSF, sendo proporcional ao seu grau de fosforilação (Sorger & Pelham, 1988). Em contraste, a indução da fosforilação promovida pelo choque térmico no HSF de *K. lactis* foi proposta como desativadora da atividade transcricional (Hoj & Jakobsen, 1994).

Nas células de mamíferos, sob condições normais de crescimento, o HSF-1 está presente numa forma monomérica e fosforilada, mas suas propriedades de ligação ao DNA estão reprimidas. Em resposta ao choque térmico e outros estresses

químicos, ambientais ou fisiológicos, o HSF-1 forma trímeros que se ligam ao HSE nas regiões promotoras dos genes alvo e passa a ter atividade transcricional, sendo relocado em grânulos nucleares (Wu, 1995). A dificuldade em correlacionar a fosforilação com aumento da transcrição foi devido ao HSF-1 possuir um grande número de sítios potenciais para fosforilação de serina e que certos sítios são constitutivamente fosforilados. Recentemente, experimentos de fosforilação *in vivo* demonstraram que o aminoácido Ser230, localizado no domínio regulatório do HSF-1 humano, é responsável pela magnitude da indução da resposta da atividade transcricional e que este aminoácido pertence a um sítio consenso de fosforilação pela proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII). Também foi demonstrado que a superexpressão da CaMKII aumenta tanto a fosforilação da Ser230 quanto a transativação do HSF-1 humano *in vivo* (Holmberg *et al.*, 2001).

Um outro ponto a ser destacado é como diferentes condições de estresse levam à ativação de um único fator de transcrição (na maioria dos organismos estudados), que é capaz de ativar um conjunto de genes específicos necessários para a sobrevivência celular diante do estresse enfrentado. Então é possível que o HSF possua domínios que são necessários para a resposta a um certo grupo de indutores de estresse, e que esses domínios não sejam necessários para a resposta a outros estresses. Deleções na porção C-terminal do HSF de *S. pombe* demonstraram que uma certa mutação conferiu aumento da sensibilidade ao cádmio enquanto manteve próximo ao normal a sensibilidade ao choque térmico, enquanto uma outra mutação, contrariamente, causou aumento da sensibilidade ao choque térmico mas manteve normal a sensibilidade ao cádmio. A análise desses mutantes indicou que essas deleções afetam a capacidade do HSF de ativar promotores específicos, sugerindo que as diferentes habilidades desses mutantes sobreviverem frente aos dois estresses testados resultam da diferença do HSF de ativar promotores de genes necessários para a sua sobrevivência mais do que as diferenças de "sentir" o tipo de estresse (Saltsman *et al.*, 1999).

3. Hsp90

A Hsp90 é uma proteína citosólica em bactérias (HtpG) e em eucariotos, com proteínas homólogas encontradas no retículo endoplasmático (Grp94) e na mitocôndria (TRAP-1) de eucariotos superiores. A Hsp90 tem função de chaperone molecular ligando proteínas na sua forma não-nativa mas que possuem um alto grau de sua estrutura secundária, prevenindo sua agregação e mantendo-as numa certa conformação para que ocorra o completo enovelamento por outras chaperones. Em contraste a outras chaperones, vários substratos *in vivo* já foram caracterizados para a Hsp90, mas seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. Estudos em eucariotos mostraram uma associação específica da Hsp90 com proteínas envolvidas em transdução de sinal. Estas proteínas incluem membros da família de tirosina quinases (p. ex. Src), serina/treonina quinases (p. ex. Raf), fatores de transcrição (p. ex. receptor de hormônios esteróides), entre outras com funções diversas. Em todos os casos, a associação desses substratos protéicos com a Hsp90 provam sua importância para a atividade das proteínas transdutoras de sinal, mas o efeito específico que a Hsp90 exerce sobre essas proteínas ainda é desconhecido (revisado por Richter & Buchner, 2001).

A Hsp90 exerce um papel importante na função celular tanto em condições normais como em condições de estresse, sendo extremamente conservada e muito abundante. Ela representa aproximadamente 1 a 2% das proteínas totais presentes no citosol, em condições normais, e seus níveis aumentam quando as células são expostas a um estresse (Borkovich *et al.*, 1989). Enquanto a homóloga à Hsp90 de *Escherichia coli* (HtpG) é dispensável (Bardwell & Craig, 1988), a Hsp90 é essencial para a viabilidade em *S. cerevisiae* (Borkovich *et al.*, 1989) e *D. melanogaster* (Cutforth & Rubin, 1994).

A Hsp90 exerce uma ação moduladora sobre os receptores de hormônios glicocorticóides formando complexos estáveis, de vida longa, deixando-os inativos até que o hormônio ligue-se aos receptores para ativá-los. Os receptores de glicocorticóides são sistemas de transdução de sinal direta, em que o receptor recebe o sinal através da ligação do hormônio e sua forma, agora ativada, liga-se a

seqüências “enhancer” no genoma alterando a transcrição de genes específicos (Yamamoto, 1985). Nesses receptores, a presença da Hsp90 anula a atividade do receptor de se ligar ao DNA, além disso, a Hsp90 possui atividade de ATPase e permite autofosforilação. O receptor de esteróide sem estar ligado ao hormônio, está ligado à Hsp90 e Hsp56 no citosol; este complexo estequiométrico é formado pelo receptor de glicocorticóides, por duas moléculas de Hsp90 e uma de Hsp56 (Pratt, 1993).

Outros substratos da Hsp90 incluem também o receptor de insulina que é uma tirosina quinase; MEK, Cdk4, CK-II (caseína quinase II), eIF2 α quinase, Pim-1, que são serina/treonina quinases; HSF, p53 e os receptores de progesterona, estrogênio e androgênio como fatores de transcrição e outras proteínas como CFTR (regulador transmembranar da fibrose cística), aminoacil tRNA sintetases, citocromo P450, telomerase, calmodulina, óxido nítrico sintase, proteínas de citoesqueleto como actina e tubulina, entre outras (Richter & Buchner, 2001).

A Hsp90 *in vitro* forma complexos dinâmicos com muitas proteínas acessórias como por exemplo: hop (p60, Sti1), hip (p48), p23, Hsp70, DnaJ, p50 (cdc37), as peptidil-prolil *cis/trans* isomerases FKBP52 (hsp56, p59), FKBP51 e Cyp40 (Cpr6, Cpr7) e Pp5. A maioria destas proteínas é também abundante e também possuem alguma atividade de chaperone *in vitro* (Richter & Buchner, 2001). A complexidade deste sistema de chaperone dificulta a análise da sua função em sistemas isolados.

A Hsp90 é encontrada na forma dimérica, composta por dois domínios conectados um ao outro por uma junção flexível e em mamíferos possui duas isoformas α e β , sendo que a maioria das Hsp90 existe na forma de homodímeros Hsp90 α/α e Hsp90 β/β (Minami *et al.*, 1991). O domínio carboxi-terminal contém o sítio de ligação a calmodulina (Minami *et al.*, 1993) é e responsável pela dimerização da Hsp90 (Minami *et al.*, 1994), enquanto o domínio amino-terminal possui um sítio de ligação a ATP. Este mesmo sítio é reconhecido pelo agente antitumoral geldanamicina que age bloqueando a ligação do ATP atuando, portanto, como um inibidor da Hsp90 (Prodromou, 1997).

A levedura *S. cerevisiae* possui dois genes, por genoma haplóide, que codificam para proteínas homólogas a Hsp90: a Hsc82 que é constitutivamente

expressa e a Hsp82 que tem um baixo nível basal de expressão e é induzida 10 a 15 vezes com o calor. Se um desses genes é inativado, as células são viáveis, embora as células não sejam capazes de crescer a altas temperaturas ($>37,5^{\circ}\text{C}$). Mas se ambos os genes são inativados, as células são inviáveis (Borkovich *et al.*, 1989; Farrelly & Finkelstein, 1984) indicando que a Hsp90 deve ter um papel importante tanto a temperaturas fisiológicas como sob choque térmico. Em *E. coli*, uma cepa mutante para o gene *hspG* é também incapaz de sobreviver a altas temperaturas (Bardwell & Craig, 1987).

Em *D. melanogaster* a Hsp90 tampona as variações genéticas em vias morfogenéticas que ocorrem na natureza, mantendo-as comumente silenciadas e permitindo que as mutações se acumulem. Quando o tamponamento pela Hsp90 é comprometido, por exemplo, pelo aumento da temperatura, essas proteínas variantes são expressas e, devido à seleção natural, podem levar a contínua expressão desses traços, mesmo quando a função da Hsp90 é restabelecida (Rutherford & Lindquist, 1998). O padrão e os níveis da variação genética diferem muito entre espécies obrigatoriamente dependentes de cruzamento, como as moscas e espécies autofertilizantes, como a planta *Arabidopsis thaliana*. Mas, em *A. thaliana*, os efeitos da Hsp90 sobre o tamponamento e posterior liberação das variações genéticas também sugerem um impacto nos processos evolutivos. A manipulação da capacidade tamponante pela Hsp90 oferece uma ferramenta para a contenção das variações genéticas e para a elucidação da influência do genótipo, do ambiente e de eventos aleatórios na determinação do fenótipo (Queitsch *et al.*, 2002).

4. Hsp60 / Hsp10

Os genes *GroES* e *GroEL* de bactéria (*hsp10/hsp60* em eucariotos) foram primeiramente identificados em *Escherichia coli*. As Hsp60 foram denominadas chaperoninas para definir a subclasse de chaperones moleculares altamente homólogas, incluindo membros induzidos ou não por estresses fisiológicos,

encontradas no citosol de bactérias e no espaço interno de mitocôndrias (McMullin & Halberg, 1987) e cloroplastos (Hemmingsen & Ellis, 1986).

O Sistema Hsp60 de chaperones moleculares é composto de dois membros que cooperam entre si. Um dos membros é a proteína Hsp60 (GroEL) de aproximadamente 60 kDa, que é composta de 14 subunidades dispostas na forma de dois anéis, com 7 subunidades cada, onde se encaixam substratos protéicos que vão sofrer enovelamento. O outro membro do sistema é a proteína Hsp10 (GroES) de aproximadamente 10 kDa, que forma uma estrutura tipo capacete, composta de 7 unidades da proteína, e que quando conectada à cavidade central da Hsp60 proporciona um espaço adicional e proteção para o substrato protéico confinado na cavidade. GroES modula a atividade ATPásica de GroEL, responsável pela liberação, no tempo certo, dos polipeptídeos ligados ao sistema aumentando assim, a eficiência de GroEL (revisado por Bukau & Horwich, 1998).

O complexo Hsp60/Hsp10 exerce uma função fundamental nas células, sendo na maior parte das vezes genes essenciais à viabilidade celular, na medida que auxilia uma grande variedade de proteínas recém-sintetizadas ou recém-translocadas a alcançarem a sua estrutura nativa através da criação de um ambiente favorável ao enovelamento destes polipeptídeos, dentro da sua cavidade central (Fenton & Horwich, 1997).

5. O modelo de estudo *Blastocladiella emersonii*

Blastocladiella emersonii é um fungo aquático não filamentoso que foi isolado e descrito por Cantino (1951) e pertence à classe dos *Chytridiomycetes*, ordem *Blastocladales*. Estudos baseados na seqüência do RNA ribossomal propuseram que *B. emersonii* está situada na base da árvore evolutiva dos fungos (Van der Auwera & De Wachter, 1996), o que o torna um bom modelo para estudos evolutivos. Além disto, *B. emersonii* possui um desenvolvimento bastante peculiar (Figura 1) apropriado para o estudo da regulação gênica associada a processos de diferenciação celular. Uma das vantagens deste organismo é possuir um ciclo de vida curto (de aproximadamente 24 horas a 17°C), onde se alternam um estágio

vegetativo, imóvel e outro com esporos flagelados. A formação destes dois tipos celulares envolve dois processos de diferenciação celular: (1) a esporulação, quando a célula vegetativa origina um grande número de zoósporos e, (2) a germinação, quando cada zoósporo origina uma nova célula vegetativa (Lovett, 1975).

O zoósporo caracteriza-se por ser uma célula altamente diferenciada, livre-natante e desprovida de parede celular. É uma célula que não cresce, não se divide e não sintetiza DNA, RNA ou proteína. Neste tipo celular todos os ribossomos estão contidos em uma estrutura chamada capacete nuclear e além desta estrutura atípica, o zoósporo possui também uma única mitocôndria gigante, que é formada pela fusão de mitocôndrias menores durante o processo de esporulação.

Quando o zoósporo encontra condições nutricionais adequadas inicia-se a fase de germinação. A célula retrai o flagelo, tornando-se arredondada, e começa a formar uma parede celular rica em quitina. A síntese da parede de quitina ocorre nos primeiros 20 minutos de germinação e independe de síntese de proteínas e RNA, o que mostra que este evento está sob regulação pós-traducional (Soll & Sonneborn, 1971). A formação de um tubo germinal primário, que dará origem a um sistema de rizóides, é o evento posterior à síntese da parede, sendo necessária nesta fase a síntese de proteínas, mas não de RNA. Nesta etapa, a célula utiliza mRNAs que provavelmente são armazenados no capacete nuclear dos zoósporos durante os últimos 30 minutos da esporulação (Jaworski & Thomson, 1980). A partir deste ponto todos os eventos que se sucedem necessitam tanto de tradução quanto de transcrição. Aproximadamente 2 horas após a indução da germinação ocorre a primeira divisão nuclear, sendo que, durante todo o crescimento vegetativo ocorrem inúmeras divisões nucleares sem que ocorra divisão celular, culminando com a formação de um coenócito.

Figura 1: Esquema do ciclo de vida de *Blastocladiella emersonii*. Estão representados os dois processos de diferenciação celular: a germinação e a esporulação. Modificado de Lovet (1975).

A qualquer momento do crescimento exponencial, se as células forem submetidas à carência nutricional, inicia-se o processo de esporulação, que se caracteriza por intenso rearranjo de organelas levando à formação dos zoósporos. No decorrer deste processo, podem ser observados fenótipos bem característicos: na primeira hora após o carenciamento observa-se a formação de um septo basal, que separa os rizóides do citoplasma. Uma hora após a formação do septo há o aparecimento de uma papila no ápice da célula vegetativa por onde os zoósporos serão liberados. Na última fase de esporulação observa-se a clivagem do citoplasma em torno de cada núcleo, formando os zoósporos que serão liberados para o meio no final do processo.

Durante toda a esporulação ocorre uma intensa renovação do conteúdo protéico e de mRNAs, sendo que apenas metade dos mRNAs sintetizados no início da esporulação está presente nos zoósporos (Silva *et al.*, 1986). Outro evento molecular característico desta fase é a intensa proteólise, que Correa e colaboradores (1978) demonstraram ser necessária para a conversão de células vegetativas em zoosporângios. Além destes fatores, inúmeras atividades enzimáticas relacionadas à transdução de sinais aumentam durante a esporulação: a da guanilato ciclase (Silverman, 1976), da adenilato ciclase (Gomes *et al.*, 1978), da fosfodiesterase de cAMP (Maia & Camargo, 1974), da fosfodiesterase de cGMP (Vale & Maia, 1976), da proteína quinase dependente de cAMP (Juliani & Maia, 1979), entre outras.

Nos últimos anos, estudos de alguns genes isolados de *B. emersonii* confirmaram a forte influência do desenvolvimento no padrão de expressão gênica deste organismo. Os genes que codificam para as subunidades catalítica e regulatória da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), por exemplo, tem sua expressão aumentada durante a esporulação. Experimentos de "Northern blot" demonstraram que estes genes possuem uma regulação coordenada ao longo do desenvolvimento do fungo (Marques & Gomes, 1992; Marques *et al.*, 1992; de Oliveira *et al.*, 1994).

O gene que codifica para a calmodulina também possui um padrão de expressão variável durante o ciclo de vida do fungo, atingindo níveis máximos de expressão nos estágios finais da esporulação (Simão & Gomes, 2001).

Os genes que codificam para duas ATPases do tipo P (BePAT1 e BePAT2) possuem uma regulação não-coordenada, regulada durante o desenvolvimento do fungo. Experimentos de RT-PCR demonstraram que o gene BePAT1 atinge níveis máximos de expressão no zoósporo enquanto que o gene BePAT2 atinge níveis máximos de expressão aos 120 minutos da esporulação (Fietto *et al.*, 2002).

6. A resposta ao choque térmico em *Blastocladiella emersonii*

Em *B. emersonii*, a resposta ao choque térmico é dependente do estágio de desenvolvimento. A exposição das células a temperaturas elevadas (38°C) em diferentes etapas do ciclo de vida mostrou a síntese diferencial das proteínas de choque térmico. Conjuntos específicos de proteínas de choque térmico são induzidos em cada fase do ciclo de vida. Ao todo foram identificados vinte e dois polipeptídios e dentre estes sete são induzidos tanto na germinação como no crescimento e esporulação (Bonato *et al.*, 1987). Estes são as Hsps 82a, 82b, 76, 70, 60, 25 e 17b, sendo essas proteínas envolvidas no fenômeno de termoproteção ou termotolerância a temperaturas letais (Silva *et al.*, 1987). A Hsp24 é característica da germinação, enquanto que as Hsps 39b, 39c, e 39d só são expressas na esporulação. Verifica-se assim, que o controle da ativação transitória dos genes de choque térmico está, aparentemente, superposto a um controle de desenvolvimento representado pela indução específica de um determinado conjunto de Hsps a cada fase do desenvolvimento (Bonato *et al.*, 1987).

O gene que codifica a proteína Hsp70 de *B. emersonii* foi isolado e caracterizado em nosso laboratório (Stefani & Gomes, 1995). O gene *hsp70* de *B. emersonii* é induzido pelo estresse de temperatura em qualquer fase do ciclo de vida, mas também é expresso durante a fase de esporulação, a temperaturas fisiológicas, apresentando um pico de transcrição aos 90 minutos (Stefani & Gomes, 1995). A análise por "Southern blot" revelou a presença de um único gene codificando a

Hsp70, o qual é interrompido por um íntron de 165 pb. Sua região promotora mostra uma possível "TATA box", seqüências consenso para ligação dos fatores de transcrição Sp1 e ATF, e várias seqüências que se assemelham aos elementos de choque térmico (HSE), todos possíveis elementos de transcrição responsáveis pela indução no choque térmico, bem como durante a esporulação em temperaturas fisiológicas (Stefani & Gomes, 1995).

Bonato e colaboradores (1987) também mostraram que a regulação da expressão dos genes de choque térmico em *B. emersonii* ocorre na etapa de transcrição, visto que a adição de actinomicina D, um inibidor da síntese de RNA, inibia a síntese destas proteínas durante o choque térmico em qualquer fase do ciclo de vida do fungo.

Nos organismos já estudados, o choque térmico resulta na imediata ativação da transcrição dos genes de choque térmico e, em muitos, a tradução preferencial das mensagens desses genes. Alguns genes *hsp90* possuem íntrons, o que não é muito comum para os genes que codificam para proteínas de choque térmico, já que o choque térmico afeta o metabolismo do RNA, tanto no seu processamento como na sua degradação (Sadis *et al.*, 1988). Em células de *D. melanogaster* e de *S. cerevisiae* o processamento do mRNA do gene *hsp83* é inibido durante o choque térmico (Yost & Lindquist, 1986; Yost & Lindquist, 1991). Em *Drosophila* o bloqueio do processamento não ocorre somente no gene *hsp83*, mas também com o gene *Adh* que codifica para álcool desidrogenase (Yost & Lindquist, 1986). Foi então proposto que o bloqueio do splicing era devido a termolabilidade do spliceossomo e que poderia representar um mecanismo de controle para interromper a transcrição de todos os genes que contêm íntrons, enquanto que a maioria dos transcritos de genes de choque térmico escaparia desse controle devido à ausência de íntrons nas suas regiões codificadoras (Yost & Lindquist, 1990).

Em *Blastocladiella emersonii* o choque térmico a temperatura letal de 42°C provocou inibição parcial do splicing do íntron do gene *hsp70*. Observou-se que 30% do mRNA da Hsp70 se encontrava na forma de transcrito primário (Stefani & Gomes, 1995). Já em levedura, a exposição das células a 41°C provoca mais de 70% de inibição do processamento do íntron do mRNA da actina e que o pré-tratamento da

célula a uma temperatura mais baixa, como 37°C, antes de se passar para 41°C, ou seja, quando se induzia uma certa termotolerância na célula, o mRNA não-processado não acumulava (Yost & Lindquist, 1991). Também em *Drosophila* a passagem por uma temperatura intermediária protegia o processamento do mRNA da inibição por um subsequente choque térmico severo (Yost & Lindquist, 1986). Em *B. emersonii* a termotolerância não exerceu qualquer efeito protetor no processamento do mRNA da Hsp70 observando-se que a mesma proporção de mensageiro não processado acumulava na célula termotolerante (24%) comparando-se com o choque térmico a 42°C (30%) demonstrando que a maquinaria de processamento de mRNA em *Blastocladiella emersonii* é extremamente termorresistente (Stefani & Gomes, 1995).

OBJETIVOS

O objetivo principal desta tese foi a clonagem e a caracterização do gene *hsp90* do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*, juntamente com a análise da sua região regulatória para compará-la à região regulatória já caracterizada do gene *hsp70* deste mesmo fungo (Stefani & Gomes, 1995). Como a região regulatória do gene *hsp70* de *B. emersonii* não se enquadrava no padrão normal descrito para genes de choque térmico de outros organismos eucariotos, a caracterização da região regulatória de outro gene de choque térmico poderia auxiliar na determinação de quais são as seqüências necessárias para a regulação dos genes de choque térmico em *B. emersonii*.

A análise da expressão do gene *hsp90* também foi objetivo deste trabalho, estudando-se as variações nos níveis de mRNA e de proteína durante o ciclo de vida do fungo e sob choque térmico.

Esta tese descreve também estudos sobre a expressão dos genes *hsp60* e *hsp10*, cujos cDNAs completos foram isolados em nosso laboratório.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Cultivo de *Blastocladiella emersonii*

Para o crescimento do fungo aquático *B. emersonii*, as culturas são renovadas diariamente através de repique de zoósporos, os quais germinam na superfície do meio PYG ágar, transformando-se em esporângios maduros após 16-20 horas a 19°C. A liberação dos zoósporos ocorre espontaneamente ou após adição de água miliQ estéril na superfície da placa. Para o repique, os zoósporos foram coletados, diluídos 1:10 em água miliQ estéril e semeados em outra placa.

2. Linhagens, fagos e plasmídeos

2.1. Cepas de *Escherichia coli*

Y1090 - $\Delta lacU169$ $proA^+$ Δlon $araD139$ $strA$ $supF(trpC22::tn10)$, hsd^+ (pMC9)

XL1Blue MRA (P2) - $\Delta(mrcA)183$ $\Delta(mrcCB-hsdSMR-mrr)173$ $endA1$ $supE44$ $thi-1$ $gyrA96$ $relA1$ lac (P2 lisogênico)

TG-1 - $supE$ $hsd\Delta5$ thi $\Delta(lac-proAB)$ $F'[traD36 proAB^+ lacI^q lacZ\Delta M15]$

DH5 α - $supE44$ $lacU169$ (80 $lacZ$ M15) $hsdR17$ $recA1$ $endA11$ $gyrA96$ $thi-1$ $relA1$

2.2. Vetores de clonagem

λ gt11 – Stratagene - Young & Davis, 1983

λ DASH - Stratagene

pBluescript SK – replicon ColE1, fagemido, Ap^r - Stratagene

pUC BM20 e pUC BM 21 - replicon ColE1, Ap^r – Böehringer Mannheim

M13 mp18 e M13mp19 – Yanisch-Perron *et al.*, 1985

pGEM T-easy - Promega

2.3. Vetor de expressão

pPROEX-HT - vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade N-terminal da proteína a ser expressa (Gibco-BRL).

3. Enzimas de restrição e demais reagentes

Enzimas de restrição – New England Biolabs

T4 DNA ligase - New England Biolabs e Gibco

T4 polinucleotídeo kinase – New England Biolabs

Fosfatase alcalina de camarão - USB

Random primer – Rediprime II kit – Amersham

Thermo Sequenase sequencing kit – Amersham

Sequenase sequencing kit – Amersham

Big Dye Terminator Sequencing Kit - PE Biosystems

DYEnamic ET Terminator Sequencing Kit - Amersham Pharmacia

4. Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Gibco-BRL ou Promicro.

Forward - M13/pUC sequencing primer (-40)

Reverse - Reverse M13 (lacZ) primer

T7 - RNA polimerase promoter primer

Sp6 - RNA polimerase promoter primer

4.1. Reações de seqüenciamento do gene *hsp90* (os números entre parênteses equivalem à posição no clone genômico da *hsp90* *NotI/BamHI* de 4,0 kb)

G3 - 5' CTGTGCAACACAAGGCGG 3' (nt 230 a 247)

G5 - 5' GAGACACGCTCGGAAGCG 3' (nt 619 a 636)

Hsp90forw - 5' CGACTCGACGTGCTTCGC 3' (nt 748 a 765)

C4 - 5' CGGACGACGGCAGCGACG 3' (nt 1131 a 1014)

Hsp90rev - 5' TTGATGCGGATGAACAGG 3' (nt 1358 a 1341)

C5 - 5' ACCATCAAGCGCGACACC 3' (nt 1630 a 1647)

C2 - 5' TGCTTCTTGATGATCTCC 3' (nt 1751 a 1734)

G1 - 5' AGGGCATCGTCGACTCGG 3' (nt 2243 a 2260)

C1 - 5' TTCTCGACCTTGTCGCCG 3' (nt 2823 a 2840)

G4 - 5' ACGCGTCGGACAAGACGG 3' (nt 3044 a 3061)

G2 - 5' GCAGTCGAAGTCGTTCCG 3' (nt 3496 a 3478)

4.2. Extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa

PrExt90 - 5' TCTCGGGCTGCGACATGG 3' (nt 987 a 970)

PrExt60 - 5' GGGGAATGCGGTGCATGG 3'

PrExt10 - 5' GGGGGATGATACGCTTGG 3'

4.3. RACE-PCR

RACE 5' - 5' GGAGACCAGCTCACGCAGGAAGAC 3' (nt 1266 a 1243)

4.4. PCR para amplificação do gene *hsp60* (as bases sublinhadas mostram os sítios de enzimas de restrição usados para clonar o produto de PCR). Os oligonucleotídeos Hsp60Eh foram baseados nos descritos por Clark & Roger (1995).

hsp60-1 - 5' TATGAATTCGACGGCGTSACSGTSGC 3'

hsp60-2 - 5' TATGAATTCGCSGGCGACGGCACSAC 3'

hsp60-3 - 5' TATAAAGCTTGTTGTCGCCGAAGCCSGG 3'

hsp60-4 - 5' TATAAAGCTTTCGCCGAAGCCSGGSGCC 3'

Hsp60Eh-Eco - 5' GGAATTCCCSAAGRTCACSAAGGACGGCGTSACSGT 3'

Hsp60Eh-Hind - 5' TATAAAGCTTGCCGCCGCCSGGSACGATGCC 3'

Hsp60Eh-forw - 5' CCSAAGRTCACSAAGGACGGCGTSACSGT 3'

Hsp60Eh-rev - 5' GCCGCCGCCSGGSACGATGCC 3'

4.5. Reações de seqüenciamento do cDNA da Hsp60

Hsp60seqforw - 5' GAGAAGGCGACCATTTGAC 3'

Hsp60seqrev - 5' GACGACAAACGAGCCAGAG 3'

5. Meios de cultura

As linhagens de *E. coli* foram crescidas a 37°C em meio LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5), 2 x TY (triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,5) ou SOB (triptona 20 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 0,6 g/L; KCl 0,2 g/L; pH 6,8). Quando necessário, foi adicionada ampicilina (100 µg/mL). Os meios sólidos continham 1,5% de ágar, o LB "soft" 0,7%.

Para crescimento diário de *B. emersonii* foi utilizado o meio PYG ágar (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125 %; glicose 0,3%; ágar 1%). Para experimentos que necessitaram de grande quantidade de células foram utilizados os meios líquidos PYG-P (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125 %; glicose 0,15%; KH₂PO₄ 2,5 mM; K₂HPO₄ 2,5 mM, pH 6,8) ou o meio definido DM-4 (Maia & Camargo, 1974).

6. Extração de DNA de *Blastocladiella emersonii*

Para a obtenção de zoósporos em grandes quantidades, cerca de 7×10^7 zoósporos, obtidos de placas de PYG, foram inoculados por litro de PYG-P. A contagem dos zoósporos foi feita em câmara de Neubauer, diluindo-se os zoósporos 1:10 em formol 3,5%. A cultura permaneceu por aproximadamente 16h a 22°C sob agitação de 150 rpm. Então as células vegetativas foram coletadas por filtração em rede de nylon (30 µm de poro) e lavadas com 1,4 litros de solução de esporulação (Tris-maleato 1 mM, pH 6,8; CaCl₂ 1mM). A seguir, as células foram ressuspensas em 600 mL desta solução numa concentração de aproximadamente $1,7 \times 10^5$ células/mL e incubadas a 27°C, com agitação de 150 rpm, durante aproximadamente 3,5 horas. Após esse tempo era possível observar que a maioria dos esporângios

estava vazia. Os zoósporos foram separados dos esporângios por filtração em rede de náilon, sendo os zoósporos concentrados por centrifugação em rotor GSA-Sorvall, 4.000 rpm por 5 minutos.

