UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Análise da expressão gênica em resposta ao choque térmico e cádmio no fungo aquático *Blastocladiella emersonii*

Raphaela de Castro Georg

Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo

16/10/2006

Aos meus pais, Eleusa e Lauro.

Por todo apoio, carinho e dedicação, mesmo à distância.

Por serem os melhores pais do mundo.

Ao querido Remo, companheiro de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

- A Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, por ter me recebido em seu laboratório como aluna de doutorado, pela oportunidade de poder trabalhar com uma pesquisadora competente e exemplo de dedicação à ciência.
- Aos meus amados irmãos Racquel, Herbert, Reinvald e Rowena, por terem me proporcionado uma infância e juventude maravilhosa, pelo apoio incondicional durante toda a minha vida. Por serem exatamente o que são, os melhores irmãos do mundo.
- Ao meu marido Remo Trigoni Júnior, por aceitar o desafio de construir uma vida conjunta. Pela oportunidade única de estar sempre aprendendo ao seu lado.
- Aos meus sogros, Remo Trigoni e Zélia Fraga, por serem minha família em São Paulo.
- A Luciana Pugliese, meu muito, muito, muito obrigado pela acolhida e ajuda quando iniciei a pesquisa no laboratório, pela ajuda imprescindível em diversos momentos, pela grande e querida amiga que se tornou.
- A Karina F. Ribichich, a melhor argentina que conheci. Uma grande amiga e colaboradora de pesquisa, além de um ser humano incrível. Ah, se todos fossem iguais a você!
- A Sandra M. S. Fernandes, pela grande amizade, pelos churrascos, pela companhia nos almoços no bandeijão e não poderia deixar de agradecer pelos litros e litros de DM4 feitos.
- Aos indefenestráveis Fábio Siviero e Guilherme Marson, queridos amigos com os quais eu tive o prazer de conviver no Instituto de Química.
- A Luci D. Navarro, pela eficiência, dicas e receitas culinárias, além da ajuda na construção de uma das bibliotecas de cDNA.
- Ao José Humberto Tambor, pela agradável companhia nos congressos, pelo grande amigo e pela pessoa maravilhosa que é.
- A Tie Koide e Ricardo Vêncio pela ajuda imprescindível nas análises de microarranjos de DNA. Em especial a Tie Koide, pela agradável companhia nos congressos e por toda a sua serenidade.
- Ao Prof. Dr. Bayardo Torres, pela oportunidade de ensinar, por todos os seus valiosos conselhos e pelo exemplo de dedicação a pesquisa e docência.
- Aos colegas que fizeram ou fazem parte do laboratório, tornando-o um lugar agradável e prazeroso de se trabalhar, Antônio Carlos, Rita Simão, Humberto Perez, Cristina Martinez, Silvia Izacc, Michelle Susin, Regina Baldini, Rogério Lourenço e André Vieira.
- Aos bioinformatas Apuã Paquola, Milton Nishyiama, Adriano Freitas e Leonardo Varuza, pela ajuda imprescindível nas análises e na utilização dos programas de processamento de dados.

- Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Emiliano, Milton e Cibele, pela eficiência e por estarem sempre dispostos a ajudar.
- Aos colegas do CRUSP, Fran (*in memoriam*), Clarissa, João e Fernando.
- A Ivone Pereira, pela sua dedicação ao trabalho e pelo seu constante bom humor.
- As funcionárias do CAGE, Adriana e Denise, pela disposição em ajudar.
- Ao CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS ____ i
ABREVIATURAS ____ iv
RESUMO ____ vi
ABSTRACT ____ viii

I – INTRODUÇÃO

1 – Análise da expressão gênica em larga escala ____ 1
2 – Resposta a estresses ambientais ____ 4
2.1 – Choque térmico ____ 4
2.2 – Cádmio ____ 7
2.3 – Regulação da resposta a choque térmico e a cádmio ____ 9
3 – Expressão diferencial de genes de choque térmico durante o desenvolvimento ____ 10
4 – O modelo de estudo: *Blastocladiella emersonii* ____ 10
4.1 – Resposta ao choque térmico e ao cádmio em *Blastocladiella emersonii* ____ 13

II – OBJETIVOS

1 – Objetivo geral ____ 15
2 – Objetivos específicos ____ 15

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Cultivo de *B. emersonii* ____ 16
2 – Linhagens e plasmídeos ____ 16
3 – Enzimas de restrição e demais reagentes ____ 16
4 – Oligonucleotídeos ____ 16
5 – Meios de cultura ____ 17
6 – Condições de cultivo sincronizado de *B. emersonii* para preparação de RNA total ou extração de proteínas totais ____ 17
7 – Construção de bibliotecas de cDNA a partir de células submetidas a estresses ____ 18
7.1 – Extração de RNA total e isolamento de mRNA de culturas de *B. emersonii* ____ 18
7.2 – Construção das bibliotecas de cDNA ____ 19
7.3 – Crescimento dos clones das bibliotecas de cDNA e preparação dos plasmídeos ____ 19
8 – Análise das seqüências isoladas ____ 20
8.1 – Seqüenciamento dos cDNAs ____ 20
8.2 – Processamento das seqüências ____ 20
8.3 – Anotação das seqüências ____ 22
9 – Preparo de células competentes para transformação por eletroporação ____ 22
10 – Transformação de *E. coli* ____ 23
11 – Microarranjos de DNA ____ 23
11.1 – Montagem dos micro-arranjos de DNA ____ 23
11.2 – Ensaios para avaliar a influência do choque térmico e cádmio nos fenótipos de *B. emersonii* nas fases de germinação e esporulação ____ 24
11.3 – Síntese dos cDNAs e marcação com fluoróforos ____ 24
11.4 – Hibridização nos microarranjos ____ 25
11.5 – Quantificação dos sinais de fluorescência ____ 25

12 – Análise dos dados dos microarranjos de DNA 25
12.1 – Normalização dos dados 25
12.2 – Determinação dos genes diferencialmente expressos 26
13 – Determinação das categorias funcionais altamente representadas 26
14 – RT-PCR quantitativo em tempo real 27
15 – Extração de DNA de *B. emersonii* 28
16 – *Southern blot* genômico 29
17 – Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e *Northern blot* 30
18 – Preparação de sonda radioativa 30
19 – Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose 31
20 – Indução, purificação e quantificação de proteínas recombinantes 31
20.1 – Solubilização de proteínas em corpos de inclusão 32
20.2 – Dosagem de proteínas por Bradford 32
21 – Produção de anticorpos policlonais 32
22 – Extrato de proteínas 33
23 – *SDS-PAGE* e *Western blot* 34
24 – Identificação de novos genes putativos da família Hsp70 em *B. emersonii* 34
25 – Identificação de proteínas putativas da família Hsp70 em outros genomas de fungos e comparação de seqüências das Hsp70 de *B. emersonii* 35
26 – Análise filogenética 36
27 – Identificação de seqüências intrônicas 36

IV – RESULTADOS

1 – Bibliotecas de cDNA de *B. emersonii* submetida a estresses 37
1.1 – Construção, seqüenciamento e processamento das bibliotecas de cDNA de estresse 37
1.2 – Anotação putativa dos *unigenes* 44
1.3 – Chaperones moleculares de *B. emersonii* 46
2 – Análise global da expressão gênica sob condições de estresse usando microarranjos de DNA 50
2.1 – Seleção dos clones e construção dos microarranjos de DNA 50
2.2 – Hibridizações competitivas 53
2.3 – Normalização dos dados e determinação dos genes diferencialmente expressos 54
2.4 – Análise do fenótipo das células de *B. emersonii* submetidas a estresses 58
2.4.1 – Choque térmico 58
2.4.2 – Cádmio 60
2.5 – Análise dos genes diferencialmente expressos em resposta ao choque térmico em *B. emersonii* 65
2.5.1 – Enovelamento de proteínas e proteólise 70
2.5.2 – Proteínas com propriedades antioxidantes 70
2.5.3 – Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos 71
2.5.4 – Categorias do GO mais representadas entre os genes induzidos em resposta ao choque térmico na germinação e esporulação 71
2.5.5 – Genes induzidos tanto na esporulação como na germinação e genes específicos da resposta ao choque térmico 71
2.5.6 – Genes reprimidos durante o choque térmico 73
2.6 – Análise dos genes diferencialmente expressos em resposta a cádmio 74
2.6.1 – Metabolismo de aminoácidos 79

2.6.2 – Enovelamento de proteínas e proteólise 79
2.6.3 – Proteínas com propriedades antioxidantes 80
2.6.4 – Síntese de proteínas 80
2.6.5 – Transporte 80
2.6.6 – Pirina e SCRP 81
2.6.7 – Categorias do GO mais representadas entre os genes induzidos em resposta a cádmio na germinação e esporulação 81
2.6.8 – Genes induzidos em resposta a cádmio, mas não no estresse térmico 82
2.6.9 – Genes reprimidos durante o tratamento com cádmio 82
2.7 – Genes induzidos tanto por choque térmico como no tratamento com cádmio 82
2.8 – Validação dos dados de microarranjos por RT-PCR quantitativo em tempo real 87
3 – Genes da família Hsp70 de *Blastocladiella emersonii* 88
3.1 – Identificação e análise de seqüências dos membros da família multigênica Hsp70 em *B. emersonii* 88
3.2 – Padrão de expressão dos genes *hsp70* de *B. emersonii* durante o desenvolvimento e o choque térmico 95
4 – Caracterização da Hsp17 de *B. emersonii* 102
4.1 – Identificação e análise da seqüência do cDNA da Hsp17 102
4.2 – Análise do perfil de expressão do mRNA correspondente ao gene *hsp17* durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e o choque térmico 104
4.3 – Níveis relativos da proteína Hsp17 de *B. emersonii* durante o desenvolvimento e o choque térmico 107
5 – Análise de seqüências intrônicas presentes nas ESTs provenientes das bibliotecas de cDNA de estresse 110

V – DISCUSSÃO

1 – Bibliotecas de cDNA de estresse 119
2 – Chaperones moleculares 121
3 – Microarranjos de DNA 124
3.1 – Análise do fenótipo de células de *B. emersonii* submetidas a choque térmico ou cádmio 124
3.2 – Análise da resposta de *B. emersonii* ao choque térmico 124
3.3 - Análise da resposta de *B. emersonii* ao estresse por cádmio 127
4 – Proteínas da família Hsp70 de *Blastocladiella emersonii* 131
5 – Caracterização da Hsp17 135
6 – Análise de seqüências intrônicas presentes nas ESTs provenientes das bibliotecas de cDNA de estresse 137

VI – CONCLUSÕES 141

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 143

VIII – MATERIAL SUPLEMENTAR 162

IX – *CURRICULUM VITAE* 180

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Esquema de um experimento de microarranjo de DNA 5

Figura 02 – Esquema do ciclo de vida de *Blastocladiella emersonii* 12

Figura 03 – Diagrama representando o processamento ao qual foram submetidas às seqüências isoladas das bibliotecas de cDNA 21

Figura 04– Distribuição do número de *contigs* das bibliotecas de cDNA de estresse contendo um número determinado de ESTs 41

Figura 05 – Classificação funcional de 999 ESTs nos processos biológicos do GO 45

Figura 06 – Classificação funcional dos 3773 genes de *B. emersonii* presentes nos microarranjos de DNA 52

Figura 07 – Imagem de uma lâmina contendo 3773 cDNAs distintos 55

Figura 08 - Normalização dos dados de microarranjos utilizando o método LOWESS 56

Figura 09 – Gráficos de dispersão representando as curvas homotípicas e a aplicação das mesmas nos experimentos de hibridização competitiva 57

Figura 10 – Microscopia ótica de células em diferentes tempos do crescimento vegetativo e da esporulação em condições fisiológicas (27°C) e após o choque térmico a 38°C 59

Figura 11 – Microscopia ótica de células em diferentes tempos da germinação e esporulação em condições fisiológicas ou expostas a 100 µM de $CdCl_2$ 62

Figura 12 – Microscopia ótica de células em diferentes tempos da germinação e esporulação em condições fisiológicas ou expostas a 200 µM de $CdCl_2$ 63

Figura 13 – Microscopia ótica de células da fase de esporulação em condições fisiológicas e submetidas ao choque térmico (38°C) ou cádmio 64

Figura 14 – Anotação em categorias funcionais dos genes induzidos por choque térmico 65

Figura 15 – Classificação dos genes induzidos por cádmio em categorias funcionais 74

Figura 16 – Esquema da estrutura da proteína DnaK de *Escherichia coli* mostrando a posição relativa das dez proteínas putativas da família Hsp70 de *B. emersonii* 89

Figura 17 – Análise filogenética de membros da família Hsp70 presentes no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático 94

Figura 18 – Análise por *Southern blot* dos genes *hsp70* de *B. emersonii* 97

Figura 19 – Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70* de *B. emersonii* durante a germinação e a esporulação em temperatura fisiológica e após o choque térmico 98

Figura 20 – Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70* de *B. emersonii* no choque térmico (HS) durante a germinação e a esporulação 100

Figura 21 – Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70-1, hsp70-2, hsp70-3, hsp70-7* e *hsp70-9* de *B. emersonii* durante a germinação e esporulação em temperatura fisiológica 101
Figura 22 - Seqüência de nucleotídeos do cDNA correspondente à proteína Hsp17 103
Figura 23 – Análise por *Southern blot* do gene *hsp17* de *B. emersonii* 104
Figura 24 – Alinhamento múltiplo entre Hsp17 de *B. emersonii* e sHsps de outros organismos 105
Figura 25 – Análise filogenética da proteína Hsp17 de *B. emersonii* e proteínas sHsp de outros organismos 106
Figura 26 - Análise dos níveis de mRNA do gene *hsp17* durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e durante o choque térmico 108
Figura 27 – Análise dos níveis da proteína Hsp17 durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e durante o choque térmico 109
Figura 28 – Distribuição do tamanho dos 105 íntrons dos 85 *unigenes* de *B. emersonii* 114
Figura 29 – Conservação de seqüência nos íntrons de *B. emersonii* 116
Figura 30 - Seqüência de nucleotídeos do cDNA correspondente à proteína Gpx3-1 117
Figura 31 – Comparação das seqüências de aminoácidos deduzidas de Gpx3-1 e Gpx3-2 118
Figura 32– Análise dos níveis do mRNA dos genes *gpx3-1* e *gpx3-2* em células de esporulação de *B. emersonii,* após o choque térmico ou após a exposição ao cádmio 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR quantitativo 27
Tabela 02 - Bibliotecas de cDNA de *B. emersonii* 37
Tabela 03 - Resultados obtidos do seqüenciamento e agrupamento das ESTs das bibliotecas HSR, CDM e CDC 38
Tabela 04 – Sumário do seqüenciamento das ESTs de *B. emersonii* 39
Tabela 05 – ESTs mais abundantes nas bibliotecas HSR, CDM e CDC 42
Tabela 06 – *Unigenes* de *Blastocladiella emersonii* correspondentes a chaperones moleculares e proteínas associadas 47
Tabela 07 - Bibliotecas de cDNA utilizadas na construção dos microarranjos de DNA 51
Tabela 08 – Hibridizações competitivas realizadas nos ensaios de microarranjos de DNA 53
Tabela 09 – Genes induzidos por choque térmico na esporulação 66
Tabela 10 – Genes induzidos por choque térmico na germinação 68
Tabela 11 – Genes induzidos por choque térmico em *B. emersonii* tanto na esporulação quanto na germinação 72