Os zoósporos obtidos (cerca de $4,0 \times 10^9$) foram ressuspensos em 5 mL de solução de esporulação, adicionando-se a seguir 5 mL de tampão A (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 1M; SDS 2%) e 10 mL de fenol equilibrado em tampão A. A mistura foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugada em rotor S4180 - Beckman, a 4.500 rpm por 20 minutos. À fase aquosa coletada foram adicionados 40 mL de etanol gelado, e incubou-se por 30 minutos em gelo seco. A suspensão foi centrifugada em rotor SS-34 - Sorvall, 8.000 rpm, a 4°C, por 15 minutos e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado final foi ressuspenso em 4 mL de uma solução de SSC 1 x e dialisado contra SSC 0,1 x durante a noite a 4°C. A seguir, adicionou-se ao próprio conteúdo da membrana de diálise 0,2 mL de SSC 20 x (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M pH 7,0) e as enzimas: α -amilase IIA (200 μ g/mL), RNase A (400 μ g/mL) e RNase T1 (280 U). O tratamento com as enzimas foi feito a 37°C, dialisando-se a amostra contra SSC 1 x. Após 3 horas de incubação, mediu-se a D.O._{260nm} do tampão de diálise para verificar a saída dos nucleotídeos livres gerados pela digestão com as RNases. O tampão de diálise foi trocado várias vezes, e a diálise prosseguiu até que a D.O._{260nm} fosse zero. A seguir foram adicionados 350 μ g/mL de pronase e incubou-se a amostra por 2 horas a 37°C. A solução foi então misturada com fenol equilibrado em tampão B (Tris HCl 0,5 M, pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 10 mM; SDS 0,5%) e agitada por 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugou-se a amostra em rotor S4180 - Beckman, a 4.500 rpm por 20 minutos. À fase aquosa coletada, foram adicionados 40 mL de etanol gelado, e incubou-se por 30 minutos em gelo seco. A suspensão foi centrifugada em rotor SS-34 Sorvall, a 8.000 rpm, por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com etanol 70%, gelado. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de SSC 0,1 x e dialisado contra SSC 0,1 x durante a noite a 4°C. A solução contendo o DNA foi estimada medindo-se a D.O._{260nm}, assumindo que D.O._{260nm}=1 corresponde a 50 μ g/mL de DNA.

7. "Southern blot"

Aproximadamente 10 µg de DNA total extraído de zoósporos de *B. emersonii*, foram digeridos com diferentes enzimas de restrição e o volume total da digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 1 x (Tris-HCl 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 20 mM). Após aproximadamente 2 horas de corrida eletroforética a 80 volts, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

Após a corrida eletroforética, o gel foi tratado, sob agitação, com as seguintes soluções:

- solução de despurinação (HCl 250 mM) - 15 minutos;
- solução de desnaturação (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) - 20 minutos;
- solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; NaCl 1,5 M) - 20 minutos;
- SSC 10 x - alguns minutos.

Após o tratamento do gel, uma membrana de náilon (Hybond N, Amersham) foi umedecida também em SSC 10 x e o DNA do gel foi transferido por pressão para a membrana em solução de SSC 10 x, utilizando o sistema de transferência Posiblot (Stratagene), durante 1 hora sob 75 mmHg de pressão. A membrana foi seca por 10 minutos a 80°C e o DNA transferido para a membrana foi fixado sob luz ultravioleta. Após a fixação do DNA, a membrana foi incubada em solução de pré-hibridização por no mínimo 30 minutos, na temperatura desejada, em forno de hibridização (Hybaid) com agitação. Ao final desse tempo a sonda radioativa, previamente desnaturada durante 5 minutos a 94°C, foi adicionada a essa solução e a incubação prosseguiu durante 16 horas na temperatura desejada. Após esse período, a solução de hibridização contendo a sonda foi retirada e a membrana foi lavada em três etapas, nas temperaturas desejadas, sob agitação.

Após as lavagens, a membrana foi exposta a filme de raios-X (X-Omat, Kodak) em cassete com tela intensificadora, por no mínimo 24 horas a -70°C.

	Alta estringência	Baixa estringência
Solução de Pré-hibridização / Hibridização	tampão fosfato de potássio 60 mM, pH 6,2; SSC 2 x; EDTA 10 mM; SDS 0,1%; formamida 50% e leite em pó desnatado 5%	tampão fosfato de potássio 60 mM, pH 6,2; SSC 4 x; EDTA 10 mM; SDS 0,1%; formamida 30% e leite em pó desnatado 5%
Temperatura de hibridização	42°C	37°C
Soluções de lavagem	SSC 2 x; SDS 0,1 % por 30 min SSC 0,5 x; SDS 0,1 % por 30 min SSC 0,1 x; SDS 0,1 % por 30 min	SSC 4 x; SDS 0,1 % por 30 min SSC 4 x; SDS 0,1 % por 30 min SSC 4 x; SDS 0,1 % por 30 min
Temperatura de lavagem	50°C	37°C

8. Extração de RNA total de *Blastocladiella emersonii*

Para analisar os níveis dos mRNAs das proteínas de choque térmico ao longo do ciclo de vida do fungo e sob condição de choque térmico ou exposição a cádmio, foram isoladas amostras de RNA total seguindo-se análise por "Northern blot".

Para a obtenção de células sincronizadas em grandes quantidades, em diferentes estágios do desenvolvimento do fungo, zoósporos obtidos de placas de PYG foram inoculados em meio DM-4, conforme descrito a seguir.

8.1. Esporulação

Foram inoculados 2×10^8 zoósporos em 1 litro de DM-4 e a cultura foi incubada por aproximadamente 16h a 17°C, sob agitação de 150 rpm. As células vegetativas foram então coletadas por filtração em rede de náilon e lavadas com 1,4 litros de solução de esporulação. A seguir as células vegetativas foram ressuspensas em 600 mL desta solução e alíquotas de 50 mL foram distribuídas contendo aproximadamente $1,6 \times 10^7$ zoósporos. As células foram então incubadas com agitação de 150 rpm a 27°C (temperatura normal) ou 38°C (choque térmico) por

diferentes intervalos de tempo até no máximo 3 horas, quando termina a esporulação e ocorre a liberação total dos zoósporos dos zoosporângios.

8.2. Germinação

Zoósporos obtidos conforme descrito no item 8.1 foram separados dos esporângios por filtração em rede de náilon, contados em câmara de Neubauer e concentrados por centrifugação em rotor GSA-Sorvall, 4.000 rpm por 5 minutos.

Aproximadamente $1,0 \times 10^8$ zoósporos foram inoculados em 50 mL de meio DM-4 em erlenmeyers e as culturas incubadas com agitação de 150 rpm a 27°C, a 38°C, ou a 27°C com a adição de 100 µM de CdCl₂ por diferentes intervalos de tempo, até no máximo 2 horas.

As células obtidas conforme descrito acima foram coletadas por filtração em papel Whatman nº 1 e em seguida as células foram raspadas do papel (esporulação) ou juntamente com o papel (zoósporo e germinação) foram colocadas em graal de porcelana, previamente esterelizado por aquecimento a 200°C, gelado em banho de gelo seco. As células foram então maceradas na presença de nitrogênio líquido e, mantendo a maceração, foram adicionados 1,5 mL de Trizol-LS® (Gibco-BRL). A mistura congelada foi então aquecida em banho-maria 65°C até derreter. Foram a seguir adicionados 500 µL de água milliQ DEPC (tratamento com DEPC 0,1%, por 16 horas a temperatura ambiente). A mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos e deixada a temperatura ambiente por 5 minutos. Foram então adicionados 300 µL de clorofórmio e as amostras foram novamente agitadas vigorosamente por 15 segundos e deixadas a temperatura ambiente por mais 3 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a centrifugação por 15 minutos, a 12.000 x g e a 4°C. A fase aquosa foi recuperada (aproximadamente 1000 µL) e precipitada com 750 µL de isopropanol por 10 min a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 min, a 12.000 x g e a 4°C. O precipitado foi lavado com 1,5 mL de etanol 75% em água milliQ tratada com DEPC e centrifugado por 5 min, a 12.000 x g e a 4°C. O precipitado foi seco sob vácuo e o RNA foi ressuspensão em 100 µL de água milliQ tratada com DEPC. Para total ressuspensão do RNA as amostras foram aquecidas

por 10 min a 65°C. Após a ressuspensão, os RNAs foram quantificados por espectrofotometria a 260 nm.

9. Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e "Northern blot"

Aproximadamente 8 µg de RNA total, extraído de células de *B. emersonii* nas diferentes fases do seu ciclo de vida, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão MOPS 1 x (MOPS 20 mM, pH 7,0 contendo acetato de sódio 5 mM; EDTA 1 mM) contendo formaldeído 2,8%. As amostras de RNA misturadas ao tampão de amostra para RNAs (MOPS 20 mM, pH 7,0; contendo acetato de sódio 5 mM EDTA 1 mM; formamida 50%; azul de bromofenol 0,25%; brometo de etídeo 0,1 µg/mL) foram aquecidas por 10 minutos a 65°C e aplicadas no gel. Após aproximadamente 3 horas de corrida eletroforética a 80 volts, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

Para a transferência do RNA para membrana de náilon, primeiramente o gel foi tratado com uma solução 0,05 N de NaOH durante 30 minutos sob agitação lenta e depois tratado com uma solução 0,1 M de Tris-HCl pH 7,5 e 0,15 M de NaCl, nas mesmas condições. O RNA do gel foi transferido por pressão para uma membrana de náilon (Hybond N+, Amersham) com SSC 10 x, utilizando o sistema de transferência da Posiblot (Stratagene), durante 2 horas sob 75 mmHg de pressão. As membranas foram secas por 10 minutos a 80°C e os RNAs transferidos para a membrana foram fixados por exposição a luz ultravioleta.

Após a fixação dos RNAs, as membranas foram incubadas em solução de pré-hibridização (Na₂HPO₄ 0,12 M, pH 7,2; NaCl; EDTA 1 mM; formamida 40%; SDS 7%) por no mínimo 1 hora a 42°C com agitação em forno de hibridização (Hybaid). Ao final desse período a sonda radioativa, previamente desnaturada durante 5 minutos a 94°C, foi adicionada a essa solução e incubada durante uma noite a 42°C com agitação.

Após esse período a solução de hibridização contendo a sonda foi retirada e as membranas foram lavadas a 42°C, sob agitação, em três etapas:

- SSC 2 x; SDS 0,1 % por 30 minutos
- SSC 0,5 x; SDS 0,1 % por 30 minutos
- SSC 0,1 x; SDS 0,1 % por 30 minutos

Após as lavagens, a membrana foi exposta a filmes de raios-X (Hyperfilm MP, Amersham) em cassete com tela intensificadora, por no mínimo 48 horas, a -70°C.

10. Preparo de células competentes para transformação

10.1. Método do CaCl₂

Células de *E. coli* (TG-1) foram preparadas de acordo com o método de transformação por CaCl₂ descrito por Mandel & Higa (1970) ou Nishimura *et al.* (1990).

10.2. Método para eletroporação

Uma colônia isolada de *E. coli* (DH5α) foi inoculada em 5 mL de meio SOB e incubada a 37°C, com agitação de 200 rpm durante a noite. Na manhã seguinte os 5 mL da cultura foram inoculados em 500 mL de meio SOB e incubou-se sob agitação de 200 rpm a 37°C, até a cultura atingir D.O._{600nm} entre 0,45 e 0,6. As células foram então centrifugadas em rotor GSA - Sorvall, 7.000 rpm, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 mL de água milliQ estéril gelada. As células foram novamente centrifugadas e lavadas com 100 mL de glicerol 10% estéril gelado e transferidas para tubos Falcon. Novamente as células foram centrifugadas a 3.000 x g, por 10 minutos, a 4°C e depois ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%. Aliquotas de 30 µL foram guardadas congeladas a -70°C e descongeladas apenas imediatamente antes do uso.

11. Transformação de *E. coli*

11.1. Choque térmico

As transformações com plasmídeos como pUC foram feitas adicionando-se 10 µL da reação de ligação a 200 µL de células TG-1 competentes preparadas de acordo com os métodos descritos no item 10.1. A mistura foi incubada a 42 °C por 1 minuto e as células foram então recuperadas por 1 hora em LB líquido, a 37°C com agitação e plaqueadas em LB ágar contendo o antibiótico apropriado juntamente com IPTG (30 µL de uma solução 100 mM) e X-Gal (30 µL de uma solução 2% em dimetilformamida). As placas de Petri foram incubadas a 37°C durante a noite. As colônias que apresentavam cor branca (incapazes de degradar X-gal) foram coletadas, os plasmídeos isolados e analisados por digestão com enzimas de restrição, para verificarmos a presença do inserto de interesse.

Para transformação utilizando vetores virais (M13mp18 e M13mp19), os procedimentos iniciais foram idênticos aos descritos para vetores plasmidiais, exceto que após o choque térmico a 42°C as células foram misturadas com o IPTG e o X-gal, além de 100µl de células TG-1 crescidas durante a noite e 3 mL de LB soft derretido. Esta mistura foi vertida sobre uma placa de LB ágar seguindo-se incubação durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes do M13 aparecem como placas brancas no meio de um tapete de células formado no LB soft, representando um halo de lise, indicando a presença de fagos contendo o inserto.

11.2. Eletroporação

As células preparadas para eletroporação descritas no item 10.2 foram descongeladas em gelo e a elas foram acrescentados 1 a 2 µL de ligação. A mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação de 0,1 cm de largura e em seguida submetida a eletroporação em aparelho Gene pulser™ da Bio-Rad , nas seguintes condições: 1,85kV, 25 µF e 200 ohms. Após a eletroporação as células foram então recuperadas e plaqueadas como descrito no item anterior.

12. Reação de seqüenciamento de DNA

Para as reações de seqüenciamento de DNA, pelo método de Sanger (Sanger *et al.*, 1977) foram utilizados os kits Sequenase versão 2 (Amersham-Pharmacia), Thermo Sequenase (Amersham-Pharmacia), Big-Dye Terminator (PE Biosystems) ou DYEnamic ET-Terminator (Amersham-Pharmacia) de acordo com as especificações dos fabricantes.

Para o seqüenciamento automático, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel long-ranger (FMC) em sistema automático ABI377 (PE Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados usando-se o programa Sequence Analysis e Sequencher (Macintosh-Apple).

13. Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose com papel DE81

Para isolar fragmentos de interesse para clonagem, sonda e etc., cerca de 5-10 µg de plasmídeo contendo o fragmento foram digeridos em um volume total de 50 µL, conforme descrito anteriormente. O DNA digerido é submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1 x. Após a corrida eletroforética, o gel é corado em uma solução contendo brometo de etídeo e a banda correspondente ao fragmento de interesse foi visualizada sob luz ultravioleta. Duas incisões são feitas no gel usando um bisturi, imediatamente acima e abaixo da banda de interesse. Nessas incisões são colocados dois pedaços de papel de filtro carregado positivamente, Whatman DE81 (Millipore), com o auxílio de pinças. O gel é submetido a mais alguns minutos de eletroforese e então é possível notar que a banda de interesse fica retida no papel posicionado logo abaixo dela. O papel é então retirado do gel e colocado em um tubo de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão TE/NaCl (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 1N) e 10 µg de tRNAs de levedura. Agita-se vigorosamente o tubo por 10 segundos e incuba-se a temperatura ambiente por no mínimo 60 minutos. Após a incubação o tubo é centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Recupera-se o sobrenadante e procede-se a uma purificação com fenol, fenol/clorofórmio e clorofórmio. Após a

purificação, são adicionados 2 vezes o volume de etanol 100% para a precipitação do DNA, seguindo-se centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos, a 4°C. Descarta-se o sobrenadante, lava-se a amostra com 500 µL de etanol 70% e repete-se a centrifugação. Descarta-se novamente o sobrenadante e o precipitado contendo o DNA é seco sob vácuo e então ressuspenso em 20 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM).

14. Obtenção de sonda radioativa

A marcação de sondas radioativas foi feita pela técnica de síntese de DNA utilizando como iniciador oligonucleotídeos de seqüências aleatórias (*random primed synthesis*) (Feinberg & Volgestein, 1984). Para isso foi utilizado o kit Redi-prime II (Amershan Pharmacia) conforme as especificações do fabricante. A reação foi incubada por no mínimo 1 hora a 37°C e para retirar os nucleotídeos radioativos não incorporados a sonda foi purificada em uma coluna com 0,9 mL de Sephadex G-50 (Pharmacia) equilibrada com STE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 100 mM) ou utilizando-se o kit "QIAquick nucleotide removal" (Qiagen).

15. Varredura da biblioteca de expressão em λ gt11 com anticorpos anti-Hsp90

Foi construída em nosso laboratório uma biblioteca de expressão no vetor de expressão λ gt11 a partir de mRNAs poli A+ extraídos de células de *B. emersonii* submetidas a choque térmico de 38°C, no período de 30 a 60 minutos de esporulação. Os cDNAs sintetizados foram clonados num sítio único de *EcoRI* nos braços dos fagos λ gt11 e o banco foi preparado em *E. coli* cepa Y1090.

O isolamento dos clones positivos foi conseguido após sucessivas etapas de plaqueamento dos fagos, seguindo-se a transferência das placas de lise para filtros de nitrocelulose que foram então incubados com anticorpo monoclonal anti-Hsp90 (Sigma), o qual reconhece uma única banda de peso molecular de aproximadamente 85 kDa em extratos celulares de *Blastocladiella emersonii*, seguido de incubação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e

revelados com NBT/BCIP. Os fagos recombinantes presentes nas placas de lise que se revelaram positivos foram recuperados e após sucessivos plaqueamentos clones positivos foram isolados. O DNA destes fagos recombinantes foi então extraído e purificado utilizando-se o kit Qiagen Lambda Maxi.

Após a extração de DNA dos fagos, foi feita digestão com a enzima de restrição *EcoRI* (sítio flanqueador do inserto) para verificar o tamanho dos insertos. Os produtos destas digestões foram resolvidos em gel de agarose 1%.

16. Clonagem do cDNA da Hsp90

Após a digestão do DNA do fago λ gt11 com a enzima de restrição *EcoRI*, o inserto de 1,7 kb foi separado por eletroforese em gel de agarose e purificado utilizando-se de uma coluna de afinidade (Qiagen qiaquick gel extraction). Foi feita a ligação deste cDNA no vetor pBluescript SK previamente digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina. Uma parte da reação de ligação foi usada para transformar células *E.coli* da cepa TG-1 pelo método de CaCl_2 que foram plaqueadas em meio LBA (meio LB ágar contendo 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina) e crescidas durante a noite em estufa a 37°C.

Foram selecionadas oito colônias brancas (seleção com X-Gal e IPTG) e foi feita minipreparação de DNA plasmidial de cada colônia. O DNA plasmidial isolado foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para verificação dos insertos. Os produtos das digestões foram resolvidos em gel de agarose 1% e quatro clones continham o inserto. O DNA de 1,7 kb clonado no pBluescript SK foi usado como molde para a reação de seqüenciamento (descrita no item 12) com os primers universais (forward -20 e reverse) marcados com $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ (Amersham) através da reação de fosforilação utilizando a enzima T4 polinucleotídeo quinase (Biolabs).

Após a reação de seqüenciamento e a leitura das bases a partir das extremidades do inserto, as seqüências foram submetidas à análise comparativa usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997) que mostrou alto grau de homologia com diferentes Hsp90 de vários organismos.

O plasmídeo pBluescript SK contendo o inserto de cDNA de 1,7 kb foi duplamente digerido com as enzimas de restrição *HindIII* e *PstI* (que não continham sítios de reconhecimento dentro do cDNA) e clonados em M13mp18 e M13mp19 para a preparação de DNA fita simples. Estas moléculas de DNA fita simples foram usadas como molde para a reação de seqüenciamento utilizando-se o kit Sequenase (Amersham) com o primer universal forward -20. A seqüência de DNA do inserto de 1,7 kb do cDNA da Hsp90 foi completada com o uso de dois oligonucleotídeos sintéticos internos (cDNA-1 e genômico-1).

17. Varredura da biblioteca genômica em λ DASH

Com o objetivo de isolar um clone genômico do gene hsp90, foi realizada a varredura de um banco genômico construído no vetor λ DASH (Stratagene). Esse banco foi anteriormente obtido em nosso laboratório a partir de DNA genômico extraído de zoósporos de *B. emersonii*, submetido à digestão parcial com a enzima de restrição *Sau3A* para a obtenção de fragmentos entre 9 a 15 kb que foram clonados no sítio *BamHI* do vetor.

O banco genômico foi preparado na cepa de *E. coli* XL1Blue MRA (P2) e para sua análise foi utilizado como sonda o fragmento de 1,7 kb do cDNA isolado da biblioteca de expressão em fago λ gt11 que foi marcado radioativamente com α -³²P-dCTP através do método de "random primer" (Feinberg & Vogelstein, 1983) utilizando-se o kit Redi Prime (Amersham).

O fragmento correspondente ao cDNA da Hsp90 marcado radioativamente foi utilizado para análise de "Southern blot" dos filtros de náilon contendo DNA dos fagos obtidos de placas de lise que apresentaram sinal positivo. A hibridização e as lavagens foram feitas em condições de alta estringência, como descrito no item 7.

O isolamento de fagos recombinantes positivos foi conseguido após sucessivas etapas de plaqueamento. O DNA dos quatro fagos recombinantes positivos foi digerido tanto com a enzima de restrição *EcoRI* (sítio flanqueador do sítio *BamHI* do vetor que é compatível com *Sau3A*), como *NotI*, que reconhece a seqüência de 8 bases 5'GCGGCCGC3', com o intuito de fragmentar o inserto

contido no fago λ , já que o DNA de *B. emersonii* tem alto conteúdo G/C. Os produtos das digestões foram resolvidos em gel de agarose 0,8%, posteriormente transferidos para uma membrana de náilon através do sistema de pressão Posiblot (Stratagene) e a membrana foi tratada como descrito no item 7. Após hibridização da membrana em condições de alta estringência, tendo como sonda o cDNA da Hsp90 marcado radioativamente, obteve-se sinal na banda de 4,5 kb originada da digestão com a enzima de restrição *NotI*.

O fragmento de DNA de 4,5 kb do fago λ 1-23 foi então purificado de um gel de agarose e ligado ao vetor pUCBM20 previamente digerido com a enzima de restrição *NotI* e desfosforilado com a enzima fosfatase alcalina. Parte dessa ligação foi usada para transformar células *E.coli* da cepa TG-1 competentes pelo método de CaCl_2 . Após a transformação as células foram plaqueadas em meio LBA contendo X-Gal e IPTG e as placas foram incubadas durante a noite em estufa a 37°C.

Foram selecionadas seis colônias brancas e foi feita minipreparação de DNA plasmidial destes seis clones. O DNA plasmidial isolado foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* para verificação dos insertos.

O DNA de um dos clones gerados (pUCBM20 contendo o inserto de 4,5 kb *NotI/NotI*) foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII* e o produto da digestão resolvido em gel de agarose apresentou 2 fragmentos que posteriormente foram subclonados em pUCBM21: *BamHI/BamHI* de aproximadamente 2,2 kb e *BamHI/HindIII* de aproximadamente 2,3 kb. Após a clonagem, o plasmídeo pUCBM21 contendo o inserto *BamHI/BamHI* de 2,2 kb foi digerido com as enzimas de restrição *KpnI/EcoRI* enquanto o plasmídeo pUCBM21 contendo o inserto *BamHI/HindIII* de 2,2 kb foi digerido com as enzimas de restrição *BamHI/HindIII*. Os fragmentos gerados dessas digestões foram clonados em M13mp18 e M13mp19 digeridos previamente com as enzimas de restrição *KpnI/EcoRI* e *BamHI/HindIII* respectivamente, para a preparação de DNA fita simples.

Os clones de M13 foram usados como molde para a reação de seqüenciamento utilizando-se o primer universal forward -20.

18. Construção e varredura de um banco genômico parcial

Aproximadamente 10 µg de DNA genômico foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI, *Not*I e *Bam*HI/*Not*I. Os produtos das digestões foram resolvidos em gel de agarose 1% que após tratamento foram transferidos para uma membrana de náilon, seguindo-se de hibridização usando o cDNA da *Hsp*90 como sonda. O autorradiograma obtido revelou sinais de hibridização em torno de 4,0 kb na canaleta que tinha o DNA digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI/*Not*I.

Aproximadamente 20 µg de DNA genômico de *B. emersonii* foram novamente digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Not*I e resolvidos em gel de agarose 1%. A região do gel que continha fragmentos em torno de 3,5 a 4,5 kb foi excisada e o DNA contido nesta região foi purificado por eletroeluição. A partir dos fragmentos de DNA recuperados foi feita ligação no vetor pUCBM21 digerido previamente com as enzimas de restrição *Bam*HI/*Not*I e células de *E.coli* da cepa DH5α competentes foram eletroporadas com parte desta ligação, em eletroporador Gene Pulser - BioRad. Após plaqueamento em meio LBA contendo X-Gal e IPTG obtivemos muitas colônias brancas que foram novamente crescidas sobre membranas de náilon sobrepostas a placas de meio LBA, com réplicas em placas de LBA. Essas membranas foram analisadas por "colony blot" utilizando-se como sonda o fragmento de 1,7 kb correspondente ao cDNA.

Os clones que se revelaram positivos foram crescidos e foi feita midipreparação de DNA plasmidial.

19. Reação de extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa

Para determinação dos inícios de transcrição dos genes foram realizados experimentos de extensão de oligonucleotídeo. Foram usados os oligonucleotídeos PrExt90 e PrExt60, descritos no item 4.1, para a determinação dos inícios de transcrição dos genes *hsp*90 e *hsp*60, respectivamente.

Aproximadamente 150 pmoles de cada oligonucleotídeo foram marcados radioativamente na extremidade 5' com 30 µCi de [γ^{32} P] ATP, 10U da enzima T4

polinucleotídeo kinase (Biolabs) em tampão apropriado para a reação por 1 hora, a 37°C.

Os oligonucleotídeos foram precipitados com 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,4 e 2 volumes de etanol 100% por 30 minutos no gelo seco seguindo-se de centrifugação a 12.000 x g por 30 minutos, a 4°C. O precipitado foi lavado com EtOH 70%, novamente centrifugado e então seco a vácuo e ressuspenso em 50µL de água DEPC. A contagem da radioatividade foi feita em cintilador, com 1 µL da amostra.

Cerca de $3,5 \times 10^6$ cpm do oligonucleotídeo foram adicionados a 30 µg de RNA total, sendo a mistura precipitada com 0,1 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,4 e 2 volumes de etanol 100%. A mistura foi incubada por 30 minutos no gelo seco, centrifugada 12.000 x g por 20 minutos, a 4°C e seca sob vácuo. O precipitado obtido foi solubilizado em 25 µL de tampão de hibridização 5 x concentrado (tampão PIPES, 40 mM, pH 6,4; EDTA 1 mM, pH 8,0; NaCl 0,4 M) e 100 µL de formamida deionizada. A mistura foi fervida por 10 minutos e esfriada lentamente até 42°C durante a noite, para promover a formação do híbrido. Após a incubação, a amostra teve seu volume aumentado com 40 µL de água DEPC, novamente precipitada com um volume de etanol 100%, lavada com etanol 70% e seca sob vácuo. Ao precipitado foram adicionados 25 µL de água DEPC para ressuspensão e 25 µL da mistura de reação da transcrição reversa contendo: 10µL de tampão de reação 5 x (USB ou Gibco); 2,5 µL de uma solução 20 mM de dGTP, dATP, dTTP e dCTP; 40 U de RNAsin (Promega); 200 U de MMLV-RT (USB) ou de Superscript II - RT (Gibco); água miliQ DEPC q.s.p. 25 µL. A reação de extensão foi incubada a 37°C por 90 minutos e interrompida pela adição de 2 mM de EDTA e 10 µg de RNase A, incubando-se a mistura a 37°C por mais 30 minutos.

A reação de extensão teve seu volume aumentado pela adição de 150 µL de STE (Tris HCl 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM, pH 8,0; NaCl, 0,1 M) e o cDNA foi purificado por uma extração com igual volume da mistura fenol:clorofórmio e precipitado com acetato de sódio/etanol, seco a vácuo, solubilizado em 2 µL de água DEPC e acrescido de 4 µL de tampão de amostra desnaturante (formamida 95%; EDTA 20 mM; xilenocianol 0,05%; azul de bromofenol 0,05%). As amostras foram

fervidas por 3 minutos e aplicadas em gel de seqüenciamento (7,5% de acrilamida/bis-acrilamida na proporção 19:1 e 7,5 M de uréia), juntamente com uma reação de seqüenciamento. A eletroforese foi feita a 37 Watts por aproximadamente 2 horas. O gel foi seco a 80°C sob vácuo e exposto a um filme de raios-X (Hyperfilm MP, Amersham-Pharmacia) com tela intensificadora, por 48 horas a -70°C.