Tabela 12 - Genes induzidos em *B. emersonii* apenas no choque térmico 73
Tabela 13 - Genes induzidos por cádmio na esporulação 75
Tabela 14 - Genes induzidos por cádmio na germinação 77
Tabela 15 – Genes induzidos apenas pelo tratamento com cádmio (100 μM e/ou 200 μM) na esporulação e/ou germinação 83
Tabela 16 – Genes induzidos pelo tratamento com 100 μM e 200 μM $CdCl_2$, tanto na esporulação quanto na germinação 85
Tabela 17 – Genes induzidos tanto por choque térmico quanto por cádmio 86
Tabela 18 – Comparação entre a razão de indução dos genes obtida por RT-PCR quantitativo em tempo real e nos experimentos de microarranjos de DNA 87
Tabela 19 - Tamanho das seqüências dos cDNAs resultantes dos agrupamentos para os membros da família Hsp70 de *B. emersonii* 90
Tabela 20 – Porcentagem de identidade entre as proteínas Hsp70 de *B. emersonii* com seqüência de aminoácidos deduzida completa 90
Tabela 21 – Família Hsp70 de *S. cerevisiae* e seus prováveis ortólogos em outros fungos 92
Tabela 22 – *Unigenes* de *B. emersonii* que apresentaram seqüências intrônicas putativas, mostrando as possíveis regiões flanqueadoras e de ramificação 111
Tabela 23 – Fungos com genoma completamente seqüenciado 120

LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES

Tabela S1 - Lista completa dos genes induzidos por choque térmico na esporulação 162
Tabela S2 - Lista completa dos genes induzidos por choque térmico na germinação 164
Tabela S3 - Lista completa dos genes reprimidos por choque térmico na esporulação 167
Tabela S4 - Lista completa dos genes reprimidos por choque térmico na germinação 168
Tabela S5 - Lista completa dos genes induzidos por cádmio na esporulação 169
Tabela S6 - Lista completa dos genes induzidos por cádmio na germinação 172
Tabela S7 - Lista completa dos genes reprimidos por cádmio na esporulação 175
Tabela S8 - Lista completa dos genes reprimidos por cádmio na germinação 178

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
cDNA	DNA complementar
dCTP	2′-desoxirribonucleotídeo-5′trifosfato de citidina
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetill Sulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxiribonucleotídeos
DO	Densidade ótica
DOC	Desoxicolato de sódio
DTT	Ditiotreitol
dUTP	2′-desoxirribonucleotídeo-5′trifosfato de uracila
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	*Expressed sequence tag*
G	Germinação
g	Unidades de gravidade
h	Hora
HS	*Heat shock* (Choque térmico)
HSP	Proteína de choque térmico
IPTG	Isopropil β-D-galactopiranosídeo
kb	Quilobase
kDa	Quilodáltons
M	Molar
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT	Nitro-azul de tetrazólio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro

nM	Nanomolar
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
pg	Picograma
PPIase	Peptidil prolil cis-trans isomerase
PYG	Peptona, extrato de levedura, glicose
rpm	Rotações por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
S	Esporulação
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SE	Solução de esporulação
seg	Segundos
sHSP	HSP de pequeno peso molecular
TBE	Tampão Tris borato EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
Tris	Hidroximetil aminometano
U	Unidades
UTR	Região não traduzida
UV	Luz ultravioleta (254 nm)
V	Volt
×	Vezes concentrado
X-Gal	5-bromo, 4-cloro, 3-indolil β-D-galactosídeo

RESUMO

Neste trabalho realizamos um programa de seqüenciamento em larga escala de cDNAs obtidos de bibliotecas construídas a partir de mRNA de células de *B. emersonii* submetidas ao choque térmico e ao estresse por cádmio. Obtivemos 6350 seqüências expressas (ESTs) de alta qualidade, que representam 2326 seqüências únicas putativas (*unigenes*) do fungo. Destes *unigenes* putativos, 1282 genes foram classificados em pelo menos uma das categorias do Consórcio *Gene Ontology* (GO). A análise do transcriptoma parcial de *B. emersonii* determinado até o momento permitiu a identificação de 78 *unigenes* codificando chaperones moleculares de todas as famílias conhecidas. Para avaliarmos a expressão global dos genes em resposta a estresses ambientais, como o choque térmico e o cádmio, realizamos ensaios de microarranjos de DNA nestas condições de estresse. Observamos que em resposta ao choque térmico, *B. emersonii* induz a expressão de genes que codificam proteínas relacionadas com o enovelamento de proteínas e com a proteólise, o que seria esperado em condições de temperaturas elevadas, assim como genes que codificam proteínas com propriedades antioxidantes, além de proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e no metabolismo de carboidratos. Em resposta ao estresse por cádmio, verificou-se a indução de genes que codificam principalmente proteínas com propriedades antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, proteínas relacionadas com o transporte celular e proteínas envolvidas no enovelamento de proteínas e proteólise. Uma das conseqüências do estresse por cádmio é o aumento do estresse oxidativo e proteínas antioxidantes têm um papel fundamental na resposta a este tipo de estresse. Dentre os genes observados durante o seqüenciamento das ESTs de *B. emersonii*, observamos dez genes codificando proteínas distintas da família Hsp70. Nove genes *hsp70* são expressos em pelo menos um dos estágios do desenvolvimento do fungo e sete apresentam uma indução significativa após o choque térmico. Estes dados sugerem que estes genes desempenham um papel importante durante o desenvolvimento e em resposta ao estresse térmico em *B. emersonii*. Outro dado interessante obtido neste trabalho foi o enriquecimento de ESTs que continham íntrons em sua seqüência nas bibliotecas de estresse. Portanto, o choque térmico e o estresse por cádmio em *B. emersonii* diminuem a eficiência de processamento dos íntrons permitindo sua caracterização. O cDNA da proteína Hsp17 foi o que apresentou o maior número de ESTs seqüenciadas nas bibliotecas de estresse. Experimentos de *Northern blot* indicaram que o gene *hsp17* possui um nível de expressão muito baixo durante o ciclo de vida de *B. emersonii*, no entanto, como esperado sua expressão aumenta drasticamente quando as células de esporulação ou germinação são submetidas a choque térmico. Os níveis da proteína Hsp17 acompanham os níveis

do seu mRNA, indicando que o controle da expressão do gene *hsp17* deve ocorrer em nível de transcrição.

Palavras-chave: Microarranjos de DNA, Cádmio, Choque térmico, EST, Chaperones moleculares.

ABSTRACT

In this work we realized a large scale, sequencing program of cDNAs libraries obtained from mRNA of *B. emersonii* cells submitted to heat shock and cadmium stress. A total of 6350 high quality expressed sequence tags (ESTs) were obtained, representing 2326 unique putative genes (unigenes) of this fungus. From these putative unigenes, 1282 genes were classified at least in one of the three Gene Ontology Consortium (GO) categories. The analysis of the partial transcriptome of *B. emersonii*, determined until now, allowed the identification of 78 unigenes encoding molecular chaperones of all known protein families. To evaluate the global expression of the genes in response to environmental stresses, such as heat shock and cadmium, DNA microarray assays were performed. We observed that in response to heat shock *B. emersonii* induces the expreession of genes encoding proteins related to protein folding and proteolysis, as expected under high temperature conditions, as well as genes encoding proteins with antioxidant properties and proteins involved in nucleotide and carbohydrate metabolism. In response to cadmium stress, we mainly verified the induction of genes for proteins with antioxidant properties, proteins involved in amino acid metabolism, proteins related to cellular transport and proteins related to protein folding and proteolysis. One of the consequences of the exposure to cadmium is the increase of oxidative stress, and antioxidant proteins have a fundamental role in the response to this kind of injury. Amongst the genes observed during the *B. emersonii* EST sequencing program, ten genes encoding distinct proteins from the Hsp70 family were observed. Nine of them are expressed at least in one stage of the fungus development and seven genes presented a significant induction during heat shock treatment. These data suggest that the *hsp70* genes perform an important role during development and in response to heat stress in *B. emersonii*. Another interesting result from this work was the enrichment of ESTs containing introns in the stress libraries. Thus, heat shock and cadmium stress decrease the efficiency of intron processing in *B. emersonii*, allowing for intron characterization. The cDNA for the Hsp17 protein presented the highest number of ESTs sequenced from the stress libraries. Northern blot experiments indicated that the *hsp17* gene is expressed at very low levels throughout the life cycle of *B. emersonii*, however, as expected its expression increases drastically when sporulation or germination cells are submitted to heat shock. Hsp17 protein levels accompany its mRNA levels, indicating that the control of expression of the *hsp17* gene occurs at a transcriptional level.

I – INTRODUÇÃO

1 – Análise da expressão gênica em larga escala

O padrão de expressão gênica altera-se profundamente em todos os organismos vivos quando ocorrem alterações no ambiente, principalmente se estas mudanças tornam-se uma agressão às células. Estudos genéticos e bioquímicos têm revelado diversos caminhos metabólicos que podem ser ativados ou reprimidos sob as diversas transições ambientais. Por exemplo, com a elevação de temperatura, uma resposta transitória leva à síntese de um grupo de proteínas, conhecidas como proteínas de choque térmico (Lindquist, 1986).

Várias técnicas atuais permitem a análise em larga escala dos genes expressos em determinadas condições fisiológicas e metabólicas nas células. Entre estas técnicas podemos destacar o seqüenciamento aleatório e parcial de um grande número de clones de bibliotecas de cDNAs (Adams *et al.,* 1991), a análise serial da expressão gênica (SAGE) (Velculescu, 1995), os microarranjos de oligonucleotídeos e os microarranjos de DNA (Schena *et al.,* 1995). Essas técnicas permitem um levantamento rápido e paralelo dos padrões de expressão de milhares de genes em um único experimento, além de fornecer uma grande quantidade de dados que favorecem o entendimento da função e regulação dos genes, bem como de suas interações. O termo "transcriptoma" foi criado para designar o conjunto de genes expressos por uma célula ou tecido, refletindo suas funções, fenótipos ou respostas aos estímulos ambientais.

Uma forma relativamente rápida de se obter informação acerca da expressão de genes e seqüências codificadoras de genomas não caracterizados é o seqüenciamento da fração expressa do genoma. Esta estratégia é baseada no seqüenciamento parcial das extremidades 3' ou 5' de clones tomados aleatoriamente de uma biblioteca de cDNA, constituída basicamente de um conjunto de genes expressos inseridos em vetores de DNA. A seqüência obtida é denominada EST (*Expressed Sequence Tag*) (Adams *et al.,* 1991). Uma das vantagens principais do seqüenciamento de ESTs é a identificação de genes putativos por comparação de seqüências, o que permite aos pesquisadores iniciar uma análise biológica antes que o organismo tenha sua seqüência genômica completa determinada.

De fato, o seqüenciamento de ESTs possui seu maior impacto em estudos de genomas de organismos com pouca informação prévia de seqüências gênicas conhecida e nos quais a possibilidade de seqüenciamento do genoma num futuro próximo é pequena (Li *et al.,* 2003). O seqüenciamento de ESTs se apresenta nestes casos como uma alternativa rápida e barata ao seqüenciamento de genomas completos, sendo uma ferramenta útil na descoberta de novos genes,

na anotação de genomas, em genômica comparativa e em estudos de expressão gênica (Rudd, 2003). A obtenção de ESTs permite a comparação de seqüências entre espécies diferentes, com base na observação de que genes responsáveis pela mesma função, em organismos diferentes, são conservados durante a evolução.

O emprego desta metodologia permite a identificação de genes, reconhecimento de éxons, caracterização dos limites éxon/intron, formação de famílias gênicas, desenvolvimento de mapas gênicos, identificação de genes específicos de tecidos ou organismos, investigação de genes de função desconhecida e estabelecimento de padrões de expressão gênica espacial e temporal (Adams, 1995; Rudd, 2003). Entretanto, podemos citar algumas desvantagens na utilização de ESTs, como a necessidade de obtenção de mRNAs de todos os tecidos, tipos celulares e etapas do desenvolvimento, além de não proporcionar informações sobre as seqüências dos introns e das regiões intergênicas.

Análises de expressão gênica via ESTs vêm sendo desenvolvidas em diferentes organismos, incluindo humanos (Adams *et al.,* 1991; Hillier *et al.,* 1996; Camargo *et al.,* 2001; Brentani *et al.,* 2003; Ota *et al.,* 2004), animais (Sharov *et al.,* 2003; Carninci *et al.,* 2003; Hubbard *et al.,* 2004), plantas (Vettore *et al.,* 2003; Zhu, 2003; Zhou, 2003; Fei *et al.,* 2004; Sterki *et al.,* 2004; Rensink 2005) e fungos (Nelson *et al.,* 1997; Zhu *et al.,* 2001; Goldman *et al.,* 2003; Felipe *et al.,* 2003; Nugent *et al.,* 2004; Ribichich, *et al.,* 2005; Semova *et al.,* 2006).

Além das informações que podemos extrair do seqüenciamento das ESTs, os clones provenientes das bibliotecas de cDNA podem ainda ser amplificados por PCR e empregados na construção de microarranjos de DNA (Schena *et al.,* 1995). A tecnologia dos microarranjos de DNA foi desenvolvida na década de 1990, permitindo a análise da expressão de milhares de genes simultaneamente bem como a identificação dos padrões de expressão gênica, relacionados à fisiologia celular, revolucionando assim, a maneira pela qual a expressão dos genes é estudada. Desta forma, pode se determinar quais genes são ligados ou desligados quando as células crescem, se dividem, ou respondem a hormônios, toxinas ou a diferentes tipos de estresse.

Os microarranjos de DNA consistem em milhares de seqüências de genes ou fragmentos de genes imobilizados de forma ordenada na superfície de um suporte sólido, normalmente lâminas de vidro. Cada fragmento de DNA é denominado "elemento" ou "ponto", e serve como sonda para um gene específico. Alguns microarranjos contêm oligonucleotídeos que são sintetizados na superfície das lâminas, outros são constituídos de fragmentos grandes de DNA obtidos por reações de PCR e então imobilizados nas lâminas com o auxílio de um robô.

Normalmente, os experimentos com microarranjos de DNA envolvem a comparação de duas condições biológicas, como "estado patológico" versus "estado normal", ou "choque térmico" versus "temperatura normal de crescimento" (Stoughton, 2005). Assim, na avaliação do perfil de expressão gênica global utilizam-se mRNAs obtidos de células nas duas condições: teste e referência, e determina-se o nível relativo de expressão para cada gene. As amostras de mRNA das duas condições são convertidas em cDNAs marcados com moléculas repórteres fluorescentes distintas. Por exemplo, marca-se a amostra teste com um fluoróforo Cy5 (vermelho), e a amostra referência com um fluoróforo Cy3 (verde). Os cDNAs marcados são então misturados e hibridizados com os genes presentes nos microarranjos (Figura 1). Após a hibridização, a intensidade de fluorescência de cada ponto é determinada pela varredura da lâmina. Imagens independentes são geradas para as amostras referência e teste e os dados são armazenados e analisados em computador. A relação entre a fluorescência dos elementos na lâmina (Cy5/Cy3) permite determinar o nível relativo de expressão dos genes nas duas condições de estudo.