20. RACE-PCR

A análise do processamento do íntron e a determinação do início de transcrição do gene *hsp90* foram feitos pelo método RACE (Rapid Amplification of cDNAs Ends) utilizando o kit SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech), com o oligonucleotídeo RACE 5' descrito no item 4.3.

A partir de 1 µg de RNA total extraído de células de 0 hora de esporulação submetidas a 90 minutos de choque térmico a 38°C, foi feita a síntese do cDNA utilizando tampão para síntese de primeira fita, DTT, dNTP mix, M-MLV-RT e oligonucleotídeos adaptadores para a reação RACE 5' (RACE 5' e smart oligo II), de acordo com o manual do fabricante.

Após a síntese do cDNA, o ciclo de amplificação foi feito utilizando o kit Advantage II PCR Enzyme System que contém Advan Taq polimerase (Clontech) e o oligonucleotídeo específico para o cDNA da Hsp90 (RACE 5') para a amplificação da extremidade 5' seguindo a sugestão do fabricante para o seguinte "touchdown PCR":

94°C	5 seg	}	5 X
72°C	3 min		
94°C	5 seg	}	5 X
70°C	10 seg		
72°C	3 min	}	25 X
94°C	5 seg		
68°C	10 seg	}	
72°C	3 min		

Para verificar se houve amplificação, foi feita eletroforese em gel de agarose 1% com 5 µl do produto de PCR e o gel foi posteriormente corado com brometo de etídeo. As bandas amplificadas foram visualizadas sob luz ultravioleta e isoladas do gel de agarose utilizando o kit de purificação Nucleotrap Gel Extraction (Clontech).

A clonagem dos produtos isolados foi feita no plasmídeo pGEM T-easy (Promega), um vetor que após aberto em um sítio único de *EcoRV*, recebe uma Timina nas extremidades 3', onde serão clonados produtos de PCR que possuem na sua extremidade 5' uma Adenina não pareada adicionada pela DNA polimerase (p.ex. Taq polimerase, entre outras). Após a reação de ligação, uma parte dela foi utilizada para transformar *E.coli* DH5α por eletroporação. Foram obtidas várias colônias contendo plasmídeos recombinantes que foram isolados e seqüenciados.

21. Preparação de extrato de proteínas

Foram inoculados 2×10^8 zoósporos em 1 litro de meio DM-4 e a cultura foi incubada a 17°C com agitação de 150 rpm durante 14 horas. Após esse período, as células estão bem desenvolvidas e não há presença de zoósporos. As células foram então lavadas com 1,4 litros de solução de esporulação, ressuspensas em 600 mL da mesma solução e incubadas a 27°C com agitação de 150 rpm por aproximadamente 3 horas. Alíquotas de 45 mL de cultura foram coletadas durante a esporulação e adicionadas a 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 100% em tubos Falcon de 50 mL, misturados por inversão e incubados por no mínimo 30 minutos no gelo.

Após esse período, foram centrifugados a $1.500 \times g$ por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados por inversão e os sedimentos foram ressuspensos em 1,5 mL de NaOH 0,3 N até total ressuspensão. A seguir foram acrescentados 3,5 mL de água. Durante todo o processo os tubos foram mantidos sempre no gelo. As células foram sonicadas em 4 ciclos de 20 segundos cada, com intervalos de 40 segundos em Sonicador Branson na potência 4 (20%). As células foram checadas ao microscópio para verificar se haviam sido rompidas. Para os zoósporos somente 2 pulsos de sonicação foram feitos, pois estas células não possuem parede celular.

Após a sonicação, adicionou-se 10% do volume de TCA 100% (0,5 mL) e 1 vez o volume de TCA 10% (5,0 mL). Esta mistura foi incubada no gelo durante 30 minutos. A seguir os tubos foram centrifugados a 1.500 x g durante 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram lavados com 2 volumes de etanol 100% gelado (11 mL), novamente centrifugados, descartados os sobrenadantes e esta lavagem com etanol foi repetida por mais uma vez. Após o sobrenadante ter sido descartado, os pellets foram lavados, com a mesma quantidade (11mL) de uma mistura clorofórmio/metanol (1:1) gelado. A seguir os tubos foram centrifugados a 1.500 x g durante 5 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os precipitados foram secos sob vácuo e ressuspensos em aproximadamente 1 mL de tampão de amostra para eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 2 x concentrado (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2,3%; glicerol 10%; DTT 1mM; azul de bromofenol 0,01%).

22. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e "western-blot"

A eletroforese de proteínas foi realizada conforme o método descrito por Laemmli (1970). O gel de separação contém uma solução de poliacrilamida a 10% e o gel de empilhamento de 4,5%. As amostras de proteínas dissolvidas em tampão de amostra 2 x concentrado foram aquecidas a 100°C durante 5 minutos e depois centrifugadas por 2 minutos a 12.000 x g em temperatura ambiente. Após a centrifugação foi adicionado DTT 1M para uma concentração final de 100 mM. A eletroforese foi feita em tampão Tris-Glicina/SDS (Tris-base 0,3%; SDS 0,1%; Glicina 1,44%) e a corrida foi feita a 200 volts durante aproximadamente 45 minutos. Após a eletroforese, o gel foi fixado em uma solução de coloração de azul de Coomassie (Coomassie brilhante blue R-250 0,2% em etanol 50% e ácido acético 10%) durante 10 minutos a 80°C. As bandas de proteínas foram visualizadas somente após a adição da solução de descoloração (etanol 30%; ácido acético 7%) sob agitação e efetuando várias trocas.

Para o "western blot" as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose utilizando-se um sistema tipo sanduíche, conforme descrito por Towbin

e colaboradores (1979). Após eletroforese o gel foi colocado em tampão para transferência semi-seca (Tris-base 25 mM; glicina 126 mM; etanol 20%). A transferência para membrana de nitrocelulose foi feita durante 40 minutos a 0,8 mA/cm², utilizando-se o sistema Multiphor II - Novablot (Amersham-Pharmacia).

A membrana foi corada com corante Ponceau S (Ponceau S 0,1% em ácido acético 10%) e descorada com água destilada para visualização das bandas protéicas que foram transferidas. A membrana foi bloqueada com TBS-leite (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; leite desnatado 5%), durante 30 minutos sob agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com 8 mL de TBS-leite e 20 µL de anticorpo anti-Hsp90 (1:400) durante 16 horas a 4°C, sob agitação suave. A membrana foi então lavada com TBS-Tween (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM; Tween-20 0,05%) quatro vezes por 5 minutos e com TBS (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 150 mM) por 10 minutos a temperatura ambiente, com agitação suave. Após as lavagens, a membrana foi incubada com 5 mL de TBS-Leite contendo quantidade apropriada de anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase ou fosfatase alcalina, durante uma hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada 4 vezes com TBS-Tween por 5 minutos cada lavagem e com TBS por 10 minutos, sob agitação suave a temperatura ambiente.

A revelação para o conjugado com peroxidase foi feita por quimioluminescência, utilizando o kit ECL (Amersham-Pharmacia). A membrana foi então exposta a filme de raios-X (Hyperfilm-ECL, Amersham-Pharmacia). Para a revelação do conjugado com a fosfatase alcalina, utilizou-se BCIP (0,3 mg/mL) e NBT (0,15 mg/mL) em tampão para fosfatase alcalina (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; NaCl 100 mM; e MgCl₂ 5 mM).

23. Expressão da proteína recombinante fHsp90-His para obtenção de anticorpos

Para a obtenção de anti-soro policlonal contra a proteína Hsp90 de *B. emersonii*, parte da proteína Hsp90 foi expressa em *E. coli* (DH5α) usando o vetor de expressão pPROEX-HTa (Gibco-BRL). Este vetor, após a indução com IPTG,

expressa em altas quantidades proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de 6 histidinas na região amino terminal.

O vetor pBluescript SK contendo o cDNA da Hsp90 de 1,7 kb foi digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *StuI*, e o fragmento de 706 pb equivalente a uma região central da proteína foi clonado em pPROEX HT-a, digerido com as mesmas enzimas, de maneira que a orientação e a fase de leitura fossem respeitadas. Assim, em condições de indução, a proteína expressa apresentaria cerca de 34 kDa (da Met iniciadora até o sítio de *EcoRI* - 30 aas, o inserto de 706 pb - 235 aas, do sítio de *StuI* até o stop códon - 40 aas, totalizando 305 aas). Após a clonagem, foram feitas várias minipreparações de DNA plasmidial e os fragmentos clonados foram confirmados pelo tamanho através de eletroforese em gel de agarose. Dois clones continham o inserto correto de 706 pb (clones A2 e A10).

Para experimentos de indução-piloto, aproximadamente 100 ng de DNA plasmidial dos clones A2 e A10 foram usados para eletroporar *E.coli* DH5 α . Das muitas colônias obtidas em placas de LBA, três de cada clone foram crescidas a 37°C e as culturas A2-1 e A10-1, que cresceram melhor que as demais, foram escolhidas para os testes de indução-piloto, sendo crescidas em meio líquido até atingirem DO_{600nm}=0,6. Nesta fase, foi adicionado IPTG numa concentração final de 0,6 mM e alíquotas de 1 mL das culturas foram colhidas nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após a adição de IPTG. Estas alíquotas foram centrifugadas e os sedimentos contendo as bactérias foram ressuspensos em tampão de amostra para SDS-PAGE (2 x concentrado) em quantidades proporcionais à DO_{600nm} da cultura e aplicadas em gel de SDS-PAGE 12%. Após a eletroforese, o gel foi corado com azul de Coomassie para verificar se houve indução. Além disso, 1 mL de cada cultura foi incubado até atingirem a fase estacionária, e alíquotas destas culturas foram congeladas a -70°C em 10% DMSO, para serem usadas na indução em larga escala.

Após a indução em pequena escala, seguimos para uma indução em larga escala (2 L de cultura) na presença de 0,6 mM de IPTG por duas horas a 37°C, por ser o tempo de maior acúmulo da proteína de interesse verificado na indução piloto.

A purificação da proteína de fusão fHsp90-His (fragmento da Hsp90 de *B. emersonii* fusionada a uma cauda de histidinas) foi baseada em Chataway & Barrit

(1995), com algumas modificações. A partir de um pré-inóculo de 20 mL do clone A2-1 em fase estacionária inocula-se 2 litros de meio LBA que foram incubados a 37°C sob agitação, até atingir $DO_{600nm}=0,6$. Neste ponto adicionou-se IPTG para a concentração final de 0,6 mM e após 2 horas de indução a 37°C, as bactérias foram coletadas por centrifugação. As células foram então ressuspensas em tampão de lise (Tris HCl 50 mM, pH 7,5; imidazol 20 mM; PMSF 1 mM) e rompidas por sonicação em sonicador Branson, na potência 4, em 8 pulsos de 20 segundos, com intervalo de 40 segundos. Após a sonicação, a suspensão foi centrifugada por 20 min, a 4.500 x g e separada em duas frações (sedimento e sobrenadante) que foram analisadas por SDS-PAGE.

Como a maior parte da proteína de fusão encontrava-se em corpos de inclusão, a purificação foi baseada em metodologia descrita por Marshak *et al* (1996). Os "debris" celulares foram lavados com tampão A (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; KCl 100 mM; glicerol 10%; imidazol 20 mM) contendo 2% de DOC. Incubou-se por 10 minutos a temperatura ambiente, e centrifugou-se a 4.500 x g por 10 minutos, a 4°C e o sedimento foi lavado por mais 4 vezes. Para solubilizar as proteínas, o sedimento foi incubado por mais 10 minutos a temperatura ambiente com tampão A contendo 0,3% de sarcosil. Após a incubação, centrifugou-se a 4.500 x g por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi recuperado e analisado em SDS-PAGE. Verificou-se que a proteína de fusão estava na fração solúvel e então o volume foi aumentado com um volume igual de tampão A. Para retirar todo o sarcosil, a amostra foi dialisada contra 2 litros tampão A a 4°C, efetuando-se 2 trocas. A proteína foi concentrada em Centriprep-10.000 (Amicon), até um volume aproximado de 15 mL.

Para a purificação da proteína recombinante fusionada a uma cauda de 6 histidinas, utilizou-se uma resina de Ni^{++} agarose (Ni-NTA, Qiagen). Para o preparo da resina, a mesma foi centrifugada a 4.500 x g por 2 minutos, a 4°C, equilibrada no volume original com tampão A, incubada por 5 minutos no gelo, novamente centrifugada e equilibrada com o mesmo volume de tampão A. Após a resina estar pronta para o uso, 4 mL foram adicionados a 15 mL da solução de proteína, agitando-se suavemente por 1 hora, a 4°C. A mistura foi então centrifugada a 4.500 x g por 2 minutos, a 4°C, e o sobrenadante obtido foi reservado (fração não ligada). A

resina foi lavada com 24 mL de tampão A, agitando-se suavemente por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação, o sobrenadante foi reservado (1ª lavagem). Esta etapa foi repetida mais 4 vezes sempre com 24 mL de tampão A. A eluição da proteína foi feita incubando-se a resina por 15 minutos a 4°C, com 10 mL de tampão C (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; KCl 100 mM; glicerol 10%) contendo quantidades crescentes de imidazol (50, 100, 150 e 300 mM) sob agitação suave.

Análise das frações por SDS-PAGE mostrou em quais delas a maior parte da proteína tinha sido eluída. As frações contendo a proteína foram reunidas (exceto a contendo 50 mM de imidazol) e dialisadas a 4°C contra 2 litros de tampão PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,4 mM) com 2 trocas. Em seguida à diálise, a proteína foi concentrada em Centriprep-10.000 (Amicon) até cerca de 2 mL e dosada pelo método de Bradford (Bio-Rad).

A proteína fHsp90-His assim obtida foi utilizada para imunizar duas coelhas de cerca de 3 meses de idade e 4 kg de peso. Antes da primeira imunização, cerca de 5 mL de sangue foram retirados pela veia marginal da orelha de cada um dos animais, incubados a 37°C por 30 minutos e o coágulo foi separado por centrifugação a 2.000 x g por 10 minutos. O soro pré-imune obtido foi aliquoteado e armazenado a -20°C.

A primeira injeção subcutânea foi feita com aproximadamente 0,5 mg de proteína recombinante fHsp90-His diluída em 0,5 mL de tampão PBS e 0,5 mL de adjuvante de Freund completo (Sigma), em dois pontos no dorso do animal próximos às patas traseiras. Após 3 semanas, a imunização foi repetida nas mesmas condições, exceto pelo uso de adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Após duas semanas do segundo inóculo, cerca de 5 mL de sangue foram colhidos e o soro foi separado como descrito para o pré-imune. Para verificarmos se o soro produzido reconhecia a Hsp90 de *B. emersonii*, extrato total de proteínas extraído de células do tempo zero de esporulação, submetidas a choque térmico a 38°C por 90 minutos foi aplicado em SDS-PAGE 9% e analisado por "western blot".

O soro pré-imune foi testado nas diluições de 1:100 e 1:500 e os soros imunes 1 e 2 (soros obtidos das duas coelhas) nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000 e 1:2000. Após a incubação com o anticorpo primário (policlonal anti-Hsp90) seguiu-se com a incubação com o anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina e as

membranas foram reveladas com NBT/BCIP. Visto que os soros estavam reconhecendo a proteína de interesse (a mesma banda de aproximadamente 85 kDa reconhecida pelo anticorpo monoclonal anti Hsp90 - Sigma), os animais foram sacrificados e cerca de 40 mL de sangue de cada um foram processados como descrito para o pré-imune.

24. Microscopia de imunofluorescência

Zoósporos obtidos de placas foram coletados e lavados com solução de esporulação. Após a lavagem, os zoósporos foram fixados com 1 volume de para-formaldeído 4% durante 30 minutos, a temperatura ambiente. Para tanto 0,5 grama de para-formaldeído foi ressuspense em 6,25 mL de água (concentração final de 8%) e colocado em banho a 65°C, para a dissolução. Foram adicionadas gotas de NaOH 5 M, seguindo-se de agitação até completa dissolução do para-formaldeído. O p-formaldeído 8% foi diluído em PBS para 4% e então usado para a fixação das células, numa concentração final de 2%. Após a fixação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e centrifugadas a 2 minutos 12.000 x g. Após as lavagens as células foram ressuspensas em PBS, colocadas sobre os poços da lâmina de vidro e secas a 37°C. A lâmina foi lavada uma vez com PBS e uma vez com água bi-distilada e deixada a temperatura ambiente até secar totalmente. Após as células estarem sobre a lâmina, procedeu-se incubação com o soro policlonal anti-Hsp90 numa diluição 1/20 em PBS, a temperatura ambiente por 30 minutos.

Após a incubação, a lâmina foi lavada 4 vezes por 5 minutos com PBS e incubada durante 1 hora com anticorpo anti-IgG de coelho, conjugado com fluoresceína numa diluição de 1:50 em PBS. Após a segunda incubação a lâmina novamente foi lavada com PBS por 5 minutos 4 vezes e seca a temperatura ambiente. Por fim, foram colocadas sobre os poços da lâmina algumas gotas de solução de montagem (PBS/glicerol 1:1, pH 8,0) e em seguida a lâmina foi coberta com lamínula que foi pressionada levemente sobre a solução de montagem para a retirada do excesso de líquido e de bolhas. As fotomicrografias foram feitas em um microscópio óptico Nikon Microphot-FX.

25. PCR com oligonucleotídeos degenerados

Para tentar amplificar uma parte da região codificadora do gene *hsp60* de *Blastocladiella emersonii*, vários pares de oligonucleotídeos foram desenhados em regiões conservadas entre diversas proteínas Hsp60, e que tivessem, preferencialmente diferenças entre procariotos e eucariotos. Para as reações apresentadas na figura 21 dos resultados, utilizamos as seguintes condições de reação: 100 ng de DNA genômico, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo, dNTPs 0,25 mM, MgCl₂ 1,5 mM, tampão de reação 1 x concentrado (Gibco-BRL), 1,5 U de Taq DNA polimerase (Pharmacia). O ciclo de amplificação foi o seguinte:

95°C	5 min	
95°C	30 seg	} 40 X
58°C	30 seg	
72°C	1 min	
72°C	7 min	

26. Análise computacional

Para análise comparativa de seqüências nucleotídicas foi utilizado o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1997).

Para análise da região promotora em busca de seqüências consenso para promotores de células eucarióticas utilizado o programa TESS (Transcription Element Search Software) da Universidade de Pennsylvania, no site: <http://www.cbil.upenn.edu/tess>.

Para análise comparativa entre duas seqüências de aminoácidos (porcentagens de identidade e similaridade) foi utilizado o programa Gap, do pacote GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA).

Para o alinhamentos entre a seqüência de aminoácidos das proteínas Hsp90, Hsp60 e Hsp10 de *B. emersonii* com as suas proteínas homólogas de diferentes organismos foi utilizado o programa Pile up, com seus parâmetros padrão, do pacote

GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA). Este programa alinha diferentes seqüências de proteínas e as agrupa de acordo com as similaridades além de construir um dendrograma.

Também foi utilizado o programa MEGA2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, versão 2.1) que utiliza diferentes métodos geométricos de construção de árvores filogenéticas. Neste programa foram escolhidos os algoritmos de UPGMA (unweighted pair group with arithmetic means) e "Neighbor-Joining", ambos com correção γ e utilizando o teste de "Bootstrap" com 5.000 repetições.

RESULTADOS

1. HSP90

1.1. Isolamento do cDNA do gene *hsp90*

Com a finalidade de clonar e caracterizar o gene da Hsp90 de *B. emersonii*, foi feita a varredura do banco de cDNA de choque térmico construído no vetor λ gt11. Os fagos recombinantes presentes nas placas de lise que se revelaram positivas tiveram seus DNAs isolados (clones λ A31 e λ D22), como descrito em materiais e métodos.

O clone λ A31 apresentou um inserto de tamanho maior, com 1,7 kb, que foi isolado de gel de agarose, purificado, clonado em pBluescript SK e seqüenciado. A leitura das bases a partir das extremidades do inserto mostrou alto grau de homologia com diferentes Hsp90 de vários organismos.

A seqüência de DNA do inserto de 1,7 kb do cDNA da Hsp90 foi completada; contém 1.658 pb mas não contém cauda de poli A, como apresentado na figura 5.

1.2. Análise de banco genômico para isolamento do gene *hsp90*

Com o objetivo de isolar um clone genômico do gene *hsp90*, foi realizada a varredura de um banco genômico construído no vetor λ DASH utilizando como sonda o fragmento de 1,7 kb do cDNA isolado da biblioteca de expressão em fago λ gt11.

Foram isolados quatro fagos recombinantes positivos (λ 1-23, λ 2-11, λ 3-33, λ 4-51) e observou-se que os quatro fagos recombinantes continham o mesmo inserto de aproximadamente 15 kb e também apresentaram o mesmo padrão de digestão com a enzima *NotI* em gel de agarose (Figura 2-A). Após a eletroforese o DNA foi transferido para membrana de náilon e foi feito "Southern blot" em condições de alta estringência como descrito em materiais e métodos. Foi observado um sinal na banda de aproximadamente 4,5 kb originada da digestão com a enzima de restrição *NotI* dos quatro fagos (Figura 2-B).

O fragmento de DNA de 4,5 kb do fago λ 1-23 foi então purificado, clonado em pUCBM20 e usado para transformar células *E.coli* da cepa TG-1. Foram selecionadas seis colônias brancas que continham o inserto de interesse. O DNA de um dos clones gerados (pUCBM20 contendo o inserto de 4,5 kb *NotI/NotI*) foi subclonado em pUCBM21 e posteriormente em M13 para obtenção de DNA fita simples.

Após as reações de seqüenciamento, notou-se que o clone de 4,5 kb *NotI/NotI* não continha o gene da Hsp90 completo, pois este tinha sido digerido pela enzima *Sau3A* no meio da região codificadora (próximo à região correspondente ao aminoácido 300). Então era parte de uma das extremidades do clone genômico de 15 kb isolado do banco em λ DASH apresentando o sítio de *Bam*HI do vetor incompleto pois foi usado para a clonagem de fragmentos *Sau3A* (Figura 3).

1.3. Construção e análise de um banco genômico parcial

Como estratégia para conseguir um clone genômico que contivesse todo o gene *hsp90* incluindo sua região promotora, foi feito um banco parcial com as enzimas de restrição *Bam*HI/*NotI*, pois *Bam*HI digeriu o clone de 4,5 kb, isolado do λ DASH, no meio e se localizava na região 3' não codificadora do gene *hsp90* de *B. emersonii* e *NotI* digere com uma certa freqüência o DNA do fungo que contém alto conteúdo G+C. Foi feito "Southern blot" de DNA genômico digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI, *NotI* e *Bam*HI/*NotI* usando o cDNA da Hsp90 como sonda. O autorradiograma obtido revelou sinais de hibridização em torno de 4,0 kb na canaleta que tinha o DNA digerido pelas enzimas de restrição *Bam*HI/*NotI*.

Uma grande quantidade de DNA digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI/*NotI* de tamanhos em torno de 3,5 a 4,5 kb foi purificada do gel e clonada em pUCBM21. Após a análise de aproximadamente 700 colônias brancas obtivemos 2 clones positivos. Após midipreparação de DNA desses clones e análise com enzimas de restrição, eles mostraram ser idênticos e continham um inserto de aproximadamente 4,0 kb (Figura 4). Primeiramente, as extremidades do inserto foram seqüenciadas e a leitura da seqüência mostrou que ambos eram realmente

idênticos e suas extremidades correspondiam às regiões 5' e 3' não codificadoras do gene *hsp90* de *B. emersonii*.

O seqüenciamento completo do gene foi feito subclonando-se fragmentos de restrição do clone de 4,0 kb e também se utilizando oligonucleotídeos sintéticos (Figura 5).

1.4. O gene *hsp90* de *B. emersonii* está presente em cópia única

Para verificar se o gene *hsp90* de *B. emersonii* esta presente em cópia única, foi feito "Southern blot" de DNA genômico de *B. emersonii* extraído de zoósporos digeridos com diferentes enzimas de restrição. A membrana foi hibridizada, em condições de alta e baixa estringências, com a sonda de 1,7 kb correspondente ao cDNA marcada radioativamente. O "Southern blot" apresentou somente uma banda, nas duas condições de hibridização testadas, indicando que *B. emersonii* deve possuir somente uma cópia do gene *hsp90* (Figura 6).

1.5. Estrutura do gene *hsp90* de *B. emersonii*

O gene Hsp90 de *B. emersonii* codifica para uma proteína de 710 aminoácidos e apresenta um único íntron interrompendo a região codificadora. A presença e o posicionamento do único íntron de 184 pb foram confirmados através da reação de 5'RACE-PCR, que sintetiza cDNA utilizando um oligonucleotídeo específico para a Hsp90, desenhado no início do segundo éxon.

Figura 2: Análise por "Southern blot" dos fagos recombinantes λ 1-23, λ 2-11, λ 3-33, λ 4-51, utilizando-se o cDNA da Hsp90 como sonda. **A-** Gel de agarose com o DNA dos fagos recombinantes digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *NotI*, corado com brometo de etídeo, antes da transferência do DNA para uma membrana de náilon. **B-** Autorradiograma da membrana após hibridização com a sonda do cDNA da Hsp90. Canaleta 1- Marcador de peso molecular (1 kb DNA Ladder-Gibco-BRL); 2- DNA do fago λ 1-23 digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e 3- *NotI*; 4- DNA do fago λ 2-11 digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e 5- *NotI*; 6- DNA do fago λ 3-33 digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e 7- *NotI*; 8- DNA do fago λ 4-51 digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e 9- *NotI*.

Figura 3: **A-** Esquema do clone genômico de 15 kb isolado do banco genômico em λ DASH incluindo os sítios adjacentes aos da clonagem e alguns sítios internos. **B-** Esquema do clone de 4,5 kb *NotI/NotI* cujo fragmento foi isolado após o resultado de "Southern blot" onde foi hibridizado pela sonda do cDNA marcada radioativamente (figura 2-B). Este fragmento, quando seqüenciado a partir do sítio de *Sau3A* mostrou correspondência da região intermediária da *Hsp90* at a região carboxi-terminal; o sítio de *BamHI* que digere este fragmento aproximadamente no meio faz parte da região 3' não codificadora do gene *hsp90* de *B. emersonii*.

Figura 4: Mapa de restrição parcial do fragmento genômico *NotI/BamHI* de 4,0 kb contendo o gene *hsp90* de *B.emersonii*. Alguns dos sítios para enzimas de restrição demonstrados foram usados para subclonagens. A posição do cDNA no clone genômico esta indicada na figura 5.

1 GCGGCCGCGACCGACTCGCCTGCCAGGCCGTTGCCCAGGCCGGACTCATCGGAGTCGCTC
61 GCGAGCGAGATCGGCGTCTCGGTAGTCGTGCGGGAGCCTCAAGTATCGCGAACCATCCTA
121 GAAGGGAGCGGTGCCGTGCGGGCAGGCCACGGTCATCGATCGCGGCCATCGTCGCGGAC
181 GAAGCGCGTCGCCGCCAACTGCACACCTGGGTCTCTGCCGTGTACTTTCCTGTGCAACAC
241 AAGGCGGTCTCTCCTGACGGGACTACACCGAGCAGACATGCGACGATGCCCCGTCCGCGA
301 GAGCTGGCCGCCCGGATCGGTGCGCCACCGTCGTTGAGTCCCCGGCTCGGCCTGGCCTTCCA
361 CCCGTGGAGCCGCTCGCGTCACGGTGCCGCTCAGACCGGTGCCACGGTGGCAGCGGGCCC
421 ACCTGCTCGGCCAGCTCGCGTGAGATGTGGTAGCCGCGGGCGCGGACGCTGGGCAAGTCG
481 CGATGCTGGGCACGGCATGAGCTCGAGTGTGCGCCGCGCACGCGGAAGCCGAGCGAACAGT
541 AACAAGCGCGGGGTTCTGGCGTGACGCGCCGGCGCGAAGGGAAGCGAAGCGCGTCGCC
601 GGGGCGCGAGACACGGCGGAGACACGCTCGGAAGCGAGGCGACGCACAAACACGTGACAC
661 GGGAAAGCGTGAGAAGCGCGGGCGGGCGGGTGCATGGGGGTGGCAGGCGGGCGGAACC
721 CGGGCGATCGTTCCTTCGCGGTGCGCCGACTCGACGTGCTTCGCTTCGCCGCGGCGCTGT
781 GCTGGCAGCTGTGCTGGCCAGCCAGGGCACACGCGCCGCGCATCGGGGTCCGGCCCCGCGG
841 CCACAGAGGGACCGCGGTACAAATACCCTCGGGCCCCCTCGCGCACCTGCCGCTCCCGC
901 CGAACCCTCCCGATAGCTTTCACCGTCCCCCTCGCTGGATACTCTCGCGGACCCGTCCCA
961 CCATCGCCACC**ATGT**CGCAGCCCCGAGACCTTTGCCTTCCAGGCCGAGCTGGCCCAGCTCA
M S Q P E T F A F Q A E L A Q L M -
1021 TGGGCCTCATCATCAAC**Ag**tatgtgatcgacaaccacccgagcgcgctcggctcggcg
G L I I N T
1081 gcaacgcggcgacggcgcggaagctgctcgatcgcgctcgctgccgtcgctccgcgtcgcccg
1141 acgtcgccgttcgcgcacctgcacaacctccgtgtcccgcgagctcgcgcgctcacacgc
1201 cctccccccgcttcgccccct**ag**CCTTCTACTCGAACAAGGATGTCTTCCTGCGTGAGCTG
F Y S N K D V F L R E L -
1261 GTCTCCAACGCGTCGGACGCGCTCGACAAGATCCGCTACGAGTCGCTGACGGACCCGTCC
V S N A S D A L D K I R Y E S L T D P S -
1321 AAGCTCGACTCGGAGAAGGACCTGTTTCATCCGCATCAAGGCCGACAAGGAGAACAAGGTG
K L D S E K D L F I R I K A D K E N K V -
1381 CTCGAGATCCGCGACTCGGGCATCGGCATGACCAAGGCCGACCTCGTCAACAACCTCGGC
L E I R D S G I G M T K A D L V N N L G -
1441 ACCATTGCCCGCTCGGGCACCAAGGCCTTCATGGAGCAGCTGACTTCGGGCGGGCGGCGAC
T I A R S G T K A F M E Q L T S G G G D -
1501 ATTTGATGATCGGCCAGTTCGGTGTGCGTTTCTACGCTGCCTACCTCGTCGCCGAGACG
I S M I G Q F G V G F Y A A Y L V A E T -
1561 GTCCAGGTGCTGACCAAGCACAAACGACGACGAGCAGTACCTGTGGGAGTCGGCCGCCGGC
V Q V V T K H N D D E Q Y L W E S A A G -
1621 GGCACCTTCACCATCAAGCGCGACACCGAGGGCGAGCAGATCGGCCGCGGTACCGTGATC
G T F T I K R D T E G E Q I G R G T V I -
1681 CGCCTCTTCATGAAGGAGGACCA**G**CTCGAGTACCTCGAGGAGGCCAAGATCAAGGAGATC
R L F M K E D Q L E Y L E E A K I K E I -

1741 ATCAAGAAGCACTCCGAGTTCATCGGCTACCCGATCCAGCTCGTCGTGACCAAGGAGGTG
 I K K H S E F I G Y P I Q L V V T K E V -
 1801 GAGAAGGAGGTGAGGACGAGGAGGCGGCCGAGGACGATGCCGACAAGAAGGAGGACGAG
 E K E V E D E E A A E D D A D K K E D E -
 1861 GCCAAGATCGAGGAGATCGACGAGGACGAGGAGGCGGCCGACAAGGCCAAGAAGACCAAG
 A K I E E I D E D E E A A D K A K K T K -
 1921 AAGGTCAAGGAGACGACGACCGAGATCGAGGAGCTCAACAAGACCAAGCCCATCTGGACC
 K V K E T T T E I E E L N K T K P I W T -
 1981 CGCAACCCCGAGGACATCACCAACGAGGAGTACGCGGCCCTTCTACAAGTCCATCTCCAAC
 R N P E D I T N E E Y A A F Y K S I S N -
 2041 GACTGGGAGGACCACCTCGCCGTCAAGCACTTCTCGGTGAGGGCCAGCTCGAGTTCGGC
 D W E D H L A V K H F S V E G Q L E F R -
 2101 GCCATCCTCTTCATCCCGCGCCGCGCGCCCTTCGACATGTTGAGCAGAAGAAGAAGCGC
 A I L F I P R R A P F D M F E Q K K K R -
 2161 AACACATCAAGCTCTACGTGCGCCGCGTCTTCATCATGGACAACGCGAGGAGCTCATC
 N N I K L Y V R R V F I M D N C E E L I -
 2221 CCCGAGTGGCTCAGCTTCGTCAAGGGCATCGTCGACTCGGAGGACCTGCCCCCTCAACATC
 P E W L S F V K G I V D S E D L P L N I -
 2281 TCGCGCGAGACGCTGCAGCAGAACAAGATCCTCAAGGTGATCCGCAAGAACCTGGTCAAG
 S R E T L Q Q N K I L K V I R K N L V K -
 2341 AAGGTGATCGACATGTTACGGAGATTGCCGAGGACAAGGAGAACTTCAACAAGCTGTAC
 K V I D M F T E I A E D K E N F N K L Y -
 2401 GAGGCCTTCGCCAAGAACATCAAGCTCGGCGTGCACGAGGACTCGCAGAACC GCGCCAAG
 E A F A K N I K L G V H E D S Q N R A K -
 2461 CTCGCCGAGTTCCTGCGCTACCACTCGACCAAGTCGGGGCAAGAGATGACGTCGCTCAAG
 L A E F L R Y H S T K S G E E M T S L K -
 2521 GACTACGTGACCCGCATGCCCCGAGTCGAGAAGGACATCTACTACATCTCGGGCGAGTCC
 D Y V T R M P E S Q K D I Y Y I S G E S -
 2581 AAGGCCGCGGTGAGAACGCGCCCTTCCTCGAGGCGCTCAAGAAGCGCGGCTACGAGGTG
 K A A V E N A P F L E A L K K R G Y E V -
 2641 CTGTACCTCGTGGACCCCATCGACGAGTACGCCGTGCAGCAGCTTAAGGAGTACGACGGC
 L Y L V D P I D E Y A V Q Q L K E Y D G -
 2701 AAGAAGCTCGTGTCGGTGACCAAGGAGGGCCTCGAGCTCGACGACACCGAGGAGGAGAAG
 K K L V S V T K E G L E L D D T E E E K -
 2761 AAGCTGCAGGAGGAGGAGAAGGCCGCCCTTCGAGCCCCTGTGCAAGGAGATCAAGTCGATC
 K L Q E E E K A A F E P L C K E I K S I -
 2821 CTCGGCGACAAGGTGAGAAAGGTGACCATCTCGCACC GCATCGTCGACTCGCCCTGCGTG
 L G D K V E K V T I S H R I V D S P C V -

```

2881 CTCGTGACGGGCCAGTACGGCTGGTCGGCCAACATGGAGCGCATCATGCGCGCCCAGGCC
    L V T G Q Y G W S A N M E R I M R A Q A -
2941 CTGCGCGACTCGTCCATGTGCGGCGTACATGGCGTCCAAGAAGACCATGGAGATCAACCCG
    L R D S S M S A Y M A S K K T M E I N P -
3001 CGCAACTCGATTGTCAAGTCGCTCAAGGCCAAGTTCGACGCGGACGCGTCGGACAAGACG
    R N S I V K S L K A K F D A D A S D K T -
3061 GTCAAGGACCTGACGCAGCTCCTGTTTCGAGACGTCGCTGCTCGCCTCGGGCTTCTCGCTC
    V K D L T Q L L F E T S L L A S G F S L -
3121 GACGACCCCGCCATCTTCGCCAAGCGCATCCACCGCATGGTCAAGCTCGGTCTCTCGATC
    D D P A I F A K R I H R M V K L G L S I -
3181 GACGACGACGCGGCCGACGCCGACGTTGCCGCGCCCGTGGCCGAGGACGACCTGCCCCCT
    D D D A A D A D V A A P V A E D D L P P -
3241 CTCGAGGAGGTCGACACGTCGGCCTCGCGCATGGAGGAGGTCGACTAAAGAGTGTGCGCCC
    L E E V D T S A S R M E E V D * -
3301 CCGACCTCGATGATGATTGCGTGTATCTCGTTTTTGATAAAAATGTACCCAAGATTCCAC
3361 ACGAAAAACTTGTCTCTCGTCCCTTGCCTCTCACCTAGCAGCCGCTCTTGTGAGCTCAGC
3421 TGTTCCGAGTCAACACGCCCTTGCGCCACGATCGCCTCGGCGCGCCGCTGCCGCCACCCG
3481 GAACGACTTCGACTGCGACTGCTGCTCAACCCGCAACGAAAAACGTAACACCATGGACGG
3541 CATCCAAGTGCAGTGGATCAGCGACCACAAGGAGCGCGGCGTGCTGGCGGCGCGCGACTT
3601 TGCCGAGGGCGACGTGATCTTCGAGGAGGCGCCGCGAGGTGTCGGCGCAGTACCTGTACAA
3661 CTCGCAGTTCTTCCCGGCGTGCGAGTACTGTCAGGCGTCCCTCGAGGCGCCCGTCGACAT
3721 GCGCGCGCGCCTCGCCGGCACCAGCAGATCCCCGCGCTGTGGGGCGCCGACGAGCTGCC
3781 GGGGCTCCCGCGGCTGCCGTGCCAGCGTACGCTTCGTTGACCTCGTAGATGGTGGTATCC
3841 GTGGCTGACCTGCATGTGTAGACGGCTGCGAGGACGTCGTGTACTGCTCCGAGACGTGCC
3901 GCTCGCGCGCGTGGGACGAGTACCACCGGATCC

```

Figura 5: Seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida do gene da Hsp90 de *B. emersonii*. Os éxons e as seqüências flanqueadoras 5' e 3' não codificadoras são mostradas com letras maiúsculas, enquanto o íntron está mostrado com letras minúsculas. As bases duplamente sublinhadas correspondem aos nucleotídeos do início e do final da seqüência do cDNA da Hsp90 isolado do fago recombinante da biblioteca de expressão de choque térmico em λ gt11. A seqüência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência de nucleotídeos está mostrada abaixo da seqüência nucleotídica. Em negrito estão demonstrados o códon para a Metionina iniciadora, o códon de terminação da tradução e os nucleotídeos das extremidades do íntron. O provável sinal de poliadenilação está sublinhado.

Figura 6: Análise por "Southern blot" de DNA genômico de *B. emersonii* com a sonda da Hsp90. 5 µg de DNA total de *B. emersonii* foram digeridos com diferentes enzimas de restrição e o produto das digestões foi submetido a "Southern blot" utilizando-se o cDNA da Hsp90 marcado radioativamente como sonda. 1- Marcador de peso molecular (λ HindIII – Gibco-BRL), 2- *Bam*HI, 3- *Eag*I, 4- *Eco*RI/*Hind*III, 5- *Kpn*I, 6- *Not*I, 7- *Xba*I, 8- Marcador de peso molecular (Ladder 1kb – Gibco-BRL). A – Gel de agarose com o produto das digestões, corado com brometo de etídeo, antes da transferência do DNA para uma membrana de náilon. B – Autorradiograma da membrana de náilon após a hibridização com a sonda do cDNA da Hsp90.

1.6. Determinação do início de transcrição do gene *hsp90* por extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa

A análise dos mRNAs por "Northern blot" demonstrou a presença de um mRNA de aproximadamente 2,5 kb e a análise de extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa, tanto com mRNA's extraídos de células crescidas a temperatura normal quanto sob choque térmico, revelou apenas um início de transcrição localizado a 65 pb antes da Metionina iniciadora (Figura 7).

1.7. Determinação do início de transcrição do gene *hsp90* por RACE-PCR e análise do processamento do íntron

Para confirmar o resultado obtido pelos ensaios de extensão de oligonucleotídeo que revelaram apenas um início de transcrição, localizado a -65 nt da metionina iniciadora e para verificar se o processamento do único íntron dentro da região codificadora estava ocorrendo normalmente em células submetidas ao choque térmico, fizemos a análise da região 5' do mRNA da Hsp90 pelo método RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends).

RNA total foi extraído de células de 0 hora de esporulação submetidas a 90 minutos de choque térmico a 38°C. Após a síntese dos cDNAs, e amplificação utilizando oligonucleotídeo específico para a Hsp90 (RACE 5'), verificamos se houve amplificação aplicando por eletroforese em gel de agarose. Foram isoladas duas regiões do gel, uma delas correspondendo-se à região de aproximadamente 250 pb, contendo a banda mais forte e outra com os fragmentos de 300, 400 e 600 pb (Figura 8-A).

Os fragmentos de interesse foram purificados e clonados em pGEM T-easy. Vários clones contendo o inserto de interesse foram isolados e seqüenciados. Todos os clones seqüenciados demonstraram a excisão correta do íntron de 184 pb, mas em somente um dos clones pudemos identificar com certeza o início de transcrição, através da localização dos primers e adaptadores utilizados nas reações de RACE-PCR (Figura 8-B). O início determinado está localizado a -70 pb da metionina

iniciadora, 5 nucleotídeos antes do início determinado pelo experimento de extensão de oligonucleotídeo.

1.8. Análise da região promotora do gene *hsp90*

A análise da região promotora em busca de seqüências consenso para promotores de choque térmico de células eucarióticas demonstrou a presença de uma região com consenso perfeito para a ligação do fator de transcrição HSF, além de sítios para ligação de outros fatores de transcrição como Sp1 e GAGA, não demonstrando TATA-box (Figura 9).

1.9. Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da Hsp90 de *B. emersonii* com proteínas homólogas de outros organismos

O gene Hsp90 codifica para uma proteína que tem elevado grau de similaridade com a Hsp90 de outros organismos. Para uma análise comparativa, foi feito um alinhamento da seqüência de aminoácidos da Hsp90 de *B. emersonii* com a de outras Hsp90 de diferentes organismos e verificou-se que, como era de se esperar, há uma alta homologia entre estas proteínas (Figura 10).

A tabela 1 apresenta as porcentagens de similaridade e identidade entre a seqüência deduzida de aminoácidos da Hsp90 de *B. emersonii* e a Hsp90 de outros organismos; a maior identidade foi obtida com *Zea mays* e *Arabidopsis thaliana*. A figura 11 mostra o dendrograma feito a partir das seqüências de aminoácidos da Hsp90 de diferentes organismos que foram comparadas com a seqüência da Hsp90 de *B. emersonii*. Como podemos observar a Hsp90 de *B. emersonii* agrupou-se com as Hsp90 de plantas e não com as de fungos.

Figura 7: Determinação do início de transcrição do gene *hsp90* de *B. emersonii*. Extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa utilizando o primer PrExt90 marcado radioativamente com $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ que foi hibridizado com 30 μg de RNA total de células de 0h de esporulação mantidas em solução de esporulação por 30 minutos tanto a 27°C (canaleta 1) como sob choque térmico a 38°C (canaleta 2). O híbrido (oligonucleotídeo + RNA) foi então estendido com transcriptase reversa e os produtos da extensão foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. O gel foi seco e exposto em filme de raios-X. A sequência nucleotídica mostrada foi feita a partir de DNA fita simples de M13 utilizando-se o primer universal forward -40. O sítio de início de transcrição está apontado com a seta e localiza-se a 65 pb da Metionina iniciadora.

Figura 8: **A-** Gel de agarose apresentando os fragmentos obtidos da reação de RACE PCR a partir de RNA total extraído de células de *B. emersonii* do tempo zero da esporulação submetidas a choque térmico a 38°C por 90 minutos. Canaleta 1 - marcador de peso molecular Ladder 1kb (Gibco-BRL); canaleta 2 - reação de RACE-PCR mostrando as bandas amplificadas que foram isoladas do gel de agarose: (i) banda de 250 pb (mais intensa) e (ii) região contendo fragmentos de 300, 400 e 600 pb. **B-** Sequência de nucleotídeos de um dos clones de pGEM T-easy obtido a partir da reação 5'RACE-PCR (banda de 250 pb) da figura A, utilizando-se o primer universal T7.

-971 GCGGCCGCGACCGACTCGCCTGCCAGGCCGTTGCCAGGCCGGACTCATCGGAGTCGCTC -912
 -911 GCGAGCGAGATCGGCGTCTCGGTAGTCGTGCGGGAGCCTCAAGTATCGCGAACCATCCTA -852
 -851 GAAGGGAGCGGTGCCGTGCGGGCGAGGCCACGGTCATCGATCGCGGCCATCGTCGCGGAC -792
 -791 GAAGCGCGTCGCCGCCAACTGCACACCTGGGTCTCTGCCGTGTACTTTCCTGTGCAACAC -732
 -731 AAGGCGGTCTCTCCTGACGGGACTACACCGAGCAGACATGCGACGATGCCCCGTCCGCGA -672
 -671 GAGCTGGCCGCCGGATCGGTGCGCCACCGTCGTTGAGTCCCGGCTCGGCCTGGCCTTCCA -612
 -611 CCCGTGGAGCCGCTCGCGTCACGGTGCCGCTCAGACCGGTGCCACGGTGGCAGCGGCC -552
 -551 ACCTGCTCGGCCAGCTCGCGTGAGATGTGGTAGCCGCGGCGCGGACGCTGGGCAAGTCG -482
 -481 CGATGCTGGGCACGGCATGAGCTCGAGTGTCGCCCGGCACGCGGAAGCCGAGCGAACAGT -432
 -431 AACAAAGCGCGGGGTTCTTGGCGTGACGCGCCGGCGCGAAGGGAAGCGAAGCGCGTCGCC -372
 -371 GGGGCGCGAGACACGGCGGAGACACGCTCGGAAGCGAGGCGACGCACAAACACGTGACAC -312
 -311 GGGAAAGCGTGAGAAGCGCGGGCGGCGGGTGCGATGGGGGTGGCAGGCGCGGAACC -252
 -251 CGGGCGATCGTTCTTCGCGGTGCGCCGACTCGACGTGCTTCGCTTCGCCGCGGCGCTGT -192
 -191 GCTGGCAGCTGTGCTGGCCAGCCAGGGCACACGCGCGCGCATCGGGGTCCGGCCCCGCGG -132
 -131 CCACAGAGGGACCGCGGTACAAATACCCTCGGGCCCTCGCGCACCCCTGCCCGCTCCCGC -72
 -71 GAACTACTCCCGATAGCTTTACCGTCCCCTCGCTGGATACTCTCGCGGACCCGTCCCA -12
 -11 CCATCGCCACCATG 3
 Met

RACE Pe
 +1

Figura 9: Região 5' não codificadora do gene *hsp90* de *B. emersonii* mostrando as seqüências consenso para ligação de alguns fatores de transcrição: GAGA (em negrito), Sp1 (sublinhado), HSF (pontilhado) e STRE (retângulo). Dois inícios de transcrição foram identificados. O início determinado pelo método de RACE-PCR está localizado a -70 nt da metionina iniciadora, cinco nucleotídeos antes do início demonstrado por extensão de oligonucleotídeo, localizado a -65 nt.

1 50

S.cerevisiae ~~~~~~ ~~~~MAGETF EFQAEITQLM SLIINTVYSN KEIFLRELIS
H.sapiens MPEETQTQDQ PMEEEEVETF AFQAEIAQLM SLIINTFYSN KEIFLRELIS
D.melanogaster ~~~~~~ ~~MPEEAETF AFQAEIAQLM SLIINTFYSN KEIFLRELIS
C.elegans ~~~~~~ ~~MSEEAETF AFQAEIAQLM SLIINTFYSN KEIYLRELIS
A.thaliana ~~~~~~ ~~~~MADAETF AFQAEINQLL SLIINTFYSN KEIFLRELIS
B.emersonii ~~~~~~ ~~~~MSQPETF AFQAEIAQLM GLIINTFYSN KDVFRLRLVS
T.cruzi ~~~~~~ ~~~~MTETF AFQAEINQLM SLIINTFYSN KEIFLRELIS

51 110

NASDALKIR YQALSDPKQL ETEPDLFIRI TPKPEEKVLE IRDSGIGMTK AELINNLGTI
NSSDALKIR YETLTDP SKL DSGKELNHL IPNKQDRTL IVDTGIGMTK ADLINNLGTI
NASDALKIR YESLTDP SKL DSGKELYIKL IPNKTAGTLT IIDTGIGMTK SDLVNNLGTI
NASDALKIR YQALTEPSEL DTGKELFIKI TPKKEEKTLT IMDTGIGMTK ADLVNNLGTI
NSSDALKIR FESLTDP SKL DGQPELFIRL VPDKANNTLS IIDSIGIGMTK ADLVNNLGTI
NASDALKIR YESLTDP SKL DSEKDLFIRI KADKENKVLE IRDSGIGMTK ADLVNNLGTI
NSSDACDKIR YQSLTNQAVL GDESHLRIRV VPDKANNTLT VEDTGIGMTK AELVNNLGTI

111 170

AKSGTKAFME ALSAGA.DVS MIGQFGVGFY SLFLVADRVQ VISKNNEDEQ YIWESNAGGS
AKSGTKAFME ALQAGA.DIS MIGQFGVGFY SAYLVAEKVT VITKNNDDEQ YAWESSAGGS
AKSGTKAFME ALQAGA.DIS MIGQFGVGFY SAYLVADKVT VTSKNNDDEQ YVWESSAGGS
AKSGTKAFME ALQAGA.DIS MIGQFGVGFY SAYLVADKVV VTSKNNDDEQ YQWESSAGGS
ARSGTKEFME ALQAGA.DVS MIGQFGVGFY SAYLVAEKVV VTKKNNDDEQ YVWESQAGGS
ARSGTKAFME QLTSGGGDIS MIGQFGVGFY AAYLVAETVQ VVTKKNNDDEQ YLWESAAGGT
ARSGTKAFME ALEAGG.DMS MIGQFGVGFY SAYLVADRVV VVSKNNDEEA YTWESSAGGT

171 230

FTVTLDVNE RIGRGTVLRL FLKDDQLEYL EEKRIKEVIK RSEFVAYPI QLLVTKEVEK
FTVRTD.TGE PMGRGTVLIL HLKEDQTEYL EERRIKEIVK KHSQFIGYPI TLFVEKERDK
FTVRAD.NSE PLGRGTVLIL YIKEDQTDYL EESKIKEIVN KHSQFIGYPI KLLVEKEREK
FVVRPF.NDP EVTRGTVLIL YIKEDQIDFL EERKIKEIVK KHSQFIGYPI KLVVEKEREK
FTVTRDVGE PLGRGTVLIL FLKDDQLEYL EERRIKDLVK KHSQFISYPI YLWTEKTTEK
FTIKRDTEGE QIGRGTVLRL FMKEDQLEYL EEAKIKEIIK KHSQFIGYPI QLVVTKEVEK
FTVTPTPCD .LKRGRTRIVL HLKEDQQEYL EERRIKDLIK KHSQFIGYDI ELMVEKATEK

231 290

EVPIPEEEKK DEEKKD.... ..EDDKKPKL EEVDEEEEEE.KKPKTK KVKEEVQELE
EVSDDAEAEK EDKEEEKEKE EKESEDKPEI EDVGSDEEEE KKDKDKKKKK KIKEKYIDQE
EVSDDADEDE KKEGDEKKEM E...TDEPKI EDVGEDEDAD KKDKDAKKKK TIKEYTEDE
EVEDEEAVEA KD...EEKKEG E.....V EVVADD.... ...ADKKKTK KIKEKYFEDE
EISDDE...DE DEPKKE....NEGEV EEV...DEEKE ..KD.GKKKK KIKEVSNWE
EVEDEEAAED DADKKE....DEAKI EEI...D.EDE EAADKAKKTK KVKETTTIE
EVTDEDEDEA AATKNEE...GEEPKV EEVKDDAEAG E...KKKKTK KVKEVTQEFV

291 350

ELNKTTPKPLWT RNPSDITQEE YNAFYKSLSN DWEDPLVVKH FSVEGQLEFR AILFIPKRAP
ELNKTTPKIWT RNPDDITNEE YGEFYKSLTN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR ALLFVPRRAP
ELNKTTPKIWT RNPDDISQEE YGEFYKSLTN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR ALLFIPRRTP
ELNKTTPKIWT RNPDDISNEE YAEFYKSLSN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR ALLFVPQRAP
LINKQKPIWL RKPEEITKEE SAAFYKSLTN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR AILFVPKRAP
ELNKTTPKIWT RNPEDITNEE YAAFYKSLSN DWEDHLAVKH FSVEGQLEFR AILFIPRRAP
VQNKMKPLWT RDPKDVTKKE YAAFYKAISN DWEEPLSTKH FSVEGQLEFR AILFVPKRAP

351 410
 FDLFESK KKKK IKLYVRRV FITDEAEDLI PEWLSFVKGV VDSDDLPLNI SREMLQQKI
 FDLFERKKK IKLYVRRV FIMDNCEELI PEYLFIRGV VDSDDLPLNI SREMLQQSKI
 FDLFERQKKR IKLYVRRV FIMDNCEELI PEYLFMKGV VDSDDLPLNI SREMLQQKV
 FDLFERKSK IKLYVRRV FIMDNCEELI PEYLFIKGV VDSDDLPLNI SREMLQQSKI
 FDLFDTRKKL IKLYVRRV FIMDNCEELI PEYLSFVKGV VDSDDLPLNI SRETLQQKI
 FDMFEQKKR IKLYVRRV FIMDNCEELI PEWLSFVKGI VDSDDLPLNI SRETLQQKI
 FDMFEPSKKR IKLYVRRV FIMDNCEELI PEWLA FVRGV VDSDDLPLNI SREMLQQKI

411 470
 MKVIRKIVK KLIEAF EIA EDSEQFDKFI SAFAKIKLG VEDTQRAA LAKLLRYNST
 LKVIRKLVK KCLELFTELA EDKEYKKFY EQFSKIKLG IEDSQRKK LSELLRYYTS
 LKVIRKLVK KTMELIEELT EDKEYKKFY DQFSKIKLG VEDSQRAK LADFLRFYTS
 LKVIRKLVK KCMELIDEVA EDKDFKKFY EQFGKIKLG IEDSTIRKK LSDFLRYSTS
 LKVIRKLVK KCIEMF EIA EKEDYTKFY EAFSKIKLG IEDSQIRGK IADLLRYNST
 LKVIRKLVK KVIDMFTEIA EDKEFKLY EAFAKIKLG VEDSQIRAK LAEFLRYNST
 LKVIRKIVK KALELFEEIA EKEDYKKFY EQFGKIKLG IEDSAIRKK LMELLRFYSS

471 530
 KSVDELTSIT DYVTRMPEIQ KIIYYITGES LKAVEKSPFL DALKAKFEV LFLTDPIDEY
 ASGDEMVSILK DYCTRMEIQ KIIYYITGET KDQVANSFV ERLRKGLEV IYMIPIDEY
 ASGDDFCSLA DYVSRMKDQ KIIYYITGES KDQVANSFV ERVKARGFEV VYMTPIDEY
 A.GDEPTSLK EYVSRMKEQ KIIYYITGES KDQVANSFV ERVKSRGFEV LYMCDPIDEY
 KSGDEMTSFK DYVTRMKEGQ KDIFYITGES KKAVE SPFL ERLKKRGYEV LYMVDAIDEY
 KSGEEMTSILK DYVTRMPESQ KDIYYISGES KAAVEAPFL EALKKRGYEV LYLVDPIDEY
 ESGEDMTTLK DYVTRMKEGQ KCIYYVTGDS KKKLETSPFI EQARRRGFEV LFMTEPIDEY

531 590
 AFTQLKEFEG KTLVDITKD. FELEE..TDE EKAEREKEIK EYEPLTKALK DILGDQVEKV
 CVQQLKEFEG KTLVSVTKEG LELPE..DEE EKKKQEEKKT KFE LCKIMK DILEKKVEKV
 VIQLKEYKG KQLVSVTKEG LELPE..DES EKKKREEDKA KFESLCKLMK SILD KVEKV
 CVQQLKEYDG KKLVSATKEG LELPE..TEE EKKKFEEDKV AYE LCKVIK DILEKKVEKV
 AVQQLKEYDG KKLVSATKEG LKLEDETEEE .KKKREEKKK SFE LCKTIK EILGDKVEKV
 AVQQLKEYDG KKLVSATKEG LELDD..TEE EKKLQEEKA AFEPLCKEIK SILGDKVEKV
 VMQQVKDFED KKFACTKEG VFEE..TEE EKKQREEKT AYERLCKAMK DVLGDKVEKV

591 650
 VVSYKLLDAP AAIRTQFGW SAMMERIMKA QALRDSSMSS YMSSKKTFEI SPKSPIIKEL
 VVSRLVTSP CCIVTSTYGW TAMMERIMKA QALRDSTMG YMAAKKLEI NPDSIIETL
 VVSRLVDSPP CCIVTSQFGW SAMMERIMKA QALRDATMG YMAGKKQLEI NPDPIVETL
 GVSRLVSSP CCIVTSEYGW SAMMERIMKA QALRDSSTMG YMAAKKLEI NPDAIMKTL
 VVSDRIVDSP CCLVTGEYGW TAMMERIMKA QALRDSSMSG YMSSKKTMEI NPDNGIMEEL
 TISRIVDSP CVLVTQYGW SAMMERIMRA QALRDSSMSA YMASKKTMEI NPRSIVKSL
 VVSERLATSP CILVTSEFGW SAMMEQIMR QALRDSSMSA YMMSKKTMEI NPAPIVKEL

651 710
 KKRVDGGAQ DKTVKDLTHL LFETALLTSG FSLEEPSFA SRI RLISLG LKIDEDDETE
 RQKAEAD.KN DKSVKDLVIL LYETALLSSG FSLEDPQT A SRIYRMIKLG LGIDEDDPTA
 RQKADAD.KN DKAVKDLVIL LFETSLLSSG FSLDSPQV A SRIYRMIKLG LGIDEDDEPMT
 RDRVEVD.KN DKTVKDLVVL LFETALLASG FSLEEPS A SRIYRMIKLG LDIGDEIED
 RKRAEAD.KN DKSVKDLVML LYETALLTSG FSLDEPTFA ARI RMLKLG LKIDEDDEVE
 KAKFDAD.AS DKTVKDLTQL LFETSLLASG FSLDDPAIFA KRI RMVKG LKIDDDAADA
 KRRVEAD.EN DKAVKDLVYL LFDTALLTSG FTLDDPTS YA ERI RMIKLG LSLDDEDNG


```

711                                     738
TAPEASTEAA. ...PVEEVPA DTEMEEVD
DDTSAAVTEE MPPL.EGDDD TSRMEEVD
TDDAQSAQDA PSLV.EDTED AS MEEVD
SAVPSSCTAE AKIE.GAEED ASRMEEVD
E.....DGD MPELEEDAAE ESKMEEVD
DVAAPVAEDD LPPLEEVDTS ASRMEEVD
EEAEPAAAVP AEPV....AG TSSME VD

```

Figura 10: Comparação da Hsp90 de *B. emersonii* com Hsp90 de outros organismos. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* e de *Saccharomyces cerevisiae* (gi-72226), *Homo sapiens* (gi-20149594), *Drosophila melanogaster* (gi-17647529), *Caenorhabditis elegans* (17559162), *Arabidopsis thaliana* (gi-15233740) e *Trypanosoma cruzi* (gi-84062). A comparação das seqüências foi feita através do programa Pile up.