Os microarranjos de DNA permitem que as alterações nas taxas de transcrição que ocorrem em aproximadamente todos os genes de um determinado tecido ou tipo celular específico durante o desenvolvimento sejam avaliadas, assim como as alterações em resposta a perturbações experimentais intencionais como deleções gênicas e tratamentos de doenças (Stoughton, 2005). Sendo assim, microarranjos têm sido empregados nas mais diversas análises da expressão gênica, incluindo o estudo de diferentes tipos de câncer em humanos (Brentani *et al.,* 2005) e a análise do desenvolvimento em organismos modelo (White *et al.,* 1999; Kim *et al.,* 2001).

Microarranjos de DNA têm sido extensivamente utilizados para a analisar a expressão gênica de fungos em diversas condições (DeRisi *et al.,* 1997; Gasch *et al.,* 2000; Causton *et al.,* 2001; Chen *et al.,* 2003; Sims *et al.,* 2004; Nunes *et al.,* 2005; Jakupovic *et al.,* 2006). Em *Saccharomyces cerevisiae*, microarranjos contendo todos os genes da levedura foram utilizados em várias análises, tais como a comparação da expressão gênica de células crescidas em meio contendo glicose como fonte de carbono com células crescidas em etanol (DeRisi *et al.,* 1997). Foram realizados também experimentos de microarranjos em *S. cerevisiae* com o intuito de analisar a resposta comum deste fungo a diferentes estresses ambientais. Observou-se que de 10 a 14% dos genes deste microorganismo sofrem alteração no nível de expressão em resposta a uma grande variedade de estresses (Gasch *et al.,* 2000; Causton *et al.,* 2001). Em *Schizosaccharomyces pombe* a resposta comum a vários estresses ambientais também foi avaliada através de ensaios de microarranjos de DNA. Foram identificados como genes de resposta comum a estresses cerca de 240 genes, pois apresentaram uma expressão diferenciada na maioria dos estresses analisados (Chen *et al.,* 2003).

Assim, o estudo do transcriptoma em face de mudanças fisiológicas, é um importante desenvolvimento na pesquisa genômica.

2 – Resposta a estresses ambientais

2.1 –Choque térmico

A resposta ao choque térmico é caracterizada por um aumento significativo na expressão de um conjunto de genes chamados de *hsp* (***h**eat **s**hock **p**rotein genes*) que em sua maioria desempenham um papel importante na proteção das células contra os efeitos deletérios do estresse térmico (Morimoto *et al.,* 1992). Os genes induzidos por choque térmico são altamente conservados entre os mais diferentes organismos e codificam proteínas altamente similares nas suas seqüências de aminoácidos e funções, mesmo em espécies filogenéticamente distantes. Em procariotos estes genes são quase sempre encontrados em cópia única no genoma e organizados em estruturas do tipo "operon" ("operon" DnaK/DnaJ/GrpE ou "operon" GroES/GroEL). Em eucariotos, no entanto, pelo menos para a classe de homólogos a DnaK e DnaJ (Hsp70 e Hsp40), encontram-se famílias gênicas com certos genes sob controle por choque térmico e outros não, como no exemplo da classe de Hsc70 (***h**eat **s**hock **c**ognate***)** (Becker & Craig, 1994), que são chamados de genes cognatos.

A maioria das proteínas de choque térmico (Hsps) pode ser classificada em uma de quatro famílias protéicas: as proteínas de alto peso molecular, que variam entre 83-90 kDa; a família das Hsp70, variando entre 66-78 kDa; a família das Hsp60, as quais tem sido chamadas de "chaperoninas", estando presentes em bactérias, mitocôndrias e cloroplastos (Hemmingsen *et al.,* 1988); e um grupo diversificado variando entre 15-40 kDa, que são conhecidas como proteínas de baixo peso molecular (**sHsp - *s**mall **H**eat **s**hock **p**rotein***). Existem ainda algumas proteínas de aproximadamente 100-110 kDa que tem sido caracterizadas em mamíferos (Subjeck *et al.,* 1983; Shyy *et al.,* 1986) e em levedura (Sanchez *et al.,* 1992; Parsell *et al.,*1994).

As chaperones moleculares constituem um grupo de proteínas relacionadas pela sua função de auxiliar o enovelamento protéico na célula tanto em condições fisiológicas como em condições de estresse. As proteínas funcionais da célula estão normalmente presentes em sua forma completamente enovelada. No entanto, importantes processos, como a síntese de proteínas ou a translocação de proteínas para os compartimentos intracelulares, requerem que a proteína exista temporariamente na conformação totalmente ou parcialmente desenovelada. Como conseqüência, poderiam ocorrer agregações não específicas que seriam deletérias para a célula. Para prevenir essas agregações não específicas, as Hsps protegem e facilitam o enovelamento das proteínas desenoveladas ou nativas (Becker & Craig, 1994).