Seqüências comparadas a Hsp90 de <i>B. emersonii</i>	Identidade(%)	Similaridade(%)
<i>Z. mays</i>	75,6	81,6
<i>A. thaliana</i>	72,8	81,8
<i>N. crassa</i>	70,0	80,5
<i>S. cerevisiae</i>	68,6	78,9
<i>S. pombe</i>	68,1	79,5
<i>A. capsulatus</i>	67,3	77,4
<i>H. sapiens</i>	69,0	78,8
<i>C. elegans</i>	68,2	77,9
<i>D. melanogaster</i>	68,2	77,2
<i>R. norvegicus</i>	66,4	76,7
<i>T. cruzi</i>	65,7	75,5

Tabela 1: Porcentagens de similaridade e identidade entre a proteína Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* com as de *Zea mays* (gi-729771), *Arabidopsis thaliana* (gi-15233740), *Neurospora crassa* (gi-12718221), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-72226), *Schizosaccharomyces pombe* (gi-19859479), *Ajellomyces capsulatus* (gi-101740), *Homo sapiens* (gi-20149594), *Caenorhabditis elegans* (17559162), *Drosophila melanogaster* (gi-17647529), *Rattus norvegicus* (gi-1346320) e *Tripanosoma cruzi* (gi-84062). A análise foi feita utilizando o programa Gap.

Figura 11: Dendrograma comparando-se as seqüências de aminoácidos das Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* com as Hsp90 de outros organismos. Este dendrograma foi feito através da comparação da seqüência de aminoácidos da Hsp90 de *B. emersonii* com as de *Ajellomyces capsulatus* (gi-101740), *Neurospora crassa* (gi-12718221), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-72226), *Schizosaccharomyces pombe* (gi-19859479), *Homo sapiens* (gi-20149594) *Rattus norvegicus* (gi-1346320), *Drosophila melanogaster* (gi-17647529), *Caenorhabditis elegans* (17559162), *Arabidopsis thaliana* (gi-15233740), *Zea mays* (gi-729771), e *Tripanosoma cruzi* (gi-84062), utilizando-se o programa Pile up.

1.10. Análise do padrão de expressão do mRNA da Hsp90 durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e sob condições de estresse

Como mencionado anteriormente, *B. emersonii* possui um interessante ciclo de vida que se caracteriza por dois processos de diferenciação celular bem definidos: a germinação e a esporulação. Assim, o padrão de expressão dos genes de choque térmico pode nos fornecer pistas sobre o papel fisiológico das proteínas por eles codificadas, neste microorganismo.

A expressão do gene *hsp90* de *B. emersonii* foi analisada em experimentos de “Northern blot” utilizando RNAs totais de células isoladas durante a germinação e a esporulação. Os RNAs foram extraídos de células coletadas durante diferentes intervalos de tempo do ciclo, tanto a temperaturas normais como sob choque térmico ou na presença de cloreto de cádmio. Estes dados estão apresentados nas figuras 12, 13 e 14 e representados em valores relativos com base na densitometria das bandas na autorradiografia analisadas pelo programa ImageMaster (Amersham-Pharmacia).

Como mostra a figura 12, a expressão da Hsp90 varia durante a germinação, os níveis do mRNA para esta proteína apresentam um padrão crescente durante o tempo do experimento. Por outro lado, quando células de 30 minutos de germinação são expostas a choque térmico a 38°C, há uma grande indução nos níveis do mRNA da Hsp90. Nos primeiros 30 minutos de exposição, verifica-se um aumento de aproximadamente 160 vezes nos níveis do mRNA, quando comparado aos das células mantidas a 27°C. A indução é transitória, visto que os níveis do mRNA diminuem quando o estresse permanece por mais tempo. Células de 60 minutos de germinação quando transferidas de 27°C para 38°C também apresentam uma indução transitória do mRNA da Hsp90, mas a diminuição dos níveis não ocorre tão drasticamente quanto nas células de 30 minutos de germinação. Nas células incubadas com 100 µM de CdCl₂ também ocorre indução do mRNA da Hsp90, sendo que nos primeiros 30 minutos observou-se um aumento de aproximadamente 20 vezes quando se compara com os níveis das células crescidas a 27°C na ausência de cádmio. A indução também é transitória e nas células de 60 minutos de

germinação, a indução por CdCl_2 é aproximadamente 1,6 vezes maior quando se compara com os níveis nas células de 30 minutos de germinação, expostas ao cádmio por 30 minutos. Na permanência do estresse por mais 30 minutos, os níveis de mRNA também começam a decrescer.

Como mostra a figura 13, a expressão do mRNA da Hsp90 varia durante a esporulação, apresentando níveis crescentes até as células de 90 minutos deste estágio. Após esse ponto os níveis diminuem até ser praticamente não detectado no zoósporo. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são transferidas para 38°C , há um grande aumento nos níveis do mRNA da Hsp90, sendo que o máximo da indução ocorre aos 60 minutos de choque térmico, com um aumento de aproximadamente 10 vezes quando se compara com as células do tempo zero de esporulação incubadas a 27°C . Após 120 ou 150 minutos de exposição ao calor, os níveis do mRNA são menores, confirmando a transitoriedade da resposta.

Para comparar os níveis do mRNA da Hsp90 nas várias fases do ciclo de vida do fungo, foi feito o experimento mostrado na figura 14. Comparando-se os níveis máximos das duas fases, 90 minutos da esporulação com 120 minutos da germinação, verificou-se que a quantidade do mRNA da Hsp90 é quase 2 vezes maior na esporulação.

Figura 12: Análise dos níveis do mRNA da Hsp90 durante a germinação de *B. emersonii* a temperatura normal e sob choque térmico ou tratamento com CdCl_2 . **A-** RNA total (8 μg) extraído de células isoladas na germinação e início do crescimento de *B. emersonii* tratadas ou não com CdCl_2 ou choque térmico foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose. O RNA foi então transferido para uma membrana de náilon (Hybond N^+) e hibridizado com o cDNA da Hsp90 marcado radioativamente. A canaleta 1 corresponde ao zoósporo; as canaletas 2 a 4 correspondem às células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação; a canaleta 5 corresponde às células vegetativas de 120 minutos; as canaletas 6 a 8 correspondem às células de 30 minutos de germinação expostas a choque térmico (CT) de 38°C durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 9 e 10 correspondem às células de 60 minutos de germinação expostas a choque térmico de 38°C durante 30 e 60 minutos; as canaletas 11 a 13 correspondem às células de 30 minutos de germinação incubadas com $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (Cd) durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 14 e 15 correspondem às células de 60 minutos de germinação incubadas com $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 durante 30 e 60 minutos, respectivamente. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp90 estimado pela densitometria do autorradiograma mostrado em A.

Figura 13: Análise dos níveis do mRNA da Hsp90 durante a esporulação de *B. emersonii* a temperatura normal e sob choque térmico. **A-** RNA total (8 µg) extraído de células sincronizadas na esporulação a temperatura normal e após choque térmico foi submetido à eletroforese em gel de formaldeído-agarose. Após eletroforese o RNA foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond N⁺) e hibridizado com o cDNA da Hsp90 marcado radioativamente. As canaletas 1 a 6 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos da esporulação; a canaletas 7 corresponde ao zoósporo; as canaletas 8 a 11 correspondem às células do tempo zero de esporulação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 120 e 150 minutos. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp90 estimado pela densitometria do autorradiograma mostrado em A.

Figura 14: Análise dos níveis do mRNA da Hsp90 durante o ciclo de vida de *B. emersonii*. **A-** RNA total (8 μ g) extraído de células sincronizadas na germinação, início do crescimento e esporulação de *B. emersonii* foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose. Após transferência do RNA para uma membrana de náilon (Hybond N⁺) e hibridização com a sonda do cDNA da Hsp90 a membrana foi exposta a filme de raios-X. As canaletas 1 a 3 correspondem a RNA de células coletadas nos tempos 0, 60 e 120 minutos da esporulação; a canaleta 4 a RNA de zoósporo; as canaletas 5 a 7 a RNA de células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação e a canaleta 8 a RNA de células vegetativas de 120 minutos de crescimento a 27°C. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp90 estimado pela densitometria do autorradiograma mostrado em A.

1.11. Níveis relativos da proteína Hsp90 durante o ciclo de vida de *B.emersonii*

A análise do acúmulo da proteína Hsp90 foi feita através de experimentos de “western blot” utilizando o anticorpo monoclonal anti-Hsp90. Extratos de proteínas totais foram preparados de células isoladas durante os vários estágios do ciclo de vida de *B. emersonii* (germinação, crescimento vegetativo e esporulação), tanto a temperaturas normais como sob choque térmico. Estes dados estão apresentados nas figuras 15, 16, 17 e 18.

Como mostra a figura 15, os níveis da Hsp90 durante a germinação são praticamente constantes. Por outro lado, quando células de 30 minutos de germinação são expostas a tempos crescentes de choque térmico a 38°C, há um grande aumento na quantidade da Hsp90. Já nos primeiros 30 minutos de exposição há um acúmulo de cerca de 3 vezes mais proteína, sendo que após uma hora de choque térmico os níveis passam a ser cerca de 5 vezes maiores quando comparados às células mantidas a 27°C. A indução é transitória, visto que os níveis da Hsp90 começam a diminuir quando o estresse permanece por mais tempo. Células de 60 minutos de germinação, quando transferidas de 27°C para 38°C, também apresentam níveis aumentados da Hsp90, aproximadamente 6 vezes maior nas células mantidas a 38°C por uma hora quando comparadas às mantidas a 27°C.

A figura 16 mostra que a quantidade da Hsp90 é praticamente constante no crescimento vegetativo e em níveis muito baixos. Quanto à resposta ao choque térmico, as células vegetativas de 4h30min de crescimento em meio DM-4 quando expostas a diferentes tempos de choque térmico a 38°C, apresentam acúmulo crescente da Hsp90 até duas horas de exposição. Já nos primeiros 30 minutos de exposição há um acúmulo de cerca de 6 vezes mais proteína, sendo que os após duas horas de choque térmico os níveis passam a ser cerca de 200 vezes maiores do que o das células mantidas a 27°C.

Durante a esporulação, os níveis da Hsp90 variam, sendo crescentes até as células de 90 minutos de esporulação. Após esse ponto os níveis diminuem gradualmente até o zoósporo. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são submetidas a incubação a 38°C há um aumento

gradual nos níveis da Hsp90, atingindo após duas horas de choque térmico, níveis aproximadamente 3 vezes maiores do que nas células de 2 horas de esporulação a 27°C (Figura 17).

Para comparar os níveis da Hsp90 nas várias fases do ciclo de vida do fungo, foi feito o experimento mostrado na figura 18. Comparando-se os níveis máximos da proteína na esporulação (célula de 90 minutos após o carenciamento) com as células de 30 minutos da germinação, verificou-se que a quantidade da Hsp90 é aproximadamente 3 vezes maior na esporulação.

O aumento nos níveis de mRNA na esporulação refletiram num aumento na quantidade da Hsp90, indicando que o controle da expressão deste gene é pré-traducional, provavelmente devido a um aumento na transcrição do gene durante a fase de esporulação.

1.12. Expressão da proteína recombinante fHsp90-His para obtenção de anticorpos

A proteína fHsp90-His foi expressa em *E. coli* usando o vetor de expressão pPROEX-HTa contendo o inserto de 706 pb correspondente ao fragmento *EcoRI/StuI* do cDNA da Hsp90 (Figura 19-A).

Dois clones foram selecionados (A2-1 e A10-1) para o experimento de indução-piloto, como descrito em materiais e métodos. Os extratos totais das culturas foram analisados em gel de SDS-PAGE, mostrando grande expressão da proteína recombinante com aproximadamente 34kDa. Observou-se o máximo de acúmulo da proteína após duas horas de indução com IPTG (Figura 19-B). O acúmulo da proteína também foi verificado através de "western blot", utilizando-se o anticorpo monoclonal anti Hsp90 e um anticorpo anti-cauda de histidina (Sigma) (dados não mostrados).

Após a indução em larga escala, a fHsp90-His mostrou-se insolúvel e portanto, foi primeiramente solubilizada a partir de corpos de inclusão e posteriormente purificada através de resina de níquel. As frações de eluição contendo diferentes concentrações de imidazol foram resolvidas em SDS-PAGE e foi

possível verificar que a maior parte da proteína foi eluída com 100 e 150 mM de imidazol (dados não mostrados), obtendo-se um rendimento total de 2,5 mg.

Para a obtenção de anticorpos policlonais anti-Hsp90, foram feitos inóculos da proteína em duas coelhas e para verificarmos se o soro produzido reconhecia a Hsp90 de *B. emersonii*, extrato total de células do tempo zero de esporulação, submetidas a choque térmico a 38°C por 90 minutos, foi aplicado em SDS-PAGE e analisado por "western blot".

Verificou-se que não houve reatividade dos soros pré-ímmes nas diluições testadas contra extrato total de *B. emersonii* e que o anti-soro produzido reconhecia uma proteína de aproximadamente 83 kDa, compatível com a massa molecular calculada para a proteína deduzida a partir do gene *hsp90*, sendo que o soro 1 reconheceu mais fortemente que o soro 2 a Hsp90 de *B. emersonii* em títulos de até 1:2000 (dados não mostrados). Este anti-soro anti-Hsp90 foi utilizado em experimentos de imunolocalização.

1.13. Imunolocalização da Hsp90 de *B. emersonii*

Para verificarmos a localização da Hsp90 de *B. emersonii* realizamos experimentos de imunolocalização em zoósporos. Os experimentos foram feitos utilizando-se o soro policlonal anti-Hsp90 e anticorpo secundário anti IgG de coelho conjugado com fluoresceína. As lâminas foram analisadas em fase clara (contraste de fase) e fase escura (imunofluorescência) no microscópio óptico Nikon Microphot-FX. A imagem da figura 20-A mostra que a Hsp90 está distribuída por todo o zoósporo. Esta localização difere da encontrada para as ATPases de *B. emersonii* BePAT1 e BePAT2 que estão somente na membrana plasmática dos zoósporos (Fietto *et al.*, 2002).

Figura 15: Níveis da proteína Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* durante a germinação e após o choque térmico **A-** Ensaio de "western blot" para analisar a presença da Hsp90 em extratos protéicos de *B. emersonii*. Proteínas totais de células de *B. emersonii* em diferentes pontos da germinação e início do crescimento a temperatura normal ou sob choque térmico a 38°C, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então incubada com um anticorpo monoclonal anti-Hsp90 obtido em camundongo (Sigma), seguindo-se incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. A canaleta 1 corresponde ao zoósporo; as canaletas 2 a 4 correspondem às células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação; a canaleta 5 corresponde às células vegetativas de 120 minutos; as canaletas 6 a 8 correspondem às células de 30 minutos de germinação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 9 e 10 correspondem às células de 60 minutos de germinação expostas a choque térmico a 38°C durante 30 e 60 minutos, respectivamente. **B-** Porcentagem relativa da Hsp90 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 16: Níveis da proteína Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* durante o crescimento vegetativo e após o choque térmico **A-** Ensaio de "western blot" para analisar a presença da Hsp90 em extratos protéicos de *B. emersonii*. Proteínas totais de células de *B. emersonii* em diferentes pontos do crescimento a temperatura normal e sob choque térmico a 38°C foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-Hsp90 obtido em camundongo (Sigma) seguindo-se incubação com anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 5 correspondem às células vegetativas coletadas 4h30min, 5h, 5h30min, 6h e 6h30min após o inóculo dos zoósporos em meio definido (DM-4); as canaletas 6 a 9 correspondem às células vegetativas de 4h30min expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 90 e 120 minutos. **B-** Porcentagem relativa da Hsp90 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 17: Níveis da proteína Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* durante a esporulação e após o choque térmico. **A-** Ensaio de "western blot" para analisar a presença da Hsp90 em extratos protéicos de *B. emersonii*. Proteínas totais de células de *B. emersonii* em diferentes pontos da esporulação a temperatura normal e sob choque térmico a 38°C foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-Hsp90 obtido em camundongo (Sigma) seguindo-se incubação com anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 6 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos da esporulação; a canaleta 7 corresponde ao zoósporo; as canaletas 8 a 11 correspondem às células do tempo zero de esporulação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 90 e 120 minutos. **B-** Porcentagem relativa da Hsp90 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 18: Variação dos níveis da proteína Hsp90 de *Blastocladia emersonii* durante a esporulação e a germinação. **A-** Ensaio de "western blot" utilizando proteínas totais de *B. emersonii* de células de esporulação e de germinação a temperatura normal. Após eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-Hsp90 obtido em camundongo (Sigma) seguindo-se incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 5 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos da esporulação; a canaleta 6 corresponde ao zoósporo; as canaletas 7 e 8 correspondem às células coletadas nos tempos 30 e 60 minutos da germinação. **B-** Porcentagem relativa da Hsp90 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 19: A- Mapa de restrição parcial do clone do cDNA da *hsp90* de 1,7 kb no vetor de clonagem pBluescript SK demonstrando os sítios flanqueadores, incluindo o sítio de *EcoRI* e o sítio *StuI* utilizados para clonar parte do cDNA no vetor de expressão pPROEX HTa. **B-** Indução de parte da Hsp90 de *Blastocladiella emersonii* em *E. coli*. O gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) foi corado com azul de Coomassie e mostra na canaleta 1, o marcador de peso molecular Bench Mark (Gibco BRL); nas canaletas 2 a 5, extrato total de *E. coli* clone A2-1 nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após a adição de 0,6 mM de IPTG, respectivamente. Nas canaletas 6 a 9 extrato total de *E. coli* clone A10-1 nos tempos 0, 1, 2 e 3 horas após a adição de 0,6 mM de IPTG, respectivamente.

Figura 20: Imunolocalização da Hsp90 em zoósporos de *Blastocladiella. emersonii* por imunofluorescência. Zoósporos de *B. emersonii* foram fixados e incubados (como descrito em materiais e métodos) na presença (A e B) ou na ausência (C e D) do antisoro anti-Hsp90 seguindo-se incubação com anticorpo secundário conjugado com fluoresceína. A mesma lâmina foi observada por microscopia de imunofluorescência (A e C) ou por contraste de fase (B e D) utilizando-se microscopia óptica. Fluorescência intensa foi observada nos zoósporos (A) e não se observou fluorescência no experimento controle (C). As imagens foram feitas utilizando uma objetiva de 20X e uma lente de 10X perfazendo um aumento total de 200X. O tamanho dos zoósporos é de aproximadamente 8 μm .

2. HSP60

Para o estudo do gene *hsp60* iniciamos com experimentos de "Southern blot" genômico, utilizando como sondas a região codificadora de GroEL de *Caulobacter crescentus* (isolado em nosso laboratório) e o fragmento do cDNA completo da *hsp60* do fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (gentilmente cedida pela Profa Silvia Izacc), porém nunca obtivemos um resultado satisfatório. Fizemos também várias tentativas de isolamento de um clone de cDNA analisando com anticorpos monoclonais anti Hsp60 (Sigma) uma biblioteca de cDNA construída em nosso laboratório no vetor de expressão λ gt11(Stratagene), a mesma que foi utilizada para isolar o cDNA da Hsp90, entretanto nunca obtivemos sucesso.

Por todos esses resultados negativos resolvemos tentar isolar o gene *hsp60* de *B. emersonii* por reações de PCR usando oligonucleotídeos degenerados, codificando regiões conservadas da proteína, como descrito a seguir.

2.1. PCR com oligonucleotídeos degenerados para amplificação de parte do gene *hsp60*

Para tentar isolar o gene *hsp60* de *B. emersonii* foram sintetizados vários pares de oligonucleotídeos baseados em alinhamentos da sequência de aminoácidos de várias proteínas Hsp60, tanto de procariotos como de eucariotos, a fim de identificar regiões conservadas entre as proteínas de diferentes espécies e que preferencialmente contivessem diferenças de alguns aminoácidos entre as proteínas de eucariotos e procariotos. Devido à diferença de utilização de códons para um mesmo aminoácido e com base nos códons preferenciais de *B. emersonii*, algumas bases dos oligonucleotídeos foram "degeneradas". Também, para facilitar a clonagem do produto de PCR, em alguns pares de oligonucleotídeos foram adicionados nucleotídeos codificando seqüências de reconhecimento de enzimas de restrição nas extremidades 5' (os oligonucleotídeos estão listados em materiais e métodos).

Após várias tentativas com diferentes combinações de pares de oligonucleotídeos, (pares sintetizados para serem utilizados em conjunto) conseguimos uma quantidade razoável de produto da reação de PCR em algumas das reações. Os fragmentos de PCR foram purificados a partir da banda isolada do gel de agarose, entretanto não conseguimos cloná-los.

Depois de inúmeras tentativas, resolvemos combinar diferentes pares de oligonucleotídeos e obtivemos a amplificação satisfatória em duas das nove reações tentadas: reação 5 (oligonucleotídeos Hsp60EhEco e Hsp60-3) e reação 7 (primers Hsp60Ehforw e Hsp60-3) (Figura 21). Purificamos o produto da PCR isolado de gel de agarose utilizando o kit Nucleotrap gel extraction (Clontech), já que com outros métodos de purificação anteriormente testados, nunca obtivemos sucesso nas clonagens. Esse produto foi clonado sem digerir, no plasmídeo pGEM T-easy. Foram feitas várias minipreparações de DNA plasmidial e muitas continham o inserto do tamanho esperado. Após o seqüenciamento de alguns desses clones, confirmamos serem correspondentes ao gene *hsp60* devido à alta homologia dada pelo programa BLAST com seqüências de genes *hsp60* de diferentes fungos.

2.2. Isolamento do cDNA da Hsp60 de uma biblioteca de choque térmico construída em pSPORT

Concomitantemente, em nosso laboratório foi construída e analisada uma biblioteca de cDNA com RNAs extraídos de células de 30 minutos de esporulação submetidas a 30 minutos de choque térmico a 38°C (R. C. Georg, dados não publicados). Com este trabalho, foram obtidas aproximadamente 2.700 seqüências de ESTs clonadas no plasmídeo pSPORT-1. Dentre os clones analisados, foram encontrados apenas dois clones codificando a Hsp60. O clone HSR12A06 utilizado neste trabalho (Figura 22), trata-se do cDNA completo. A primeira análise da biblioteca foi feita através do seqüenciamento dos clones usando-se o primer universal T7, já que a biblioteca é construída orientada e com este primer, numa reação de seqüenciamento é possível ler aproximadamente 600 pb a partir da extremidades 5' dos cDNAs clonados.

Após esta primeira análise a partir da reação de seqüenciamento com o primer T7 foi possível identificar o início do cDNA da Hsp60. Para seqüenciar a outra extremidade foi utilizado o primer universal Sp6, lendo-se mais 600 pb aproximadamente. O inserto correspondente ao cDNA da Hsp60 de *B.emersonii* com aproximadamente 2,0 kb, primeiramente estimado pela digestão do clone HSR12A06 com as enzimas de restrição *EcoRI/HindIII*, foi seqüenciado por completo com a utilização de oligonucleotídeos sintéticos, sendo a maioria deles usados anteriormente para as reações de PCR. A região seqüenciada dos clones de pGEM T-easy que continham o fragmento de 0,7 kb obtido através da reação de PCR para a *hsp60* está contida na região seqüenciada do cDNA (Figura 22).

2.3. O gene *hsp60* de *B. emersonii* está presente em cópia única

Para verificar se o gene *hsp60* de *B. emersonii* está presente em cópia única, foi feito "Southern blot" de DNA genômico de *B. emersonii* digerido com diferentes enzimas de restrição. A membrana foi hibridizada, em condições de alta e baixa estringências, com a sonda de 2,0 kb correspondente ao cDNA (clone HSR12-A6 digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*) marcada radioativamente. O "Southern blot" apresentou somente uma banda demonstrando que *B. emersonii* provavelmente possui somente um único gene *hsp60* (Figura 23).

2.4. Determinação do início de transcrição do gene *hsp60* por extensão de oligonucleotídeo com transcriptase reversa

Mesmo sem conhecer a região 5' não codificadora do gene *hsp60*, fizemos a reação de extensão de oligonucleotídeo com a enzima transcriptase reversa para localizar o início de transcrição do gene *hsp60* de *B. emersonii*. Pelo resultado obtido neste experimento verificou-se a presença de dois inícios de transcrição a cerca de 300 e 303 nt a montante do início de tradução (códon ATG da Metionina iniciadora) e que os níveis do mRNA para este gene aumentam muito com a exposição à alta temperatura (Figura 24).

Figura 21: Gel de agarose corado com brometo de etídeo demonstrando as duas únicas reações de PCR onde houve amplificação, cujos fragmentos depois de purificados, clonados em pGEM T-easy e seqüenciados, demonstraram ter homologia com outras Hsp60 de fungos. Marcador de peso molecular ϕ X174 digerido com *Hind*III; a reação 5 foi feita com os oligonucleotídeos Hsp60EhEco e Hsp60-3 e a reação 7 com os oligonucleotídeos Hsp60Ehforw e Hsp60-3 (as condições da reação de PCR estão descritas em materiais e métodos). Nas demais reações não obtivemos amplificação.

1 GACCGACCGTCCCCCTCGCCACCTCGATCCGTTGCGCCACTGTCAACC**ATGC**ACCGCATTC
M H R I P -
61 CCCACGCTGCCCCGCTCGCCCCGCGCCGCCCTGCGCCGGTCCTTCTCCACGCACAAGG
H A A R V A R A A A L R R S F S T H K E -
121 AGATCACGTTGCGCGCCGACGGCCGCGCCAAGCTCGCCAAGGGCGTCGACACGCTGGCCC
I T F G A D G R A K L A K G V D T L A R -
181 GCGCCGTCGCCGTGACGCTCGGCCCCAAGGGCCGCAACGTGCTCATCGAGCAGCCCTACG
A V A V T L G P K G R N V L I E Q P Y G -
241 GCTCGCCCAAGATCACCAAGGACGGTGTCTCGGTGCGCCAAGGCCATCACGCTCGAGGACA
S P K I T K D G V S V A K A I T L E D K -
301 AGTTCGAGAACCTCGGTGCCCCGCTCGTCCAGGACGTCGCCAACAAGACCAACGAGGTG
F E N L G A R L V Q D V A N K T N E V A -
361 CCGGTGACGGCACCACGACCGCCACGGTCCTCACCCGCGCCATCTTCAACGAGGGCCTCA
G D G T T T A T V L T R A I F N E G L K -
421 AGAACGTTGCCGCGGGTGCAACCCACGGACCTGCGCCGCGGTGTCCAGGTGGCCGTG
N V A A G C N P T D L R R G V Q V A V D -
481 ACGCCGTCGTCAAGCACCTCAAGGAGAACCGCCGCATGATCACGTCGTCCGAGGAGGTGG
A V V K H L K E N R R M I T S S E E V A -
541 CCCAGGTGCGGACCATTTCGGCCAACGGCGACCGCCACGTCGGCGCCCTGATCGCGCAGG
Q V A T I S A N G D R H V G A L I A Q A -
601 CCATGGAGAAGGTTGGCAAGGAGGGCGTCATCACGGTCCAGGAGGGCAAGACGCTCGAGG
M E K V G K E G V I T V Q E G K T L E D -
661 ACGAGCTCCAGATCACCGAGGGCATGCGCTTTGACCGCGGCTTCATCTCGCCCTACTTCA
E L Q I T E G M R F D R G F I S P Y F I -
721 TCACCGATGTCAAGGGCCAGAAGGTGAGTTCGAGAAGCCCCCTCGTCCTCCTCTCGGAGA
T D V K G Q K V E F E K P L V L L S E K -
781 AGAAGATCTCGCTCATCCAGGACGTGCTCCCCGCCCTCGAGGCCGCCGCCAGACCCGCC
K I S L I Q D V L P A L E A A A Q T R R -
841 GCCCGCTCCTCATCGTCGCCGAGGACGTCGACGGCGAGGCCCTCGCCGCCTGCATCCTCA
P L L I V A E D V D G E A L A A C I L N -
901 ACAAGCTCCGCGGCCAGGTCCAGGTGTGCGCCGTCAAGGCC**CCCGGCTTCGGCGACAACC**
K L R G Q V Q V C A V K A P G F G D N R -
961 GCAAGGCCACGCTCCAGGACATGGCCATCCTCACGGGCGGCCAGGTCTTTTCGGACGAGC
K A T L Q D M A I L T G G Q V F S D E L -
1021 TCTCGGTCAAGCTCGAGAAGGCGACCATTGACCAGCTCGGCCAGGCCGGCACCGTGACCG
S V K L E K A T I D Q L G Q A G T V T V -


```

1081 TGACCAAGGAGGACACCATCTTCCTCAACGGCCTCGGCGACAAGGCGGCGCTCGGCGAGC
      T K E D T I F L N G L G D K A A L G E R -
1141 GGTGCGAGCAGATCCGCTCGGCCATTGCCGACACGGCGTCCGAGTACGAGAAGGAGAAGC
      C E Q I R S A I A D T A S E Y E K E K L -
1201 TGCAGGAGCGCCTGGCCAAGCTGTCGGGCGGGCGTCCCGTGATCAAGGTCGGCGGCTCGT
      Q E R L A K L S G G V A V I K V G G S S -
1261 CCGAGGTTCGAGGTTGGCGAGAAGAAGGACCGGTTTCGTCGACGCGCTCAACGCGACGCGCG
      E V E V G E K K D R F V D A L N A T R A -
1321 CGGCCGTCGAGGAGGGCATCGTGCCCGGCGGTGGCACCGCCCTGCTCAAGTCGACGCTCA
      A V E E G I V P G G G T A L L K S T L I -
1381 TCCTCGGCGACCTCAAGGCGACCGTCGCCAACTTTGACCAGCAGCTCGGCGTCGACCTCG
      L G D L K A T V A N F D Q Q L G V D L V
1441 TCCGCCGCGCCCTCCAGGCGCCACGCGCACCATCGTCGACAACGCCGGCGACTCTGGCT
      R R A L Q A P T R T I V D N A G D S G S -
1501 CGTTTGTCTCGGCAAGCTCCTTGACCAGGCGTCCGTCGAGGGCAAGACCTTCACCATCG
      F V V G K L L D Q A S V E G K T F T I G -
1561 GCTACGACGCGGCCAACGGCCAGTACGTGGACATGATCAAGGCCGGTATCATTGACCCGC
      Y D A A N G Q Y V D M I K A G I I D P L -
1621 TCAAGGTCTGTCGCGACCGCCCTCGTCGATGCCGCGGTGTGCGCTCGCTCCTCACCACGT
      K V V R T A L V D A A G V A S L L T T S -
1681 CCGAGTGCATGATCGTCGACGCGCCCAAGAAGGACGCCCCCGCGGCCCCCGCGGCCGGCG
      E C M I V D A P K K D A P A A P A A G G -
1741 GGATGGGCGGTATGGGTGGTATGGGCGGCATGGGCTTCTAAAGCCGCTTGATGGTGCCGAG
      M G G M G G M G G M G F *
1801 GAAGAAGAGGATGATGATTTAGGACAGCTCTTGATATCTATAAACGTGTACCTTCTCAAA
1861 AAAAAAAAAAAAAA 1873

```

Figura 22: Seqüência do clone HSR12-A06 (cDNA Hsp60 clonado em pSPORT-1). Este cDNA apresenta uma cauda poli A+ contendo 16 resíduos de adenina. Em negrito estão o códon da Metionina iniciadora e o códon de parada; a seqüência sublinhada corresponde ao provável sinal de poliadenilação. Abaixo da seqüência nucleotídica está apresentada a seqüência deduzida de aminoácidos. As setas indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados na reação de amplificação por PCR.

Figura 23: Análise por "Southern blot" de DNA genômico de *B. emersonii*. 5 µg de DNA genômico foram digeridos com diferentes enzimas de restrição e o produto das digestões foi hibridizado com a sonda radioativa de um fragmento *Pst*I correspondente à região 5' não codificadora e início da região codificadora do cDNA da Hsp60. Na canaleta 1 o DNA foi digerido com as enzimas de restrição *Hind*III/*Bam*HI, 2- *Hind*III/*Eco*RI, 3-*Hind*III/*Kpn*I, 4- *Hind*III/*Not*I, 5- *Hind*III, 6- *Pst*I/*Bam*HI, 7- *Pst*I/*Eco*RI, 8- *Pst*I/*Kpn*I, 9- *Pst*I/*Not*I, 10- *Pst*I. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 kb DNA Ladder (Gibco-BRL).

Figura 24: Determinação do início de transcrição do gene *hsp60* de *B.emersonii*. Extensão de oligonucleotídeo utilizando o primer PrExt60 marcado radioativamente com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP que foi hidridizado com 30 μg de RNA total de células de 0h de esporulação mantidas em solução de esporulação por 30 minutos tanto a 27°C (canaleta 1) como sob choque térmico a 38°C (canaleta 2). O híbrido (oligonucleotídeo + RNA) foi então estendido com transcriptase reversa e os produtos da extensão foram resolvidos por eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. O gel foi seco e exposto a filme de raios-X. A sequência nucleotídica mostrada foi feita a partir de DNA fita simples de M13 utilizando-se o primer universal -40. Os prováveis inícios de transcrição estão apontados com setas e localizam-se a 300 e 303 pb da metionina iniciadora.

2.5. Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da Hsp60 de *B. emersonii* com proteínas homólogas de outros organismos

O gene Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* codifica para uma proteína que tem elevado grau de similaridade com a Hsp60 de outros organismos. A figura 25 mostra uma análise comparativa feita da seqüência deduzida de aminoácidos da Hsp60 de *B. emersonii* com a de outras Hsp60 de diferentes organismos. A tabela 2 apresenta as porcentagens de similaridade e identidade entre a seqüência deduzida de aminoácidos da Hsp60 de *B. emersonii* e a Hsp60 de outros organismos; a maior identidade foi obtida com *Neurospora crassa* e *Paracoccidioides brasiliensis*.

Para uma análise filogenética, as seqüências de aminoácidos da Hsp60 de diferentes organismos foram comparadas com a seqüência da Hsp60 de *B. emersonii*. A figura 26 mostra o dendrograma feito a partir das seqüências de aminoácidos da Hsp60 de diferentes organismos que foram comparadas com a Hsp60 de *B. emersonii*. Como podemos observar, a Hsp60 de *B. emersonii* agrupou-se com as Hsp60 de fungos.

```

1
H.sapiens ~~~~~ MLRLPTVFRQ MRPVSRVLAP
D.melanogaster ~~~~~ MFRLPVSLAR .SSISRQLA.
C.elegans ~~~~~ ~~~~~M LRLARKGLQT
S.cerevisiae ~~~~~ ~~~~~MLRSSVVR SRATLRPLLRL
B.emersonii ~~~~~ ~~~~~M~RIPHA ARVARAAALR
T.cruzi ~~~~~ ~~~~~ ~~~~~MFR
A.thaliana ~~~~~MA SAMALSSASV LCSSRQSKLG GGQQQGQRV SYKRTIRRF

51
HLTRAYAKDV KFCADARA.. IMLQGVDLLA DAVAVTMGPK GRTVIIEQSW GSPKVTKDG
V
..MRGYAKDV RFGPEVRA.. MMLQGVVDLA DAVAVTMGPK GRNVIIEQSW GSPKITKDG
V
AVVRSYAKDV KFGAEGRO.. AMLVGVHLLA DAVSVTMGPK GRNVIIEQSW GSPKITKDG
V
RAYSSH.KEL KFGVEGRA.. SLLKGVETLA EAVAATLGPK GRNVLIEQPF GPPKITKDG
V
RSFSTH.KEL TFGADGRA.. KLAGRDTLA RAVAVTLGPK GRNVLIEQPY GSPKITKDG
V
SAARFAGKEI RFGTEARQ.. SMQKGVQRAV SAVATTLGPK GRNVIIEQSY GAPKITKDG
V
SVRAH.VKEI AFDQSRA.. ALQAGIDKLA DCVGLTLGPR GRNVLVD.EF GSPKVVVDG
V

111
TVAKSIDLKD KYK IGAKLV QDVAHNTTEE AGDGTATTATV LARSIAKEGF EKISKGAAPV
TVAKSIELKD KFQ IGAKLV QDVAHNTTEE AGDGTATTATV LARAIKEGF EKISKGAAPV
TVAKSIDLKD KYQ LGAKLI QDVA KATTEE AGDGTTCATV LTRAIAKEGF ERSSRGAV
TVAKSIVLKD KFE MGAKLL QEVASKTTEA AGDGTTSATV LGRAIFTESV KVAAGCIPM
SVAKAITLED KFE LGARLV QDVA KTEEV AGDGTATTATV LTRAIFTEGL KVAAGCIPM
TVAKAIEFKD PFE MGAQLV RQVC KTDL AGDGTTSATV LVAVFSESL RCIATGTPI
TIARAIELP AME AGAALI REVASKTDS AGDGTTSATI LAREIIKGL LSVTSGAIPV

171
EIRRGVMLAV DAVIAELKKQ SKPVTTPPEEI AQVATISANG DKEIGHIISD AMKKVGRKEV
EIRRGVMLAV ETVKDLKTM SRPVSTPEEI AQVATISANG DQAIGLISE AMKKVGRDGV
EIRRGVMLAV EVVVAELKKI SKKVTTPEEI AQVATISANG DTVVGHLISD AMKKVGTTEV
DLRRGSQVAV EKVIETLSA KKEITTSEEI AQVATISANG DSIVGKLLAS AMEKVGKEGV
DLRRGVQVAV DAVVK LKEI RRMITSSEEV AQVATISANG DRVGLALIAQ AMEKVGKEGV
DMKRGMDRAV GVILQSVAEQ SRKVSTSENI VQVATISANG DEELGRLIGQ AMEKVGKDG
V
SLKRGIDKTV QGLIEELQKK ARPVKGRDDI RAVASISAGI DDLIGSMIAD AIDKVGPDGV

231
ITVKDGKTLN DELEIIIEGMK FDRGYISPYF ITSAGKQCE FQDAYVLLSE KKISSIONSIV
ITVKDGKTLT DELEVIEGMK FDRGYISPYF ISSKGAKEVE FQDALLLLSE KKISSIONSII
ITVKDGKTLN DQLELIEGMK FDRGYISPYF ITSAGKQCE YEKALVLLSE KKISSIONDIV
ITIREGRTLE DELEVTEGMR FDRGFISPYF ITDPKSSKVE FEKPLLLLSE KKISSIONDIL
ITVQEGKTLN DELQITEGMR FDRGFISPYF ITDVKGQKVE FEKPLVLLSE KKISSIONDVL
ITTQDGKTMT TELEVEEGMS IDRGYISPYF VTDKAQKAE LEDAFVLVSA KKVSSIONTIL
LSISSIONSFE TTVEVEEGME IDRGYISPYF VTNPEKLLAE FEARVLITD QKITAIDII

291
PALEIAAAR KPLVIIAEDV DGEALSTLVL RLKVGQLQVV AVKAPGFQD RKQLKDMAI
PALEIAAQR KPLVIIAEDI DGEALSTLVV RLKIGLQVA AVKAPGFQD RKSTLTDMAI
PALEIAAKLR RPLVIIAEDV DGEALTTLVL RLKVGQLQVV AIKAPGFQD RKALKDMGI
PALEISNQSR RPLIIIAEDV DGEALAACIL KLRGQVKVC AVKAPGFQD RKTIQDIAV
PALEAAAQTR RPLIIAEDV DGEALAACIL KLRGQVKVC AVKAPGFQD RKATLQDMAI
PALNHVVRTG RPLIIAEDV ESEALTTMIF KLGKGLKIA CVKAPGFQD KTAMMQDIAI
PILEKTTQLR APLIIAEDV TGEALATLVV KLRGVLLVV AVKAPGFQER RKAMLQDIAI

```



```

351                                     410
ATGGAVFGEE ..GLTL LED VQP DLKVG EVIVTKDDAM LLKGKGDKAQ IEKRIQEIE
ASGGIVFGDD ..ADLVKLED VKVSDLGQVG EVVITKDDTL LLKGKGGKDD VLRR QIKD
ATEASIFGDE ..TDLRLLED ITA DLGEVD EVTITKDDTL LLRGRGDQTE IEKRIEITD
LTGGTVFTTE ..LDLKPEQ CTIE LGSCD SITVTKEDTV IL GSGPKEA IQERIEQIKG
LTGGQVFSDE ...LSVKLEK ATIDQLGQAG TVTVTKEDTI FL GLGDKAA LGERCEQIRS
FAGARLVGEE GSHLELDAE FDPAILGTVK KATITKDDTV LL GGGESSM VKERVEILLRG
LTEAEYLAMD ...MSLLVE ATIDQLGIAR KVTISKDSTT LIADAASKDE LQARIAQLKK

401                                     470
QL.DVTTSEY EKEKL ERLA KLSDGVAVLK VGGTSDVEV EKKDRVTDAL ATRAAVEEG
QI.EDTTSEY EKEKLQERLA RLASGVALLR VGGSSSEVEV EKKDRV DAL ATRAAVEEG
EI.ERSTSDY EKEKL ERLA KLSKGVAVLK IGGGSEVEVG EKKDRVTDAL CATRAAVEEG
SIDITTT SY EKEKLQERLA KLSGGVAVIR VGGASEVEVG EKKDRYDDAL ATRAAVEEG
AIADTASEXR XXKAAXAPGQ ACRAASPXSR SAARPKVEVG XKKDRFVDAL ATRAAVEEG
LI.DGETSDY REKLQERLA KLSGGVAVIK VGGGSEVEV EKKDRITDAL CSTRAAVQEG
ELFE.TDSVY DSEKLAERIA KLSGGVAVIK VGAATETELE DRKLRIEDAK ATFAAIEEG

471                                     530
IVLGGGCALL RC...IPALD SLTPA EDQK IGIEIIKRTL KIPAMTIK AGVESSLIVE
IVPGGGTALL RC...IEKLE GVETT EDQK LGVEIVRRAL RMPGMTIAK AGVDGAMVVA
IVPGGGVALL RS...LTALK YKAA EDQK IGV IVKKAL TQPIATIVK AGLEPSSIID
ILPGGGTALV KAS...RVLD EVVVD FDQK LGVDIIRKAI TRPAKQIE AGEESVVIIG
IVPGGGTALL KST.XILGDL KATVA FDQQ LGVDLVRRAL QAPTRTIVD AGDSGSFVVG
IVPGGGVALL RASKALDSLL GDSSLTADQR TGVQIIR AV RLPA TIVL AGKEGAVVVE
IVPGGGAALV LSTVIPAIK E.TFEDADER LGADIVQKAL LSPAALIAQ AGVEGEVVVE

531                                     590
KIM.QSSS.. ...EVGYDAM AGDFV MVEK GIIDPTKVVR TALLDAGVA SLLTTAEVVV
KVE.HQAG.. ...DYGIDAL KGEYGLIEK GIIDPTKVVR TAITDASGA SLLTTAEAVV
EVTGHS.T.. ...SYGYDAL GKFVDMFEA GIIDPTKVVR TALQDASGA SLLATTECVV
KLIDE...YG DDFAKGYDAS KSEYTDMLAT GIIDPFKVVR SGLVDASGA SLLATTEVAI
KLLDQASVEG KTFITGYDAA GQYVDMIKA GIIDPLKVVR TALVDAGVA SLLTTSECMI
KVLE..... DVTVGIDAQ RDRYV MFEA GIIDPARVVR VAITDAVSVA SLMMTAEAAI
KIM.....FS D.WE GY AM TDTYE LFEA GVIDPAKVTR CALQ AASVA GMVLTTOAIV

591                                     622
TEIPKEEKDP G.MCAMGGMG GGMGGMGF~~ ~~
TEIPKEDGAP A.MPGMGGMG GGMGMGGMG MM
TEIPKEEAVG GPAGMGGMG GGMGMGGMG~~
VDAPEP...P AAAGAGCMPG GMPGMPGMM~~
VDAPKGD.AP AASPAAGMG GGMGMGGMG~~
VDLPKEETPA A..GGMGGMG GGMGMGDMY~~
VDKPKPKAPA AAAPEGLMV~ ~~~~~~

```

Figura 25: Comparação da Hsp60 de *B. emersonii* com Hsp60 de outros organismos. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* e de *Homo sapiens* (gi-129379), *Drosophila melanogaster* (gi-12644042), *Caenorhabditis elegans* (gi-1705795), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-6323288), *Tripanosoma cruzi* (gi-3023478) e *Arabidopsis thaliana* (gi-12644189). A comparação das seqüências foi feita através do programa Pile up.

Seqüências comparadas a Hsp60 de <i>B. emersonii</i>	Identidade(%)	Similaridade(%)
<i>N. crassa</i>	64,7	72,4
<i>P. brasiliensis</i>	64,7	72,2
<i>S. cerevisiae</i>	64,0	70,7
<i>S. pombe</i>	61,6	70,2
<i>C. elegans</i>	56,0	65,7
<i>R. norvegicus</i>	55,1	65,1
<i>H. sapiens</i>	54,9	65,0
<i>D. melanogaster</i>	55,8	64,7
<i>T. cruzi</i>	51,1	59,5
<i>A. thaliana</i>	42,1	53,9
<i>O. sativa</i>	43,2	52,4

Tabela 2: Porcentagens de similaridade e identidade entre a proteína Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* com as de *Neurospora crassa* (gi-16416029), *Paracoccidioides brasiliensis* (gi-6016259), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-6323288), *Schizosaccharomyces pombe* (gi-19113806), *Caenorhabditis elegans* (gi-1705795), *Rattus norvegicus* (gi-11560024), *Homo sapiens* (gi-129379), *Drosophila melanogaster* (gi-12644042), *Tripanosoma cruzi* (gi-3023478), *Arabidopsis thaliana* (gi-12644189) e *Oriza sativa* (gi-7248401). A análise foi feita utilizando o programa Gap.

Figura 26: Dendrograma comparando-se as seqüências de aminoácidos das Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* e *Homo sapiens* (gi-129379), *Rattus norvegicus* (gi-11560024), *Drosophila melanogaster* (gi-12644042), *Caenorhabditis elegans* (gi-1705795), *Ajellomyces capsulatus* (gi-101740), *Paracoccidioides brasiliensis* (gi-6016259), *Neurospora crassa* (gi-16416029), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-6323288), *Schizosaccharomyces pombe* (gi-19113806), *Tripanosoma cruzi* (gi-3023478), *Arabidopsis thaliana* (gi-12644189) e *Oriza sativa* (gi-7248401), feito pelo programa Pile up.

2.6. Análise do padrão de expressão do mRNA da Hsp60 durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e sob condições de estresse

Com o intuito de verificar se o gene *hsp60* de *B. emersonii* sofre regulação durante o processo de diferenciação, extraímos RNA total de células isoladas durante os vários estágios do desenvolvimento do fungo e foram realizados experimentos de "Northern blot" utilizando estes RNAs.

Os RNAs foram extraídos de células colhidas durante diferentes intervalos de tempo do ciclo, tanto a temperaturas normais como sob choque térmico ou na presença de cloreto de cádmio. Estes dados estão apresentados nas figuras 27, 28 e 29 e representados em valores relativos com base na densitometria das bandas na autorradiografia, analisadas pelo programa ImageMaster.

Como mostra a figura 27, a expressão da Hsp60 varia durante a germinação, tendo um padrão crescente nos níveis do mRNA para esta proteína durante o tempo do experimento. Por outro lado, quando células de 30 minutos de germinação são expostas a tempos crescentes de choque térmico a 38°C, há uma grande indução nos níveis do mRNA da Hsp60. Nos primeiros 30 minutos de exposição verifica-se um aumento de quase 5 vezes, quando comparados aos níveis das células mantidas a 27°C, atingindo níveis máximos de indução após 1 hora a 38°C (aproximadamente 8 vezes). A indução é transitória, visto que os níveis do mRNA diminuem quando o estresse permanece por mais tempo. Células de 60 minutos de germinação quando transferidas de 27°C para 38°C apresentam uma indução gradual do mRNA da Hsp60 sendo que após 30 minutos de choque térmico o nível do mRNA é quase o mesmo encontrado nas células de 30 minutos de germinação. Mas após uma hora de choque térmico os níveis não aumentam tanto quanto nas células de 30 minutos. Nas células incubadas com 100µM de CdCl₂ também ocorre indução do mRNA da Hsp60, sendo que nos primeiros 30 minutos observou-se um aumento de aproximadamente 2,5 vezes quando se compara com os níveis das células crescidas a 27°C, na ausência de cádmio. A indução é transitória e nas células de 60 minutos de germinação, a indução por CdCl₂ é aproximadamente 2 vezes maior quando comparado com os níveis nas células de 30 minutos de germinação expostas ao

cádmio por 30 minutos. Na permanência do estresse por mais 30 minutos, os níveis de mRNA da Hsp60 ficam praticamente inalterados.

Como mostra a figura 28, a expressão do mRNA da Hsp60 também varia durante a esporulação, apresentando um nível mais elevado nas células do tempo zero da esporulação que nas células dos tempos de 30 minutos. Os níveis voltam a crescer nas células de 60 até as células de 90 minutos de esporulação. Após esse ponto os níveis diminuem até ser praticamente não detectado o mRNA no zoósporo. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são submetidas a incubação a 38°C há um grande aumento nos níveis do mRNA da Hsp60 sendo que o máximo da indução ocorreu aos 60 minutos de choque térmico, com um aumento de um pouco mais de 3 vezes quando se compara com as células do tempo zero de esporulação incubadas a 27°C. Após 120 ou 150 minutos de exposição ao calor, os níveis do mRNA são menores, confirmando a transitoriedade da resposta.

Para comparar os níveis do mRNA da Hsp60 nas várias fases do ciclo de vida do fungo, foi feito o experimento mostrado na figura 29. Comparando-se os níveis máximos das duas fases, 90 minutos da esporulação com 120 minutos da germinação, verificou-se que a quantidade do mRNA da Hsp60 é aproximadamente 4 vezes maior na esporulação.

Figura 27: Análise dos níveis de mRNA da Hsp60 durante a germinação de *B. emersonii* a temperatura normal e sob choque térmico ou tratamento com CdCl_2 . **A-** RNA total (8 μg) extraído de células isoladas na germinação e início do crescimento de *B. emersonii* tratadas ou não com CdCl_2 ou choque térmico foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose. O RNA foi então transferido para uma membrana de náilon (Hybond N^+) e hibridizado com o cDNA da Hsp60 marcado radioativamente. A canaleta 1 corresponde ao zoósporo; as canaletas 2 a 4 correspondem às células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação; a canaleta 5 corresponde às células vegetativas de 120 minutos; as canaletas 6 a 8 correspondem às células de 30 minutos de germinação expostas a choque térmico (CT) de 38°C durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 9 e 10 correspondem às células de 60 minutos de germinação expostas a choque térmico de 38°C durante 30 e 60 minutos; as canaletas 11 a 13 correspondem às células de 30 minutos de germinação incubadas com $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (Cd) durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 14 e 15 correspondem às células de 60 minutos de germinação incubadas com $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 durante 30 e 60 minutos, respectivamente. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp60 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em A.

Figura 28: Análise dos níveis de mRNA da Hsp60 durante a esporulação de *B. emersonii* a temperatura normal e sob choque térmico. **A-** RNA total (8 µg) extraído de células sincronizadas na esporulação a temperatura normal e após choque térmico foi submetido à eletroforese em gel de formaldeído-agarose. Após eletroforese o RNA foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond N⁺) e hibridizado com o cDNA da Hsp60 marcado radioativamente. As canaletas 1 a 6 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90, 120 e 150 minutos da esporulação; a canaleta 7 corresponde ao zoósporo; as canaletas 8 a 11 correspondem às células do tempo zero de esporulação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 120 e 150 minutos. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp60 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em A.

Figura 29: Análise dos níveis de mRNA da Hsp60 durante o ciclo de vida de *B. emersonii*. **A-** RNA total (8 µg) extraído de células sincronizadas na germinação, início do crescimento e esporulação de *B. emersonii* foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose. Após transferência do RNA para uma membrana de náilon (Hybond N⁺) e hibridização com a sonda do cDNA da Hsp60 a membrana foi exposta a filme de raios-X. As canaletas 1 a 3 correspondem a RNA de células coletadas nos tempos 0, 60 e 120 minutos da esporulação; a canaleta 4 a RNA de zoósporo; as canaletas 5 a 7 a RNA de células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação e a canaleta 8 a RNA de células vegetativas de 120 minutos de crescimento a 27°C. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp60 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em A.

2.7. Níveis relativos da proteína Hsp60 durante o ciclo de vida de *B. emersonii*

A análise do acúmulo da proteína Hsp60 foi feita através de experimentos de “western blot” utilizando o anticorpo monoclonal anti-Hsp60 (Sigma). Extratos de proteínas totais foram preparados de células isoladas durante os vários estágios do ciclo de vida de *B. emersonii* (germinação, crescimento vegetativo e esporulação), tanto a temperaturas normais como sob choque térmico. Estes dados estão apresentados nas figuras 30, 31, 32 e 33.

Como mostra a figura 30, os níveis da Hsp60 sofrem uma pequena variação durante a germinação, apresentando níveis um pouco mais elevados nas células de 90 e 120 em relação aos níveis encontrados nas células de 30 e 60 minutos da germinação. Por outro lado, quando células de 30 minutos de germinação são expostas a tempos crescentes de choque térmico a 38°C, há um grande aumento na quantidade da Hsp60. Já nos primeiros 30 minutos de exposição a quantidade da Hsp60 é cerca de 2 vezes maior do que nas células mantidas a 27°C. Após uma hora de choque térmico os níveis continuam aumentando e após 90 minutos a 38°C os níveis passam a ser cerca de 5 vezes maiores quando comparados às células controle. Células de 60 minutos de germinação, quando transferidas de 27°C para 38°C, também apresentam níveis aumentados da Hsp60, aproximadamente 6,5 vezes maior nas células mantidas a 38°C por uma hora quando comparadas às mantidas a 27°C.

A figura 31 mostra que a quantidade da Hsp60 sofre uma certa variação durante crescimento vegetativo e que seus níveis não são tão baixos como os apresentados para a Hsp90. Quanto à resposta ao choque térmico, as células vegetativas de 4h30min de crescimento em meio DM-4 quando expostas a diferentes tempos de choque térmico a 38°C, apresentam acúmulo crescente da Hsp60, mas somente a partir de 90 minutos de exposição, sendo que após duas horas de choque térmico os níveis passam a ser cerca de 2 vezes maiores do que o das células mantidas a 27°C.

Durante a esporulação, como mostra a figura 32, os níveis da Hsp60 variam, decrescendo da célula do tempo zero para as células de 60 minutos da esporulação.

Após esse ponto, as células de 90 minutos apresentam níveis máximos da Hsp60 durante a esporulação e diminuem gradualmente até as células de 150 minutos e no zoósporo. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são submetidas a incubação a 38°C há um aumento gradual nos níveis da Hsp60, a partir de uma hora de exposição, atingindo, após 90 minutos de choque térmico, níveis aproximadamente 2,5 vezes maiores do que nas células de 2 horas de esporulação a 27°C.

Para comparar os níveis da Hsp60 durante as várias fases do ciclo de vida do fungo, foi feito o experimento mostrado na figura 33. Comparando-se os níveis máximos da proteína na esporulação (célula de 90 minutos após o carenciamento) com as células de 120 minutos da germinação, verificou-se que a quantidade da Hsp60 é aproximadamente 10% maior na esporulação.