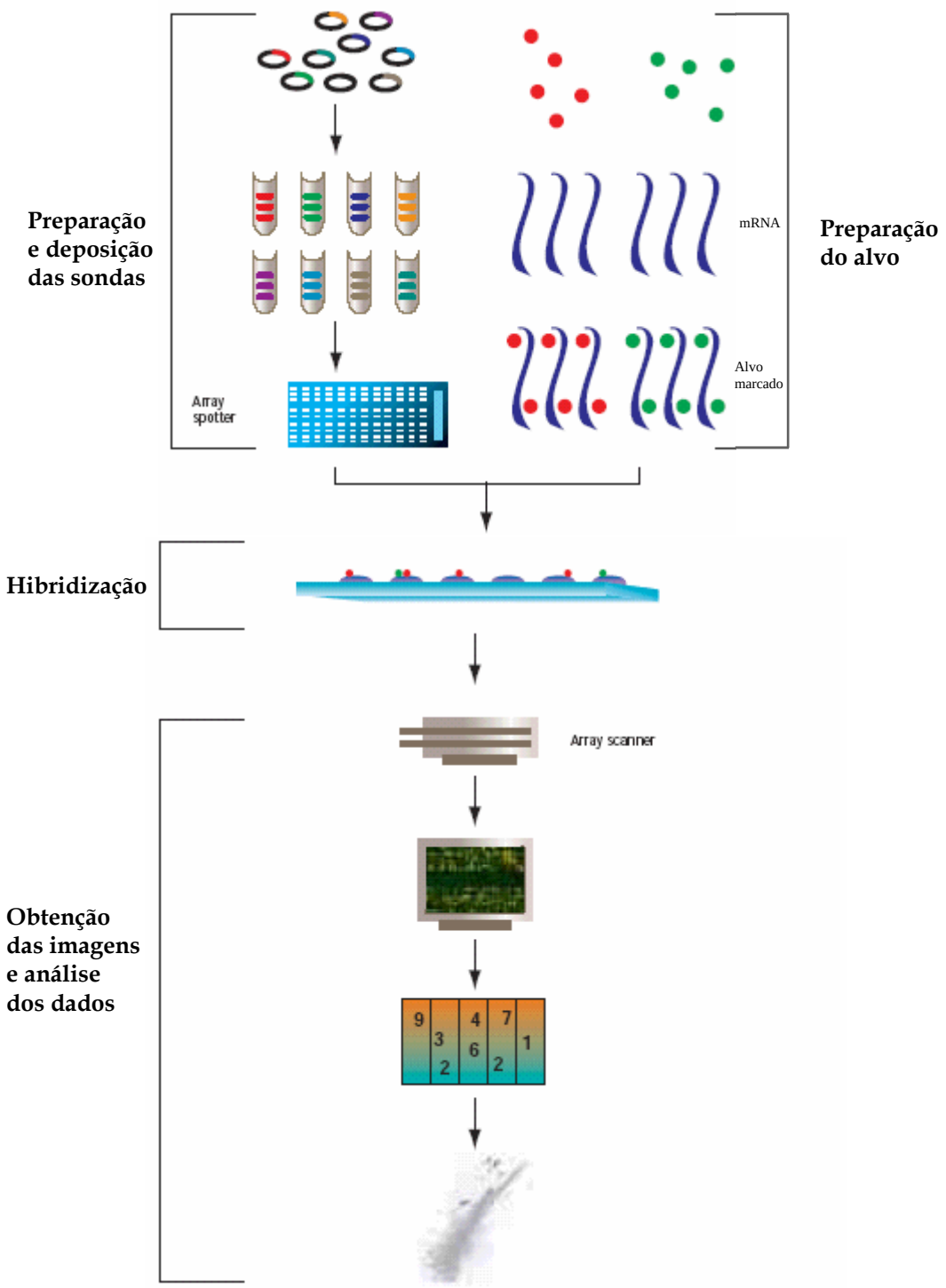


Figura 01 – Esquema de um experimento de microarranjo de DNA. Fragmentos dos genes de um organismo são amplificados por PCR, purificados e imobilizados em lâminas de vidro utilizando um robô. A partir do RNA das amostras teste e controle, os cDNAs são sintetizados e marcados com os fluoróforos Cy3 e Cy5 e hibridizados nas lâminas contendo os fragmentos de DNA. A lâmina é varrida com lasers de comprimento de onda específicos utilizando um escaner e são geradas imagens monocromáticas. Após a análise das imagens, os valores de intensidade de fluorescência para cada ponto nas condições teste e controle são extraídos, o que permite determinar o nível relativo de expressão dos genes individuais.

A função geral das chaperones moleculares no enovelamento de proteínas foi baseada no 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 e degradação de polipeptídeos que se desnaturam sob estresse térmico (Pelham, 1986; Hightower, 1991) e atuam na prevenção da agregação de polipeptídeos recém sintetizados, participando do enovelamento destes para a sua forma nativa, num processo dependente de ATP (Frydman & Hartl, 1994). As proteínas Hsp70 e Hsp60 estão entre as mais abundantes dentro da célula, indicando seu importante papel no enovelamento de proteínas (Narberhaus, 2000).

A Hsp70 (DnaK) e suas co-chaperones (DnaJ/Hsp40 e GrpE) auxiliam os processos de enovelamento e montagem de intermediários recém-sintetizados no citoplasma e no retículo endoplasmático de células eucarióticas, bem como no citoplasma de bactérias (Beckman *et al.,* 1990). O acúmulo de proteínas de choque térmico em células expostas a altas temperaturas está associado com a aquisição de termotolerância (Lindquist & Craig, 1988), e a análise genética funcional destes genes de choque térmico indicam que os respectivos produtos gênicos participam em outros processos fisiológicos, como divisão celular, expressão gênica, montagem e desmontagem de complexos oligoméricos de proteínas e translocação de proteínas através de membranas (Gething & Sambrook, 1992; Mager & Ferreira, 1993). As Hsp70 têm sido descritas como uma família de proteínas altamente conservadas com uma massa molecular de aproximadamente 70 kDa. Elas são compostas por dois domínios funcionalmente separados, um de 44 kDa, responsável pela ligação ao ATP e o outro de 18 kDa, que se liga ao peptídeo substrato. As proteínas Hsp70 conjuntamente com a sua co-chaperone da família Hsp40 funcionam através da ligação e liberação, de uma maneira dependente de ATP, aos segmentos de peptídeos que se encontram expostos pelas proteínas quando não estão em seu estado nativo (Hartl & Hayer-Hartl, 2002).

Por sua vez a Hsp60 (GroEL) e sua co-chaperone Hsp10 (GroES) são fundamentais na biogênese de muitas proteínas que são importadas para mitocôndrias e cloroplastos ou proteínas bacterianas (Hemmingsen *et al.,* 1988). As Hsp90, que também pertencem à classe dos chaperones, atuam ligando peptídeos desenovelados e silenciam sua função ou promovem o endereçamento para o compartimento celular adequado. A Hsp104 é requerida quando os mecanismos de proteção são insuficientes em estresse extremo. A função reparadora da Hsp104 é indicada pela sua habilidade de resgatar proteínas inativadas por calor de agregados insolúveis, uma capacidade não encontrada em outras chaperones (Parsell *et al.,* 1994; Glover & Linquist, 1998).

As Hsp70 e Hsp60 são as proteínas de choque térmico melhor caracterizadas, entretanto, evidências implicam também outras proteínas, incluindo a Hsp90, prolina isomerases (PPIasaes) e as disulfito isomerases no enovelamento de proteínas. Embora as Hsps sejam proteínas envolvidas em processos que são essenciais para o crescimento, como enovelamento de proteínas recém sintetizadas, a Hsp104, demonstrou ser uma Hsp sintetizada, em levedura, apenas durante o estresse, sendo dispensável em condições normais de crescimento (Craig *et al.,* 1993).

Os membros da família das sHsps possuem similaridade em motivos restritos da seqüência C-terminal que são característicos e que também têm sido conservados nas proteínas α-Cristalino do olho de vertebrados (Plesofsky-Vig *et al.,* 1992; de Jong *et al.,* 1993). As sHsps formam uma família de proteínas pouco conservadas em seqüência de aminoácidos, de peso molecular entre 15 a 40 kDa e seus genes são mais numerosos e abundantemente expressos em plantas. Embora não se tenha muito conhecimento sobre a atuação destas Hsps no choque térmico, tem sido proposto um modelo para a atividade de chaperone molecular para as Hsps de baixo peso molecular. Este modelo propõe que as sHsps atuem ligando-se a proteínas não nativas, prevenindo sua agregação e mantendo-as em um estado competente para o enovelamento. Este reservatório de proteínas estáveis pode então interagir com chaperones ATPases, tais como Hsp70/Hsp30/GrpE ou Hsp60/Hsp10 e restabelecer as proteínas inativas para seu estado funcional (Ehrnsperger *et al.,* 1997; Veinger *et al.,* 1998; Haslbeek *et al.,* 1999; Lee & Vierling, 2000). No seu estado nativo as sHsps formam oligômeros de 9 a 32 subunidades ou apresentam estruturas quaternárias variáveis e dinâmicas (Haley *et al.,* 2000). Além da função de chaperones moleculares, muitas Hsps tem função de proteases, degradando as proteínas irreversivelmente desnaturadas (Hoskins *et al.,* 2000).

2.2 – Cádmio

Embora o choque térmico tenha permanecido por muito tempo como o principal tipo de estresse estudado, vários outros tipos de estresse têm sido também investigados mais recentemente, incluindo exposição a toxinas, metais pesados e espécies reativas de oxigênio (Morimoto *et al.,* 1992).

O cádmio é um elemento que não possui função biológica conhecida e um dos mais preocupantes poluentes ambientais. Os efeitos biológicos da exposição das células ao cádmio, que é um metal pesado altamente tóxico, ainda não estão ainda claramente compreendidos. Tem sido proposto que os íons de cádmio (Cd^{2+}) poderiam deslocar os íons de zinco (Zn^{2+}) e ferro (Fe^{2+}) das proteínas (Stohs & Bagchi, 1995), resultando em sua inativação e liberação do ferro livre, gerando radicais hidroxila ($OH^{\bullet}$) altamente reativos (Halliwell & Gutteridge, 1984). Em concordância com

esta hipótese, o efeito principal observado em resposta ao cádmio é o estresse oxidativo (Brennan & Schiestl, 1996). Embora o cádmio não seja um metal de transição e por isso não se acredita que interfira diretamente com o metabolismo do oxigênio celular, ele pode indiretamente contribuir para o estresse oxidativo devido a uma depleção inicial de moléculas antioxidantes (Schutzendubel & Polle, 2002).