Em resumo, as variações nos níveis de mRNA refletiram num aumento na quantidade da Hsp60, indicando que o controle da expressão deste gene seja pré-traducional, provavelmente devido a um aumento na transcrição do gene durante a fase de esporulação.

Figura 30: Níveis da proteína Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* durante a germinação e após o choque térmico **A-** Ensaio de "western blot" para analisar a presença da Hsp60 em extratos protéicos de *B. emersonii*. Proteínas totais de células de *B. emersonii* em diferentes pontos da germinação e início do crescimento a temperatura normal ou sob choque térmico a 38°C, foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi então incubada com um anticorpo monoclonal anti-Hsp60 obtido em camundongo (Sigma), seguindo-se incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 3 correspondem às células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação; a canaleta 4 corresponde às células vegetativas de 120 minutos; as canaletas 5 a 7 correspondem às células de 30 minutos de germinação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 8 e 9 correspondem às células de 60 minutos de germinação expostas a choque térmico a 38°C durante 30 e 60 minutos, respectivamente. **B-** Porcentagem relativa da Hsp60 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 31: Níveis da proteína Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* durante o crescimento vegetativo e após o choque térmico **A-** Ensaio de "western blot" para analisar a presença da Hsp60 em extratos protéicos de *B. emersonii*. Proteínas totais de células de *B. emersonii* em diferentes pontos do crescimento a temperatura normal e sob choque térmico a 38°C foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida 9% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-Hsp60 obtido em camundongo (Sigma) seguindo-se incubação com anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 4 correspondem às células vegetativas coletadas 4h30min, 5h, 5h30min e 6h após o inóculo dos zoósporos em meio definido (DM-4); as canaletas 5 a 8 correspondem às células vegetativas de 4h30min expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 90 e 120 minutos. **B-** Porcentagem relativa da Hsp60 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 32: Níveis da proteína Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* durante a esporulação e após o choque térmico. **A-** Ensaio de "western blot" para analisar a presença da Hsp60 em extratos protéicos de *B. emersonii*. Proteínas totais de células de *B. emersonii* em diferentes pontos da esporulação a temperatura normal e sob choque térmico a 38°C foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi incubada com um anticorpo monoclonal anti-Hsp60 obtido em camundongo (Sigma) seguindo-se incubação com anti IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 5 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 60, 90, 120 e 150 minutos da esporulação; a canaleta 6 corresponde ao zoósporo; as canaletas 7 a 10 correspondem às células do tempo zero de esporulação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 90 e 120 minutos. **B-** Porcentagem relativa da Hsp60 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

Figura 33: Variação dos níveis da proteína Hsp60 de *Blastocladiella emersonii* durante a esporulação e a germinação. **A-** Ensaio de "western blot" utilizando proteínas totais de *B. emersonii* de células de esporulação e de germinação a temperatura normal. Após eletroforese em gel de poliacrilamida 9% (SDS-PAGE) e transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose a membrana foi incubada com anticorpo monoclonal anti-Hsp60 obtido em camundongo (Sigma) seguindo-se incubação com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e revelação com NBT / BCIP em tampão para fosfatase alcalina. As canaletas 1 a 5 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos da esporulação; a canaleta 6 corresponde ao zoósporo; as canaletas 7 e 8 correspondem às células coletadas nos tempos 30 e 60 minutos da germinação; a canaleta 9 corresponde às células vegetativas de 120 minutos. **B-** Porcentagem relativa da Hsp60 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em A.

3. HSP10

3.1. Isolamento do cDNA da Hsp10 de uma biblioteca de choque térmico construída em pSPORT

Da mesma forma que para o cDNA da Hsp60, durante o seqüenciamento de clones de uma biblioteca cDNA com RNAs extraídos de células de 30 minutos de esporulação submetidas a 30 minutos de choque térmico a 38°C foram encontrados 21 clones que continham o cDNA completo da Hsp10. Com o seqüenciamento usando-se o primer universal T7 foi possível ler toda a seqüência do inserto correspondente ao cDNA da Hsp10, já que o cDNA completo compreende aproximadamente 400 pb (Figura 34).

3.2. O gene *hsp10* de *B. emersonii* está presente em cópia única

Para verificar se o gene *hsp10* de *B. emersonii* está presente em cópia única, foi feito "Southern blot" genômico, onde o DNA total de *B. emersonii* foi digerido com diferentes enzimas de restrição. A membrana foi hibridizada, em condições de alta e baixa estringências, com a sonda de 0,4 kb correspondente ao cDNA (clone HSR08-C04 digerido com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*) marcada radioativamente. O "Southern blot" apresentou somente uma banda demonstrando que *B. emersonii* provavelmente possui um único gene *hsp10* (Figura 35).

```

1 CTCACCCAACAACGGAAGTCTCGCCCTTGTCCACCAACATGTCTGCCGCCGCCAAGCGTA
                                     M S A A A K R I -
61 TCATCCCCCTGTTTCGACCGCGTCCTGGTCCAGCGCATCAAGCCCGCGGAGCGCACCGCCT
   I P L F D R V L V Q R I K P A E R T A S -
121 CGGGCCTGTTTCATCCCCGAGAAGGCGCAGCAGGCGCTCAACGAGGGCGTGGTCCTGGCCG
   G L F I P E K A Q Q A L N E G V V L A A -
181 CGGGCCCGGGCGCCATCACGGGCGAGGGCAAGACGCTGCCCATGTCGGTGGCCGCGGGCG
   G P G A I T G E G K T L P M S V A A G D -
241 ACCGCGTGCTGCTGCCCAGTACGGCGGCAACGCCGTCAAGATCGGCGACGAGGAGTTCA
   R V L L P E Y G G N A V K I G D E E F T -
301 CGCTGTTCCGCGACGCCGAGATCCTGGCCAAGCTCAACAACTAGGTTGGGTGACGTTGTG
   L F R D A E I L A K L N N *
361 TATACATCTCTTAATGAAAAGCTTTTTTTTTGTGTAAAAAAAAA 403

```

Figura 34: Sequência do clone HSR08-C04 de 403 pb correspondente ao cDNA da Hsp10 de *B. emersonii*. Este cDNA apresenta uma cauda poli A+ contendo 9 resíduos de adenina. Em negrito estão o códon da Metionina iniciadora e o códon de parada, a sequência sublinhada corresponde ao provável sinal de poliadenilação. Abaixo da sequência nucleotídica está apresentada a sequência deduzida de aminoácidos.

Figura 35 : Análise por "Southern blot" de DNA genômico de *B. emersonii* com a sonda da Hsp10. 5 µg de DNA total de *B. emersonii* foram digeridos com diferentes enzimas de restrição e o produto das digestões foi submetido a "Southern blot" utilizando-se o cDNA da Hsp10 marcado radioativamente como sonda. Canaleta 1 - marcador de peso molecular λ HindIII, canaleta 2-DNA digerido com *NotI*, 3 - *KpnI*, 4- *BamHI/EcoRI*, 5 - *BamHI*, 6 - *BamHI/HindIII*, 7 -*NcoI*, 8 - marcador de peso molecular Ladder 1kb (Gibco-BRL). **A**- Gel de agarose com o produto das digestões, corado com brometo de etídeo, antes da transferência do DNA para uma membrana de náilon. **B**- Autorradiograma da membrana de náilon após a hibridização com a sonda do cDNA da Hsp10.

3.3. Análise comparativa da seqüência de aminoácidos da Hsp10 de *B. emersonii* com as proteínas homólogas de outros organismos

O gene Hsp10 de *Blastocladiella emersonii* codifica para uma proteína que tem elevado grau de similaridade com a Hsp10 de outros organismos. Para uma análise comparativa, foi feito um alinhamento da seqüência de aminoácidos da Hsp10 de *B. emersonii* com a de outras Hsp10 de diferentes organismos e verificou-se que há uma alta homologia entre estas proteínas (Figura 36). A tabela 3 apresenta as porcentagens de similaridade e identidade entre a seqüência deduzida de aminoácidos da Hsp10 de *B. emersonii* e a Hsp10 de outros organismos; a maior identidade foi obtida com *Mortierella alpina* e *Schizosaccharomyces pombe*.

Para uma análise filogenética, as seqüências de aminoácidos da Hsp10 de diferentes organismos foram comparadas com a seqüência da Hsp10 de *B. emersonii*. A figura 37 mostra o dendrograma feito a partir das seqüências de aminoácidos da Hsp10 de diferentes organismos que foram comparadas com a Hsp10 de *B. emersonii*. Como podemos observar, a Hsp10 de *B. emersonii* agrupou-se com as Hsp10 de fungos como ocorrido para a Hsp60.


```

1
H.sapiens ~~~~~MAG QAFRKFLPLF DRVLVERSAA ETVTKGGIML PEKSQGKVLQ 50
C.elegans MFLTAVRRSS NVLKTFKPLY DRVLVERVAA ETKTKGGIML PEKSQGKVLE
D.melanogaster ~~~~~MA AAIKKIIPML DRILIQRAEA LTKTKGGIVL PEKAVGKVLQ
A.thaliana ~~~~~~MMKRLIPTF LRILVQRVIQ PAKTESGILL PEKS.SKLQS
B.emersonii ~~~~~~MS AAAKRIIPLF DRVLVQRIKP AERTASGLFI PEKAQQALQE
S.cerevisiae ~~~~~MSTLL KSAKSIVPLM DRVLVQRIKA QAKTASGLYL PEK.VEKLQ
L.donovani ~~~~MFRFTI PALKKLQPLG QRVLVQKRVQP AKQTKAGILI PEQVAAKV E

51
ATVVAVGSGS KGKG.GEIQP VSVKVGDKVL LPEYGGTKVV L..DDKDYFL FRDGDILGKY VD~
ATVVSAGAGL RMEK.GELVA LTVKPGDRVL LPEYGGTKVV V..EDKEYSI FRESDDLGVF E~~
GTVLAVGPGT RMASTGKHIP IGVKEGDRVL LPEFGGTKVV LEGDQKELFL FRESDILAKL E~~
GKVIAVGPGS RDK.DGKLIP VSVKEGDTVL LPEYGGTQVK L.GEN.EY L FRDEDVLGTL ED
GVVLAAGPGA ITG.EGKTLIP MSVAAGDRVL LPEYGGTAVK IG.DE.EFTL FRDAEILAKL E~~
AEVVAVGPGF TDA.NGKVV PQVKVGQVL IPQFGGSTIK LGDD.EVIL FRDAEILAKI AKD
GTVVAVAAGS KDWT..... PTVKVGDTVL LPEYGGSSVK VEGE..ELFL YDESVLLGV L SS~

```

Figura 36: Comparação da Hsp10 de *B. emersonii* com Hsp10 de outros organismos. Alinhamento da sequência de aminoácidos da Hsp10 de *Blastocladiella emersonii* e de *Homo sapiens* (gi-6996446), *Caenorhabditis elegans* (gi-15145424), *Drosophila melanogaster* (gi-17944559), *Arabidopsis thaliana* (gi-11990458), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-481802) e *Leishmania donovani* (gi-15021667). A comparação das seqüências foi feita através do programa Pile up.

Seqüências comparadas a Hsp10 de <i>B. emersonii</i>	Identidade(%)	Similaridade(%)
<i>M. alpina</i>	59,0	70,0
<i>S. pombe</i>	52,5	66,3
<i>S. cerevisiae</i>	51,5	65,3
<i>A. thaliana</i>	50,5	64,9
<i>D. melanogaster</i>	51,0	64,0
<i>O. sativa</i>	45,3	59,8
<i>H. sapiens</i>	42,6	54,4
<i>R. norvegicus</i>	42,6	54,4
<i>C. elegans</i>	40,0	53,0
<i>L. donovani</i>	42,7	51,0

Tabela 3: Porcentagens de similaridade e identidade entre a proteína Hsp10 de *Blastocladiella emersonii* com a de *Mortierella alpina* (gi-5921509), *Schizosaccharomyces pombe* (gi-19075598), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-481802), *Arabidopsis thaliana* (gi-11990458), *Drosophila melanogaster* (gi-17944559), *Oriza sativa* (gi-2267597), *Homo sapiens* (gi-6996446) *Rattus norvegicus* (gi-1778212), *Caenorhabditis elegans* (gi-15145424) e *Leishmania donovani* (gi-15021667). A análise foi feita utilizando o programa Gap.

Figura 37: Dendrograma comparando-se as seqüências de aminoácidos das Hsp10 de *Blastocladiella emersonii* e de *Homo sapiens* (gi-6996446), *Rattus norvegicus* (gi-1778212), *Caenorhabditis elegans* (gi-15145424), *Drosophila melanogaster* (gi-17944559), *Arabidopsis thaliana* (gi-11990458), *Oriza sativa* (gi-2267597), *Mortierella alpina* (gi-5921509), *Saccharomyces cerevisiae* (gi-481802), *Schizosaccharomyces pombe* (gi-19075598) e *Leishmania donovani* (gi-15021667) feito pelo programa Pile up.

3.4. Análise do padrão de expressão do mRNA da Hsp10 durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e sob condições de estresse

Com o intuito de verificar se o gene *hsp10* de *B. emersonii* sofre regulação durante o processo de diferenciação, extraímos RNA total de células isoladas durante os vários estágios de desenvolvimento do fungo e foram realizados experimentos de "Northern blot" utilizando estes RNAs.

A expressão do gene *hsp10* de *B. emersonii* foi analisada em experimentos de "Northern blot" utilizando RNAs totais de células isoladas durante a germinação e a esporulação. Os RNAs foram extraídos de células colhidas durante diferentes intervalos de tempo do ciclo, tanto a temperatura normal como sob choque térmico ou na presença de cloreto de cádmio. Estes dados estão apresentados nas figuras 38, 39 e 40 e representados em valores relativos com base na densitometria das bandas na autorradiografia analisadas pelo programa ImageMaster.

Como mostra a figura 38, a expressão da Hsp10 varia durante a germinação, os níveis do mRNA para esta proteína apresentam um padrão crescente durante o tempo do experimento. Por outro lado, quando células de 30 minutos de germinação são expostas a tempos crescentes de choque térmico a 38°C, há uma grande indução nos níveis do mRNA da Hsp10. Nos primeiros 30 minutos de exposição verifica-se um aumento de quase 20 vezes, quando comparados aos níveis nas células mantidas a 27°C. Os níveis máximos de indução são detectados após 1 hora a 38°C (aproximadamente 25 vezes mais). A indução é transitória, visto que os níveis do mRNA diminuem quando o estresse permanece por mais tempo. Células de 60 minutos de germinação quando transferidas de 27°C para 38°C também apresentam uma indução transitória do mRNA da Hsp10. Nas células incubadas com 100µM de CdCl₂ também ocorre indução do mRNA da Hsp10, sendo que nos primeiros 30 minutos observa-se um aumento de aproximadamente 7 vezes quando se compara com os níveis das células crescidas a 27°C na ausência de cádmio. A indução também é transitória e nas células de 60 minutos de germinação, a indução por CdCl₂ é aproximadamente 1,5 vezes maior quando se compara com os níveis nas células de 30 minutos de germinação, expostas ao cádmio por 30 minutos. Na

permanência do estresse por mais 30 minutos, os níveis de mRNA também começam a decrescer.

Como mostra a figura 39, a expressão do mRNA da Hsp10 varia pouco durante a esporulação, apresentando níveis praticamente iguais até as células de 60 minutos, sendo um pouco mais alto nas células de 90 minutos. Após esse ponto os níveis do mRNA diminuem até ser praticamente ausente no zoósporo. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são transferidas para 38°C, há um grande aumento nos níveis do mRNA da Hsp10, sendo que o máximo da indução ocorre aos 60 minutos de choque térmico, com um aumento de quase 4 vezes quando se compara com as células do tempo zero de esporulação incubadas a 27°C. Após 120 ou 150 minutos de exposição ao calor, os níveis do mRNA são menores, confirmando a transitoriedade da resposta.

Para comparar os níveis do mRNA da Hsp10 nas várias fases do ciclo de vida do fungo, foi feito o experimento mostrado na figura 40. Comparando-se os níveis máximos das duas fases, 90 minutos da esporulação com 120 minutos da germinação, verificou-se que a quantidade do mRNA da Hsp10 é quase 2 vezes maior na germinação.

Figura 38: Análise dos níveis de mRNA da Hsp10 durante a germinação de *B. emersonii* a temperatura normal e sob choque térmico ou tratamento com CdCl_2 . **A-** RNA total (8 μg) extraído de células isoladas na germinação e início do crescimento de *B. emersonii* tratadas ou não com CdCl_2 ou choque térmico foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose. O RNA foi então transferido para uma membrana de náilon (Hybond N^+) e hibridizado com o cDNA da Hsp10 marcado radioativamente. A canaleta 1 corresponde ao zoósporo; as canaletas 2 a 4 correspondem às células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação; a canaleta 5 corresponde às células vegetativas de 120 minutos; as canaletas 6 a 8 correspondem às células de 30 minutos de germinação expostas a choque térmico (CT) de 38°C durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 9 e 10 correspondem às células de 60 minutos de germinação expostas a choque térmico de 38°C durante 30 e 60 minutos; as canaletas 11 a 13 correspondem às células de 30 minutos de germinação incubadas com $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 (Cd) durante 30, 60 e 90 minutos; as canaletas 14 e 15 correspondem às células de 60 minutos de germinação incubadas com $100 \mu\text{M}$ de CdCl_2 durante 30 e 60 minutos, respectivamente. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp10 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em A.

Figura 39: Análise dos níveis de mRNA da Hsp10 durante a esporulação de *B. emersonii* a temperatura normal e sob choque térmico. **A-** RNA total (8 µg) extraído de células sincronizadas na esporulação a temperatura normal e após choque térmico foi submetido à eletroforese em gel de formaldeído-agarose. Após eletroforese o RNA foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond N⁺) e hibridizado com o cDNA da Hsp10 marcado radioativamente. As canaletas 1 a 6 correspondem às células coletadas nos tempos 0, 30, 60 e 90, 120 e 150 minutos da esporulação; a canaleta 7 corresponde ao zoósporo; as canaletas 8 a 11 correspondem às células do tempo zero de esporulação expostas a choque térmico (CT) a 38°C durante 30, 60, 120 e 150 minutos. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp10 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em A.

Figura 40: Análise dos níveis de mRNA da Hsp10 durante o ciclo de vida de *B. emersonii*. **A-** RNA total (8 µg) extraído de células sincronizadas na germinação, início do crescimento e esporulação de *B. emersonii* foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose. Após transferência do RNA para uma membrana de náilon (Hybond N⁺) e hibridização com a sonda do cDNA da Hsp10 a membrana foi exposta a filme de raios-X. As canaletas 1 a 3 correspondem a RNA de células coletadas nos tempos 0, 60 e 120 minutos da esporulação; a canaleta 4 a RNA de zoósporo; as canaletas 5 a 7 a RNA de células coletadas nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação e a canaleta 8 a RNA de células vegetativas de 120 minutos de crescimento a 27°C. **B-** Porcentagem relativa do mRNA da Hsp10 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em A.

DISCUSSÃO

O estudo básico de processos biológicos auxiliou a elucidar a existência e as funções das chaperones moleculares universalmente conservadas assim como das suas co-chaperones. Estas proteínas estão envolvidas na solução dos problemas intracelulares de enovelamento, oligomerização e tráfego protéicos, bem como em minimizar os danos causados às células durante estresses fisiológicos ou ainda, em restaurar a função de peptídeos inativados (Georgopoulos, 1992). Embora os estudos genéticos e bioquímicos indiquem que sistemas de chaperones exercem múltiplas funções intracelulares, ainda são necessárias muitas outras análises para estabelecer qual a extensão destas funções e as particularidades de cada sistema, como por exemplo: (i) se as proteínas expressas constitutivamente ou induzidas por estresses têm papéis especializados; (ii) detalhamento das vias para o enovelamento dos polipeptídeos; (iii) qual a função exata de cada co-chaperone; e (iv) qual a importância das chaperones para o desenvolvimento de determinados organismos, como os patógenos, que expressam elevados níveis de Hsps durante as infecções dos hospedeiros (revisado por Jindal, 1996). Assim, o estudo de diferentes sistemas biológicos torna-se de fundamental importância na busca destas respostas.

Este trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização do gene que codifica a chaperone molecular Hsp90, assim como a análise do padrão de expressão dos genes *hsp90*, *hsp60* e *hsp10* do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* durante o seu ciclo de vida e sob condições de estresse.

O estudo foi iniciado com a varredura de um banco de cDNA construído em nosso laboratório no vetor de expressão λ gt11. Para a análise do banco foi utilizado um anticorpo monoclonal anti-Hsp90 (Sigma). Da análise de fagos recombinantes, foram isolados 2 clones positivos (λ A31 e λ D22), cujos cDNAs continham 1,7 e 0,8 kb, respectivamente. O clone com o inserto maior (λ A31) foi escolhido para ser totalmente seqüenciado e verificou-se que ele codifica um polipeptídeo de 527 aminoácidos que corresponde a aproximadamente a 2/3 da proteína Hsp90, e apresentou similaridade com proteínas Hsp90 de outros organismos.

Após análise por "Southern blot" realizado com a sonda correspondente ao cDNA da Hsp90, verificamos que *B. emersonii* possui apenas um gene que codifica para essa proteína. Recentemente, com a análise de aproximadamente 2.700 clones da biblioteca de cDNA de choque térmico construída no vetor pSport, foi encontrado um único clone da Hsp90 de retículo endoplasmático (Grp94) que se mostrou diferente da Hsp90 estudada neste trabalho e, que provavelmente não é induzida sob choque térmico, já que nesta mesma biblioteca foram encontrados 55 clones do cDNA da Hsp90, descrita neste trabalho.

Para o isolamento do gene foi construída uma biblioteca genômica parcial, com fragmentos em torno de 3,5 a 4,5 kb digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Not*I. Quatro clones positivos idênticos foram isolados, que continham insertos de 4,0 kb. A análise da sequência de nucleotídeos mostrou que este fragmento *Not*I / *Bam*HI continha aproximadamente 0,9 kb de região 5' não codificadora, 2,4 kb de região codificadora, interrompida por um único íntron de 184 pb, e 0,6 kb de região 3' não codificadora do gene *hsp90*.

Experimentos de extensão com oligonucleotídeo e RACE-PCR para o gene *hsp90* de *B. emersonii* indicaram inícios de transcrição localizados a -65 e -70 nucleotídeos do códon ATG da metionina iniciadora, respectivamente, tanto com RNAs isolados de células crescendo a temperatura normal como sob choque térmico. Assim, consideramos que o gene *hsp90* apresenta um único início de transcrição que não muda durante o choque térmico.

A caracterização da região 5' não codificadora do gene *hsp90* foi feita através da busca de sequências consenso para a ligação dos fatores mais comuns de transcrição basal, já que a Hsp90 está envolvida em processos biológicos fundamentais para o desenvolvimento normal das células, bem como pela busca de sequências consenso para os elementos de choque térmico (HSE) onde se liga o fator de transcrição de choque térmico (HSF) e também de sequências consenso para o elemento responsivo a outros estresses (STRE). Não foi possível identificar, nesta região, nenhum consenso do tipo TATA-box. A região promotora do gene Hsp80 de *Neurospora crassa* além de não apresentar TATA-box também não possui sequências consenso de HSE (Girvitz *et al.*, 2000). Alguns genes de *B. emersonii*

que já foram seqüenciados e não possuem TATA-box apresentam múltiplos sítios de início de transcrição (Marques & Gomes, 1992; de Oliveira *et al.*, 1994, Rocha & Gomes, 1998) exceto o gene que codifica para a Calmodulina que apresentou um único sítio de início de transcrição a - 85 nt do ATG, mas também não apresenta TATA-box (Simão & Gomes, 2001). Já na região promotora do gene Hsp82 de levedura foram encontrados alguns elementos HSE e também um TATA-box (Farrelly & Finkelstein, 1984). Na região promotora do gene *hsp90* de *B. emersonii* foram encontrados 6 prováveis sítios "GC-box" para a ligação do fator de transcrição Sp1 (Stimulatory protein-1) e um provável sítio GAGA. A proteína GAGA está envolvida na transcrição de muitos genes de *Drosophila*, incluindo os genes *hsp70* e *hsp26* (O'Brien *et al.*, 1995). Quando começa haver transcrição na célula do zigoto de camundongo a ativação do gene *hsp70.1* também depende da interação dos fatores de transcrição GAGA e Sp1 (Bevilacqua *et al.*, 2000).

Quanto aos elementos específicos de estresse, na região promotora do gene *hsp90* de *B. emersonii* foi encontrado um motivo similar ao consenso eucariótico do HSE, com um arranjo de três seqüências "nGAAn" seguidas, onde possivelmente ocorre a ligação do fator de transcrição HSF, além de uma seqüência consenso para o elemento responsivo a estresse (STRE). Este resultado é diferente daquele observado para o gene *hsp70* de *B. emersonii*, onde as seqüências consenso para HSE encontradas estão dispersas e não formam um consenso perfeito para a ligação do HSF (Stefani & Gomes, 1995).

Em todos os organismos estudados, o choque térmico resulta na imediata ativação da transcrição dos genes de choque térmico e em muitos casos ocorre também a tradução preferencial das mensagens desses genes. O choque térmico também afeta o metabolismo do RNA, incluindo o processamento e a degradação do mRNA. A presença de íntrons não é comum em genes de choque térmico, porém no fungo dimórfico e patogênico *Histoplasma capsulatum* o gene *hsp82* possui três éxons e dois íntrons que são processados corretamente durante condições severas de choque térmico, diferentemente do que ocorre em *D. melanogaster* (Yost & Lindquist, 1986) e *S. cerevisiae* (Yost & Lindquist, 1991). O processamento correto dos mRNAs de *H. capsulatum*, incluindo o mRNA do gene da β -tubulina, sugere que

o processamento correto dos íntrons deve ser um fenômeno geral para este organismo (Minchiotti *et al.*, 1991).

Os sítios acceptor e doador de "splicing" no íntron do gene *hsp90* são muito similares àqueles presentes em outros genes de *B. emersonii* (ver tabela abaixo), incluindo o gene de choque térmico *hsp70*, de acordo com o consenso obtido de vários genes de *Blastocladiella emersonii*, apresentado em Fietto (2001). Há pouca probabilidade de que o "splicing" dos transcritos das Hsps sejam mais resistentes aos efeitos tóxicos do calor do que o "splicing" de outros transcritos.

íntron	extremidade 5'	sítio de ramificação (distância da extremidade 3')	extremidade 3'
Hsp90	A' gtatg	gctcac (22)	ctag 'C
Hsp70	G' gtacg	gctcac (26)	ctag 'C
consenso (Fietto, 2001)	5' GTACG	RCTNAC (14 a 26)	GTAG 3'

Pudemos verificar através de RACE-PCR, que nas células de *B. emersonii* do tempo zero de esporulação, submetidas a choque térmico a 38°C por 90 minutos, o íntron do mRNA da Hsp90 de *B. emersonii* foi corretamente processado. Em *B. emersonii*, o choque térmico a temperatura letal de 42°C provocou inibição parcial do processamento do íntron do gene *hsp70*, apenas 30% se encontrava na forma de transcrito primário (Stefani & Gomes, 1995). Já em levedura, a exposição das células a 41°C provoca mais de 70% de inibição do processamento do íntron do mRNA da actina, mas quando se induzia uma certa termotolerância na célula, o mRNA não-processado não acumulava (Yost & Lindquist, 1991). Também em *Drosophila* a passagem por uma temperatura intermediária protegia o processamento do mRNA da inibição por um subsequente choque térmico severo (Yost & Lindquist, 1986). A termotolerância não exerceu qualquer efeito protetor no processamento do mRNA da Hsp70 demonstrando que a maquinaria de processamento de mRNA em *Blastocladiella emersonii* é naturalmente bastante termorresistente (Stefani & Gomes, 1995).

O gene *hsp90* codifica para uma proteína de 710 resíduos, com massa molecular calculada de 80.792 Da e um pI médio de 4,85. A comparação da sequência de aminoácidos deduzida da sequência de nucleotídeos do gene *hsp90* com proteínas Hsp90 de outros organismos mostrou que a proteína de *B. emersonii* tem um elevado grau de similaridade com as Hsp90 descritas, sendo que as maiores porcentagens de identidade e similaridade foram encontradas com as Hsp90 de milho e de *Arabidopsis* (75,6% e 72,8% de identidade, respectivamente).

O dendrograma das Hsp90 que foi feito usando o programa PileUP do GCG (Figura 11) mostrou que a Hsp90 de *B. emersonii* agrupou-se com as Hsp90 das plantas e não dos fungos. Outras análises foram feitas utilizando-se o programa MEGA2 que utiliza diferentes algoritmos para a construção de dendrogramas (Russo *et al.*, 2001). Empregando-se o algoritmo "UPGMA", o dendrograma mostrou que a Hsp90 de *B. emersonii* também se agrupou com as Hsp90 das plantas, resultado sustentado por um valor de "Bootstrap" de 99%. Os outros fungos agruparam-se num outro clado igualmente confiável (99%). Entretanto, o dendrograma feito pelo algoritmo "Neighbor-Joining" mostrou que a Hsp90 de *B. emersonii* agrupou-se tanto com as Hsp90 de fungos como as de plantas, porém devido ao baixo valor de "Bootstrap" atribuído (54%), parece ser menos confiável.