O mecanismo geral de destoxificação de íons de metais pesados envolve a complexação por ligantes e a compartimentalização do complexo íon-ligante em vacúolos (Vatamaniuk *et al.,* 2001). As principais moléculas responsáveis pela complexação destes íons são as metalotioneínas (pequenas proteínas ricas em resíduos de cisteína), a Glutationa (γ-Glu-Cis-Gly; GSH), uma importante molécula antioxidante, ou a Fitoquelatina [$(\gamma\text{-Glu-Cis})_{2\text{-}11}$Gly; PC)], um polímero de GSH sintetizado em plantas e em *Schizosaccharomyces pombe* (Cobbert, 2000; Li *et al.,* 1997). A compartimentalização no vacúolo parece ser o mecanismo mais importante para a resistência ao Cd^{2+} em *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *Candida glabatra* e plantas (Medonza-Cozatl *et al.,* 2005). O cádmio pode ser transportado para o vacúolo como íon livre ou associado com compostos tiol, como GSH e PC. Em *S. pombe* um transportador da família ABC (*ATP-binding cassete*) realiza o transporte de complexos PC-Cd^{2+} para o vacúolo (Ortiz *et al.,* 1995). Em *S. cerevisiae* o transporte de complexos Cd^{2+}-bisglutionato é feito por um transportador ABC similar a proteínas de resistência múltipla a drogas (Ycf1) (Li *et al.,* 1997). Em plantas foi demonstrada a troca de íons Cd^{2+} por prótons do vacúolo através do transportador antiporte de Ca^{2+}/H^{+} (Cax2) (Hirschi *et al.,* 2000). Em relação à extrusão de íons cádmio para o meio, foram identificadas ATPases do tipo P que transportam íons de metais pesados, como a proteína Cad2 de *S. cerevisiae* (Shiraishi *et al.,* 2000).

Em *Saccharomyces cerevisiae,* a resposta proteômica ao cádmio revelou a indução de enzimas da via de síntese de aminoácidos que contêm enxofre (S) e da via de biossíntese de GSH (Vido *et al.,* 2001). Esses resultados corroboram estudos anteriores em que a GSH atua como a primeira forma de defesa contra a toxicidade do cádmio. Nessa análise proteômica também foi verificada a indução de proteínas de choque térmico (Hsps) em resposta à presença de cádmio na célula. As proteínas induzidas compreendiam Hsps da família das sHsps, da Hsp90, Hsp100 e Hsp70, sendo que o maior nível de indução dentre todas as proteínas analisadas foi o da Hsp70 de retículo endoplasmático (BiP) (Vido *et al.,* 2001).

Fauchon e colaboradores (2002) também analisaram a resposta proteômica de *S. cerevisiae* ao cádmio com enfoque na resposta à demanda de enxofre na célula, uma vez que o metabolismo de enxofre é desviado para a via de síntese de aminoácidos sulfurosos e para a produção de GSH (Vido *et al.,* 2001). Esses autores observaram o aumento da transcrição de genes codificando

isoformas de proteínas com menor conteúdo de enxofre. Interessantemente, estas proteínas não compreendiam apenas as proteínas relacionadas com a resposta ao estresse oxidativo causado pelo cádmio, mas também proteínas do metabolismo de carboidratos. Isso ocorreria devido à necessidade de que a célula resguardasse o enxofre, transcrevendo as isoformas que apresentassem menos aminoácidos com enxofre em sua estrutura, englobando as proteínas de maior expressão dentro da célula e, conseqüentemente as proteínas do metabolismo de carboidratos (Fauchon *et al.,* 2002).

2.3 – Regulação da resposta a choque térmico e a cádmio

Em eucariotos, a ativação dos genes de choque térmico é mediada pelo fator de transcrição de choque térmico (*HSF - **H**eat **S**hock **F**actor*) que se liga a seqüências consenso no DNA denominadas HSE *(**H**eat **S**hock **E**lement*) (Amin *et al.,* 1988; Xiao & Lis, 1988). Em células sob condições normais, o fator *HSF* está presente no citoplasma ou núcleo numa forma monomérica que não tem atividade de ligação ao DNA. Em resposta ao aumento de temperatura e outros estresses, o *HSF* assume rapidamente uma forma de trímero, acumula-se no núcleo e ativa a transcrição dos genes de choque térmico (Westood *et al.,* 1991). As chaperones moleculares induzidas pelo estresse térmico, principalmente a Hsp70, autoregulam a resposta ao choque térmico ligando-se ao domínio de ativação do HSF inibindo-o (Morimoto, 1998).

Em *Saccharomyces cerevisiae,* a resposta ao estresse oxidativo causado por cádmio é regulado pelo fator de transcrição Yap1. A regulação de Yap1 ocorre em nível de localização subcelular: sob condições normais Yap1 é restrito ao citoplasma, mas torna-se nuclear em resposta ao estresse oxidativo (Toone & Jones, 1999). A deleção de Yap1 resulta em um fenótipo de hipersensibilidade ao cádmio, pois este fator de transcrição é responsável pelo controle da expressão dos genes Gsh1 e Ycf1. Gsh1 codifica a γ-Glutamilcisteína sintase, uma proteína da via de síntese de glutationa e Ycf1 é o transportador responsável pelo transporte dos complexos Cd^{2+}-bisglutionato para dentro do vacúolo. (Lee *et al.,* 1999).

Em *Schizosaccharomyces pombe,* o fator de transcrição de choque térmico HSF está envolvido também na resposta a cádmio. Deleções na região C-terminal do HSF têm efeitos específicos na capacidade da célula em sobreviver a diferentes injúrias. Em particular, uma mutação causa acréscimo na sensibilidade a cádmio mas não a choque térmico, enquanto uma segunda mutação causa acréscimo na sensibilidade a choque térmico mas não a cádmio (Saltsman *et al.,* 1999). Acredita-se que a capacidade destas linhagens de sobreviver aos dois estresses é resultado das diferenças na capacidade do HSF de ativar o conjunto apropriado de genes necessários para a

sobrevivência, pois o HSF permanece capaz de ser estimulado pelo estresse. Estes resultados sugerem que o HSF tem evoluído para conter múltiplos domínios de ativação para permitir a regulação de diferentes conjuntos de genes que são requeridos quando a célula é submetida a diferentes estresses (Saltsman *et al.*, 1999).

3 – Expressão diferencial de genes de choque térmico durante o desenvolvimento

Embora as proteínas de choque térmico sejam mais conhecidas pela sua indução nessa condição, existem Hsps que são constitutivas ou cognatas (Hscs) e outras que são induzidas durante certos estágios de desenvolvimento, tais como a formação de gametas, esporos ou estágios de diferenciação celular (Hightower & Nover, 1991; HeiKKila, 1993). Em células de mamíferos, a expressão das Hscs e a indução das Hsps são geralmente menores no estado diferenciado do que durante o crescimento exponencial (Helmbrecht & Rensing, 1999). A expressão diferencial de chaperones durante os estágios de desenvolvimento também tem sido descrita em fungos (Plesofsky-Vig, 1996). Estes estágios compreendem principalmente a formação de esporos vegetativos ou sexuais e seus estágios de germinação e crescimento. Fungos como modelos de estudo oferecem vantagens na análise de expressão gênica diferencial devido ao seu número limitado de estados diferenciados, que podem ser facilmente controlados por fatores externos. Em *Neurospora crassa* observou-se a expressão diferencial da Hsc70 e da *grp78* ou BiP (***g****lucose* ***r****egulated* ***p****rotein*), uma proteína da família das Hsp70 que está relacionada com o translocamento de peptídeos para o retículo endoplasmático. A *grp78* apresentou indução durante os diferentes estágios de desenvolvimento do fungo, tendo níveis maiores do que a Hsc70 no estágio de formação dos conídios. Os altos níveis da expressão da grp78 e a expressão de Hsc70 de *N. crassa* durante a formação dos conídios, pode ser relacionada com a necessidade da síntese e enovelamento de novas proteínas neste estágio, além do fato de que as Hsps desempenhariam um papel importante na proteção das proteínas dos conídios durante sua dormência (Hafker *et al.*, 1998).