As Hsp90 são proteínas altamente conservadas entre todos os organismos estudados e possui dois domínios: o domínio amino-terminal de ligação ao ATP, com 155 aas (do aa 27 a 182 em *B. emersonii*) e o domínio carboxi-terminal com 340 aas (do aa 371 a 710 em *B. emersonii*). Em *B. emersonii*, o domínio de ligação ao ATP, através do programa BLAST mostrou ter maior similaridade com as Hsp90 de fungos enquanto o domínio carboxi-terminal mostrou maior similaridade com as Hsp90 de plantas. Talvez essa diferença seja responsável pela diferença nos dendrogramas analisados.

O fungo aquático *B. emersonii* possui um interessante ciclo de vida que se caracteriza por dois processos de diferenciação celular bem definidos: a germinação e a esporulação. Assim, o padrão de expressão dos genes de choque térmico neste microorganismo pode nos fornecer pistas sobre o papel fisiológico das proteínas por eles codificadas.

Verificamos neste trabalho que a expressão do gene *hsp90* de *B. emersonii* varia durante a germinação, apresentando um máximo de expressão nesta fase, aos 120 minutos. Quando células de 30 minutos de germinação são expostas ao estresse térmico, há uma grande indução nos níveis do mRNA da Hsp90. Em células mantidas a 38°C por 30 minutos, os níveis aumentaram cerca de 160 vezes, enquanto em células incubadas 30 minutos com 100 μ M de CdCl₂ observou-se um aumento de aproximadamente 20 vezes nos níveis do mRNA da Hsp90.

A expressão do gene *hsp90* de *B. emersonii* apresentou também níveis variáveis durante a esporulação, sendo que o máximo de expressão nesta fase foi aos 90 minutos. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são mantidas a 38°C por uma hora, os níveis do mRNA da Hsp90 aumentam até 10 vezes quando se compara com as células do tempo zero de esporulação incubadas a 27°C. Comparando-se os níveis entre as várias fases do ciclo de vida do fungo, a quantidade do mRNA da Hsp90 é quase 2 vezes maior na esporulação.

Os níveis da proteína Hsp90 também foram analisados utilizando-se experimentos de "western blot" com o anticorpo monoclonal anti-Hsp90 (Sigma). Os níveis da Hsp90 durante a germinação são praticamente constantes, mas quando células de 30 minutos de germinação são expostas ao estresse térmico, há um grande aumento na quantidade da proteína principalmente após uma hora de choque térmico a 38°C, onde os níveis aumentaram cerca de 5 vezes. Como ocorre na germinação, também durante o crescimento vegetativo a quantidade da Hsp90 é praticamente constante. As células vegetativas de 4h30min de crescimento em meio DM-4 quando expostas a diferentes tempos de choque térmico a 38°C, apresentam acúmulo crescente da Hsp90 até duas horas de exposição, sendo que já nos primeiros 30 minutos de exposição há um acúmulo de cerca de 6 vezes mais proteína, passando a cerca de 200 vezes mais após duas horas a 38°C. Já na esporulação, os níveis da Hsp90 variam, atingindo níveis máximos nas células de 90 minutos de esporulação. Quando células do tempo zero de esporulação são submetidas a 38°C, há um aumento gradual nos níveis da Hsp90, chegando a ser aproximadamente 3 vezes maiores após duas horas de choque térmico quando

comparados a células de 2 horas de esporulação a 27°C. Comparando-se os níveis nas diferentes fases do ciclo de vida do fungo, verifica-se que a quantidade da Hsp90 é aproximadamente 3 vezes maior na esporulação.

Foi produzida uma proteína recombinante fHsp90-His, com o objetivo de obter anti-soro policlonal contra a proteína Hsp90 de *B. emersonii*. Os anticorpos policlonais obtidos em coelhos imunizados com a proteína de fusão reconheceram a Hsp90 de *B. emersonii* em títulos de até 1:2000, em ensaios de "western blot". Esses anticorpos foram utilizados em experimento de imunolocalização da Hsp90 de *B. emersonii* em zoósporos. Foi possível verificar que a Hsp90 de *B. emersonii* está distribuída por toda a célula sendo portanto citossólica. Esta localização difere da encontrada para as ATPases de *B. emersonii* BePAT1 e BePAT2 que estão somente na membrana plasmática dos zoósporos (Fietto et al., 2002). É possível que além da localização citoplasmática, a Hsp90 se encontre também próxima à membrana plasmática, já que foi verificado que a Hsp90 de mamíferos está associada a proteínas de citoesqueleto como actina (Koyasu et al., 1986) e tubulina (Sanchez et al., 1988).

Na tentativa de isolarmos o gene *hsp60* de *B. emersonii*, um fragmento de PCR foi obtido em reação de amplificação com DNA do fungo e oligonucleotídeos degenerados. Este fragmento de aproximadamente 0,7 kb foi seqüenciado, confirmando tratar-se de parte do gene *hsp60*. Paralelamente, em nosso laboratório, foi construída uma biblioteca de cDNA de choque térmico no vetor pSport. Após o seqüenciamento de um pouco mais de 1.300 clones, foi encontrado um cDNA da Hsp60, que estava completo apresentando 1873 pb.

Análise por "Southern blot" realizado com a sonda correspondente ao cDNA da Hsp60, indicou que *B. emersonii* possui apenas um gene codificando para essa proteína. Para o isolamento do gene *hsp60* tentamos construir diferentes bibliotecas genômicas parciais, com diferentes tamanhos de fragmentos e sítios para enzimas de restrição. Entretanto, não conseguimos isolar o clone genômico de interesse. Também tentamos construir bibliotecas genômicas parciais para a região 5' não codificadora da Hsp60, com o intuito de podermos compará-la com a da Hsp90, mas também não tivemos sucesso nessa estratégia.

Mesmo sem termos isolado a região promotora do gene *hsp60*, experimento de extensão com oligonucleotídeo para determinação da localização do início de transcrição do gene revelou um início único localizado entre -300 e -303 nucleotídeos do códon ATG da metionina iniciadora. O mesmo início de transcrição foi obtido quando se utilizou RNA de células submetidas a choque térmico.

O seqüenciamento do cDNA da Hsp60 indicou uma proteína de 559 resíduos, com massa molecular calculada de 58.741 Da e um pI médio de 8,7. A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de nucleotídeos do cDNA com proteínas Hsp60 de outros organismos mostrou que a proteína de *B. emersonii* tem um elevado grau de similaridade com as Hsp60 descritas e as maiores porcentagens de identidade e similaridade encontradas foram com as Hsp60 de *Neurospora crassa* e de *Paracoccideoides brasiliensis* (64,7% de identidade em ambos os casos).

A expressão do gene *hsp60* de *B. emersonii* varia durante a germinação, apresentando níveis crescentes de mRNA até os 120 minutos desta fase. Quando células de 30 minutos de germinação são expostas a choque térmico, observa-se uma grande indução nos níveis do mRNA da Hsp60; atingindo níveis máximos de indução após 1 hora a 38°C (aproximadamente 8 vezes). Já, estas mesmas células incubadas por 30 minutos com 100µM de CdCl₂ apresentaram um aumento de aproximadamente 2,5 vezes nos níveis do mRNA para Hsp60.

Durante a esporulação o mRNA da Hsp60 apresentou níveis variáveis. No tempo zero os níveis estão um pouco elevados, depois diminuem e voltam a aumentar sendo que o máximo de expressão nesta fase foi aos 90 minutos. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são mantidas a 38°C por uma hora, os níveis do mRNA da Hsp60 aumentam chegando a ser 3 vezes mais elevados do que nas células mantidas a 27°C. Comparando-se entre as fases do ciclo de vida do fungo, a quantidade do mRNA da Hsp60 é quase 4 vezes maior na esporulação do que na germinação.

Os níveis da proteína Hsp60 foram analisados em experimentos de "western blot", utilizando o anticorpo monoclonal anti-Hsp60 (Sigma) e extratos totais de proteína preparados a partir de células isoladas durante os vários estágios do ciclo de vida de *B. emersonii*. Os níveis da Hsp60 durante a germinação sofrem uma

pequena variação, apresentando níveis um pouco mais elevados nas células de 90 e 120 minutos em relação aos níveis encontrados nas células de 30 e 60 minutos de germinação. Mas quando células de 30 minutos de germinação são expostas ao estresse térmico, há um grande aumento gradual na quantidade da Hsp60 proporcional ao tempo de exposição, sendo o máximo após 90 minutos de choque térmico a 38°C, onde os níveis aumentaram cerca de 5 vezes em relação às células mantidas a 27°C. Durante o crescimento vegetativo a quantidade da Hsp60 também sofre uma pequena variação, mas seus níveis não são tão baixos como os da Hsp90. As células vegetativas de 4h30min de crescimento em meio DM-4 quando expostas a diferentes tempos de choque térmico a 38°C, apresentam acúmulo crescente da Hsp60 até duas horas de exposição, mas somente após 120 minutos de exposição há um acúmulo de cerca de 2 vezes mais proteína que nas células mantidas a 27°C. Já na esporulação, os níveis da Hsp60 nas células do tempo zero estão um pouco elevados, depois diminuem e voltam a aumentar sendo que o máximo de expressão nesta fase foi aos 90 minutos, comportamento similar ao do mRNA correspondente. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são mantidas a 38°C há um aumento gradual da Hsp60 atingindo níveis máximos após 90 minutos a 38°C, níveis 2,5 vezes maiores que nas células mantidas a 27°C. Comparando-se as diversas fases do ciclo de vida do fungo a quantidade da Hsp60 é aproximadamente 10% maior na esporulação.

Da biblioteca de cDNA de choque térmico construída no vetor pSport também foram isolados 21 clones do cDNA da Hsp10 (em 2.775 clones seqüenciados). Um deles (HSR08-C04), utilizado neste trabalho, continha o cDNA completo composto de 403 pb.

Análise por "Southern blot" realizado com a sonda correspondente ao cDNA da Hsp10, indicou que *B. emersonii* possui apenas um gene codificando essa proteína. Para o isolamento do gene *hsp10* tentamos construir diferentes bibliotecas genômicas parciais, utilizando diferentes fragmentos de enzimas de restrição, mas não conseguimos isolar o clone genômico de interesse. Também tentamos construir bibliotecas genômicas parciais para a região 5' não codificadora da Hsp10, com o

intuito de podermos compará-la com a da Hsp90, mas também não obtivemos sucesso.

Mesmo sem termos caracterizado a região promotora da Hsp10, tentamos fazer o experimento de extensão com oligonucleotídeo para o gene *hsp10*, mas tivemos a presença de muitos sinais e nenhum deles aumentava com o choque térmico.

O gene *hsp10* codifica uma proteína de 101 resíduos, com massa molecular calculada de 10.688 Da e um pI médio de 6,25. A comparação da seqüência de aminoácidos deduzida da seqüência de nucleotídeos do gene *hsp10* com proteínas Hsp10 de outros organismos mostrou que a Hsp10 de *B. emersonii* tem um elevado grau de similaridade com as Hsp10 descritas e as maiores porcentagens de identidade e similaridade encontradas foram com as Hsp10 dos fungos *Mortierella alpina* e de *Schizosaccharomyces. pombe* (70,0% e 66,3 % de identidade, respectivamente).

A expressão do gene *hsp10* de *B. emersonii* varia durante a germinação, o mRNA apresentando níveis crescentes até os 120 minutos desta fase. Quando células de 30 minutos de germinação são expostas a choque térmico, há uma grande indução nos níveis do mRNA da Hsp10. Já nos primeiros 30 minutos a 38°C os níveis aumentam aproximadamente 20 vezes. Estas mesmas células incubadas 30 minutos com 100µM de CdCl₂ apresentaram um aumento de aproximadamente 7 vezes do mRNA para Hsp10, em relação ao controle mantido a 27°C sem CdCl₂.

Durante a esporulação a expressão da Hsp10 varia pouco, apresentando níveis praticamente iguais até as células de 60 minutos, sendo um pouco mais alto nas células de 90 minutos. Quanto à resposta ao choque térmico, quando células do tempo zero da esporulação são mantidas a 38°C por uma hora, os níveis do mRNA da Hsp10 aumentam quase 4 vezes quando se compara com as células do tempo zero de esporulação a 27°C. Comparando-se entre as fases do ciclo de vida do fungo, a quantidade do mRNA da Hsp10 é quase 2 vezes maior na germinação, diferentemente do que verificamos para os mRNAs da Hsp90 e Hsp60 que mostraram-se maiores na esporulação.

Com a finalidade de obter anti-soro policlonal contra a Hsp10 de *B. emersonii*, clonamos o cDNA da Hsp10 no vetor de expressão pPROEX-HT. A proteína recombinante de fusão com aproximadamente 10 kDa foi bastante expressa em *E.coli*, entretanto tivemos muita dificuldade em purificá-la e não obtivemos massa suficiente para a imunização de coelhos. Devido a esse problema não pudemos analisar o padrão da proteína Hsp10 durante o ciclo de vida de *B. emersonii*.

Em conclusão, a análise da expressão dos genes *hsp90*, *hsp60* e *hsp10* através de ensaios de "Northern blot" demonstrou que esses genes são diferencialmente expressos durante o ciclo de vida de *B. emersonii*. Os genes *hsp90* e *hsp60* são mais expressos na esporulação enquanto o gene *hsp10* é mais expresso no final da germinação. As proteínas Hsp90 e Hsp60 estão presentes durante todo o ciclo de vida do fungo, apresentando variações nos seus níveis que acompanham as variações de seus respectivos mRNAs, indicando que o controle da expressão desses genes ocorra em nível transcricional. O aumento da expressão dos genes *hsp90* e *hsp60* na esporulação sugere um papel para as proteínas correspondentes neste processo. Como não pudemos analisar os níveis da proteína Hsp10 durante o ciclo de vida do fungo, não podemos afirmar em que fase ela teria um papel mais importante.

A resposta ao choque térmico produz um aumento maior nos níveis dos mRNAs dos três genes do que a presença de cloreto de cádmio. A permanência do estresse por um período prolongado confirma a transitoriedade da resposta, já que os níveis dos mRNAs passam a diminuir.

A análise da região promotora do gene *hsp90* revelou uma seqüência bastante próxima do consenso para a ligação do fator de transcrição de choque térmico (elemento HSE). Este consenso não havia sido encontrado no gene *hsp70* de *B. emersonii* (Stefani & Gomes, 1995). As regiões promotoras dos genes *hsp60* e *hsp10* ainda não foram caracterizadas, entretanto a análise destas regiões poderia nos

fornecer informações adicionais sobre o controle transcricional destes genes durante o choque térmico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. & Lipman, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-402, 1997.
- Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**: 223-30, 1973.
- Amin, J., Ananthan, J. & Voellmy, R. Key features of heat shock regulatory elements. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 3761-9, 1988.
- Bardwell, J. C. & Craig, E. A. Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5177-81, 1987.
- Bardwell, J. C. & Craig, E. A. Ancient heat shock gene is dispensable. *J. Bacteriol.* **170**: 2977-83, 1988.
- Beckman, R. P., Mizzen, L. A. & Welch, W. J. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science* **248**: 850-4, 1990.
- Beissinger, M. & Buchner, J. How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* **379**: 245-59, 1998.
- Bevilacqua, A., Firenza, M. T. & Mangia, F. A developmentally regulated GAGA box-binding factor and Sp1 are required for transcription of the *hsp70.1* gene at the onset of mouse zygotic genome activation. *Development* **127**: 1541-51, 2000.
- Bonato, M. C. M., Silva A. M., Gomes, S. L., da Costa Maia, J. C. & Juliani, M. H. Differential expression of the heat-shock proteins and spontaneous synthesis of Hsp70 during the life cycle of *Blastocladiella emersonii*. *Eur. J. Biochem.* **163**: 211-20, 1987.
- Booner, J. J., Ballou, C. & Fackenthal, D. L. Interactions between DNA-bound trimers of the yeast heat shock factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 501-8, 1994.
- Borkovich, K. A., Farrelly, F. W., Finkelstein, D. B., Taulien, J. & Lindquist, S. Hsp82

- is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol. Cell. Biol.* **9**: 3919-30, 1989.
- Bukau, B. & Horwick, A. L. The Hsp70 and Hsp60 chaperones machines. *Cell* **92**: 351-66, 1998.
- Cantino, E. C. Metabolism and morphogenesis in a new *Blastocladiella*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **17**: 325-362, 1951.
- Chataway, T. K. & Barritt, G. J. Purification of histidine-tagged *ras* and its use in the detection of *ras* binding proteins. *Mol. Cell. Biochem.* **144**:167-73, 1995.
- Clark, C. G. & Roger, A. J. Direct evidence for secondary loss of mitochondria in *Entamoeba histolytica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6518-21, 1995.
- Correa, J. U., Lemos, E. M. & Lodi, W. R. Inhibition of sporulation in the water mold *Blastocladiella emersonii* by antipain. *Dev. Biol.* **66**: 470-9, 1978.
- Cutforth, T. & Rubin, G. M. Mutations in Hsp83 and *cdc37* impair signaling by the sevenless receptor tyrosine kinase in *Drosophila*. *Cell* **77**: 1027-36, 1994.
- Ellis, J. Proteins as molecular chaperones. *Nature* **328**: 378-9, 1987.
- Erkine, A. M., Adams, C. C., Gao, M. & Gross D. S. Multiple protein-DNA interactions over the yeast HSC82 heat shock gene promoter. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1822-9, 1995.
- Farrelly, F. & Finkelstein, D. Complete sequence of the heat-inducible HSP90 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **259**: 5745-51, 1984.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**: 6-13, 1983.
- Fenton, W. A. & Horwick, A. L. GroEL-mediated protein folding. *Protein Sci.* **6**: 743-60, 1997.
- Fernandes, M., Xiao, H. & Lis, J.T. Fine structure analyses of the *Drosophila* and *Saccharomyces* heat shock factor-heat shock element interactions. *Nucleic Acids Res.* **22**: 167-73, 1994

- Fietto, L. G., *In*: Caracterização e expressão de dois genes codificando ATPases do tipo P em *Blastocladiella emersonii*. Tese de doutorado apresentada ao Depto de Bioquímica - IQ/USP, 2001.
- Fietto, L. G., Pugliese, L. & Gomes, S. L. Characterization and expression of two genes encoding isoforms of a putative Na, K-ATPase in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1576**: 59-69, 2002.
- Frydman, J. & Hartl, F. U. Molecular chaperone functions of hsp70 e hsp60 in protein folding. *In*: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, Morimoto, R. I., Tissières, A. and Georgeopoulos, C. eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 251-283, 1994.
- Gallo, G. J., Prentice, H. & Kingston, R. E. Heat shock factor is required for growth at normal temperatures in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 749-61, 1993.
- Georgopoulos, C. The emergence of the chaperone machines. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 295-9, 1992.
- Gething, M. J. & Sambrook, J. Protein folding in the cell. *Nature* **355**: 33-45, 1992.
- Girvitz, T. L., Ouimet, P. M. & Kapoor, M. Heat shock protein 80 of *Neurospora crassa*: Sequence analysis of the gene and expression during the asexual phase. *Can. J. Microbiol.* **46**: 981-91, 2000.
- Gomes, S. L., Mennucci, L. & da Costa Maia, J. C. Adenylate cyclase activity and cyclic AMP metabolism during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **541**: 190-8, 1978.
- Harrison, C. J., Bohm, A. A. & Nelson, H. C. Crystal structure of the DNA binding domain of the heat shock transcription factor. *Science* **263**: 224-7, 1994.
- Hemmingsen, S. M. & Ellis, R. J. Purification and properties of ribulose biphosphate carboxylase large subunit binding protein. *Plant. Physiol.* **80**: 269-76, 1986.
- Hightower, L. E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell* **66**: 191-7, 1991.

- Hoj, A. & Jakobsen, B. K. A short element required for turning off heat shock transcription factor: evidence that phosphorylation enhances deactivation. *EMBO J.* **13**: 2617-24, 1994.
- Holmberg, C. I., Hietakangas, V., Mikhailov, A., Rantanen, J. O., Kallio, M., Meinander, A., Hellman, J., Morrice, N., MacKintosh, C., Morimoto, R. I., Eriksson, J. E. & Sistonen, L. Phosphorylation of serine 230 promotes inducible transcriptional activity of heat shock factor 1. *EMBO J.* **20**: 3800-10, 2001.
- Jakobsen, B. K. & Pelham, H. R. B. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA in vivo. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 5040-2, 1988.
- Jaworski, A. J. & Thomson, K. A temporal analysis of the synthesis of the mRNA sequestered in zoospores of *Blastocladiella emersonii*. *Dev. Biol.* **75**: 343-57, 1980.
- Jindal, S. Heat shock proteins: applications in health and disease. *Trends Biotechnol.* **14**: 17-20, 1996.
- Juliani, M. H. & da Costa Maia, J. C. Cyclic AMP-dependent and -independent protein kinases of the water mold, *Blastocladiella emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **567**: 347-56, 1979.
- Koyasu, S., Nishida, E., Kadowaki, T., Matsuzaki, F., Iida, K., Harada, F., Kasuga, M., Sakai, H. & Yahara, I. Two mammalian heat shock proteins, HSP90 and HSP100, are actin-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 8054-8, 1986.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **226**: 680-5, 1970.
- Lindquist, S. & Craig, E.A. The heat shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **22**: 631-77, 1988.
- Liu, X. D. & Thiele, D. J. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. *Genes Dev.* **10**: 592-603, 1996
- Lovett, J. S. Growth and differentiation of the water mold *Blastocladiella emersonii*: cytodifferentiation and the role of ribonucleic acid and protein synthesis. *Bacteriol. Rev.* **39**: 345-404, 1975.

- Maia, J. C. & Camargo, E. P. c-AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ.* **3**: 147-55, 1974.
- Mandel, M. & Higa, A. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159, 1970.
- Marques, M. V. & Gomes, S. L. Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*. *J. Biol. Chem.* **267**: 17201-7, 1992.
- Marques, M. do V., Borges, A. C., de Oliveira, J. C. & Gomes, S. L. Coordinate pretranslational control of cAMP-dependent protein kinase subunit expression during development in the water mold *Blastocladiella emersonii*. *Dev. Biol.* **149**: 432-9, 1992.
- Marshak, D. R., Kadonaga, J. T., Burgess, R., Knuth, M. W., Brennan Jr, W. A. & Lin, S. *Strategies for protein Purification and Characterization. A Laboratory Course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- McMullin, T. W. & Halberg, R. L. A normal mitochondrial protein is selectively synthesized and accumulated during heat shock in *Tetrahymena thermophila*. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 4414-23, 1987.
- Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K. & Yahara, I. Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-kDa heat shock protein, HSP90. *J. Biol. Chem.* **266**: 10099-103, 1991.
- Minami, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Yahara I. The calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.* **268**: 9604-10, 1993.
- Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K. & Yahara, I. The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1459-64, 1994.
- Minchiotti, G., Gargano, S. & Maresca, B. The intron-containing hsp82 gene of the dimorphic pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* is properly spliced in severe heat shock conditions. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 5624-30, 1991.

- Morano, K. A., Liu, P. C. & Thiele, D. J. Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 197-203, 1998.
- Morimoto, R. I., Jurivich, D. A., Kroeger, P. A., Mathur, S. K., Murphy, S. P., Nakai, A., Sarge, K., Abravaya, K. & Sistonen, L. T. Regulation of heat shock gene transcription by a family of heat shock factors. *In: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, Morimoto, R. I., Tissières, A. and Georgeopoulos, C. eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 417-455, 1994.
- Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. & Sugino, Y. A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6169, 1990.
- de Oliveira, J. C., Borges, A. C., Marques, M. V. & Gomes, S. L. Cloning and characterization of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eur. J. Biochem.* **219**: 555-62, 1994.
- O'Brien, T., Wilkins, R. C., Giardina, C. & Lis, J.T. Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes in vivo. *Genes Dev.* **9**:1098-110, 1995.
- Pelham, H. R. B. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose-regulated proteins. *Cell* **46**: 959-61, 1986.
- Pratt, W. B. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* **268**: 21445-8, 1993
- Prodromou, C., Roe, S. M., O'Brien, R., Ladbury, J. E., Piper, P. W. & Pearl, L. H. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**: 65-75, 1997.
- Queitsch, C., Sangster, T. A. & Lindquist, S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* **417**: 618-24, 2002.
- Rabindran, S. K., Haroun, R. I., Clos, J., Wisniewski, J. & Wu, C. Regulation of heat shock factor trimer formation: role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**: 230-4, 1993.

- Richter, K & Buchner, J. Hsp90: Chaperoning signal transduction. *J. Cell. Physiol.* **188**: 281-90, 2001.
- Rocha, C. R. & Gomes, S. L. Isolation, characterization and expression of the gene encoding the beta subunit of the mitochondrial processing peptidase from *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.* **180**: 3967-72, 1998.
- Russo, C. A. M., Miyaki, C. Y. & Pereira, S. L. Reconstrução filogenética: Métodos geométricos. *In: Biologia Molecular e Evolução*, Sérgio Russo Matioli ed. (Holos Editora), pp 108-129, 2001.
- Rutherford, S. L. & Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396**: 336-42, 1998.
- Sadis, S., Hickey, E. & Weber, L. A. Effect of heat shock on RNA metabolism in HeLa cells. *J. Cell. Physiol.* **135**: 377-86, 1988.
- Saltsman, K. A., Prentice, H. L. & Kingston, R. E. Mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* heat shock factor that differentially affect responses to heat and cadmium stress. *Mol. Gen. Genet.* **261**: 161-9, 1999.
- Sanchez, E. R., Redmond, T., Scherrer, L. C., Bresnick, E. H., Welsh, M. J. & Pratt, W. B. Evidence that the 90-kilodalton heat shock protein is associated with tubulin-containing complexes in L cell cytosol and in intact PtK cells. *Mol. Endocrinol.* **2**(8):756-60, 1988.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-7, 1977.
- Santoro, N., Johansson, N. & Thiele, D.J. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 6340-52, 1998.
- Shyy, T. T., Subjeck, J. R., Heinaman, R. & Anderson, G. Effect of growth state and heat shock in nucleolar localization of the 110,000 Da heat shock protein in mouse embryo fibroblasts. *Cancer Res.* **46**: 4738-45, 1986.

- Silva A. M., da Costa Maia, J. C. & Juliani, M. H. Developmental changes in translatable RNA species and protein synthesis during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ.* **18**: 263-74, 1986.
- Silva A. M., Juliani, M. H. da Costa Maia, J. C. & Bonato, M. C. M. Acquisition of thermotolerance during development of *Blastocladiella emersonii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **144**: 491-8, 1987.
- Silverman, P. M. Regulation of guanylate cyclase activity during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**: 381-8, 1976.
- Simão, R. C. & Gomes, S. L. Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.* **183**: 2280-8, 2001.
- Soll, D. R. & Sonneborn, D. R. Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*: cell differentiation without protein synthesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **68**: 459-63, 1971.
- Sorger, P. K. & Pelham, H. R. B. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* **8**: 855-64, 1988.
- Stefani, R. M. P. & Gomes, S. L. A unique intron-containing *hsp70* gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Gene* **152**: 19-26, 1995.
- Subject, J. R., Shyy, T. T., Shenand, J. & Johnson, R. Association between the mammalian 110,000 dalton heat shock protein and nucleoli. *J. Cell Biol.* **97**: 1389-95, 1983.
- Tachibana, T., Astumi, S., Shioda, R., Ueno, M., Uritani, M. & Ushimaru, T. A novel non-conventional heat shock element regulates expression of *MDJ1* encoding a DnaJ homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**: 22140-6, 2002.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4, 1979.

- Vale, M. R. & Maia J. C. Changes in cGMP phosphodiesterase levels during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *FEBS Lett.* **70**: 205-8, 1976.
- Van der Auwera, G. & De Wachter, R. Large-subunit rRNA sequence of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, and implications for the evolution of zoosporic fungi. *J. Mol. Evol.* **43**: 476-83, 1996
- Westood, J. T., Clos, J. & Wu, C. Stress-induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat-shock factor. *Nature* **353**: 822-27, 1991.
- Wu, C. The heat shock factors: structure and regulation. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**: 441-69, 1995.
- Yamamoto, K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu. Rev. Genet.* **19**: 209-252, 1985.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Mesing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-19, 1985.
- Yost, H. J. & Lindquist, S. RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell* **45**: 185-93, 1986.
- Yost, H. J. & Lindquist, S. RNA metabolism: strategies for regulation in the heat shock response. *Trends Genet.* **6**: 223-7, 1990.
- Yost, H. J. & Lindquist, S. Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 1062-8, 1991.
- Young, R. A. & Davis, R. W. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 1194-8, 1983.