4 - O modelo de estudo: *Blastocladiella emersonii*

O fungo aquático não filamentoso *Blastocladiella emersonii* foi isolado e descrito por Cantino (1951) e pertence à classe Quitridiomicetos, ordem Blastocladiales. Este fungo caracteriza-se por apresentar um ciclo de vida com estágios bem definidos: zoósporo, germinação, crescimento vegetativo e esporulação, o que o torna um modelo bastante interessante para o estudo da regulação gênica ligada à diferenciação celular e o desenvolvimento (Figura 2). Além disso, é um

organismo de fácil manipulação, com ciclo de vida curto (24 h a 20°C) e passível de sincronização, o que possibilita a obtenção de diferenciação celular sincrônica em populações numerosas (Lovett, 1975).

Durante as duas etapas de diferenciação celular do fungo, a germinação e a esporulação, ocorrem mudanças drásticas no padrão de síntese de mRNAs e proteínas, principalmente ao longo da esporulação (Silva *et al.,* 1986; Silva *et al.,* 1987a). Recentemente, um programa de seqüenciamento de ESTs em larga escala realizado em nosso laboratório, confirmou a ocorrência de expressão gênica diferencial nas duas fases de diferenciação, revelando um grande conjunto de genes cuja expressão varia de forma dependente do estágio de desenvolvimento do fungo (Ribichich *et al.,* 2005).

No processo de germinação, o zoósporo, uma célula uninucleada móvel e sem parede celular, retrai seu flagelo, sintetiza uma parede celular rica em quitina, fragmenta sua mitocôndria gigante e produz um rizóide primário ou tubo de germinação que se desenvolve em um sistema de rizóides. Basicamente, a germinação pode ser desencadeada pela adição de meio rico em nutrientes ou pela presença de uma solução inorgânica contendo K^+ e outros sais (Soll & Sonneborn, 1972). Durante a germinação ocorre também um aumento precoce e transiente nos níveis de AMP cíclico intracelular (Vale *et al.,* 1976; Gomes *et al.,* 1978) e um efluxo de Ca^{2+} (Soll & Sonneborn, 1972; Gomes *et al.,* 1980) que atuariam como mediadores do processo. Inibidores da fosfodiesterase de AMP cíclico e o próprio AMP cíclico também são indutores específicos da germinação (Silverman & Eptein, 1975; Gomes *et al.,* 1980). A maioria das células encontra-se na forma de esferócitos entre os 10 a 15 minutos após a indução da germinação, formando um tubo germinativo aos 45 minutos e produzindo as primeiras divisões nucleares entre os 140 e os 190 minutos. Inicia-se então o crescimento vegetativo que se caracteriza por divisões nucleares sucessivas desacompanhadas de divisão celular produzindo um cenócito (Lovett, 1975).

A carência de nutrientes, a qualquer momento do crescimento vegetativo, induz o processo de esporulação. Durante a esporulação, cada célula vegetativa cenocítica multinucleada diferencia-se em um de dois fenótipos dependendo das condições de crescimento: um esporângio de resistência (célula de parede espessa e pigmentada), ou um zoosporângio (célula de parede delgada, não pigmentada) (Cantino, 1965; Ingebretsen & Sanner, 1976). Os esporângios de resistência são formados em condições adversas para o crescimento e demoram vários dias para amadurecer, enquanto os zoosporângios são produzidos em condições normais de crescimento e amadurecem em poucas horas. A esporulação é induzida em uma solução tamponada contendo

Ca^{2+}, sendo necessário o influxo de cálcio e a participação de calmodulina para o início do processo (Soll & Sonneborn, 1969; Coutinho & Corrêa, 1999; Simão & Gomes, 2001).

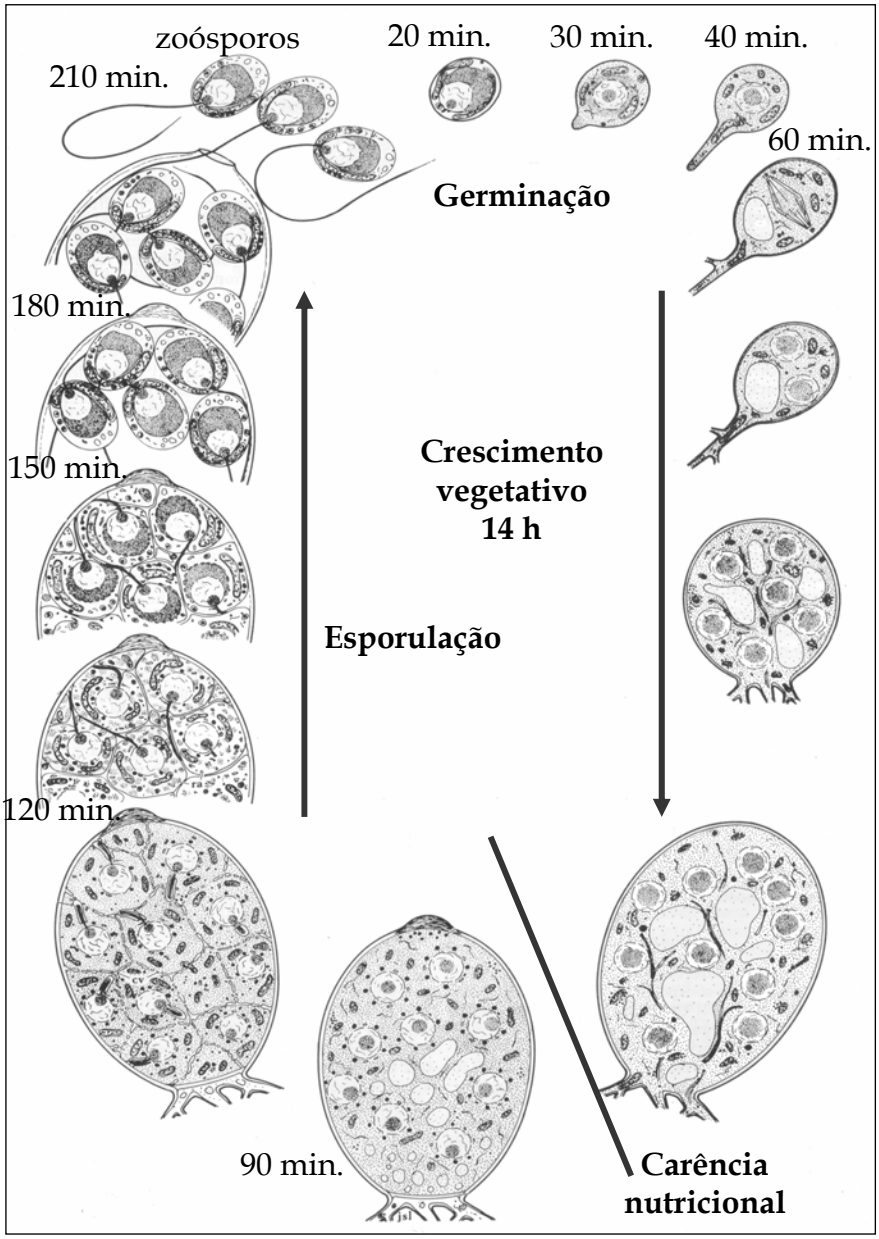


Figura 02 – Esquema do ciclo de vida de *Blastocladiella emersonii* (modificado de Lovett, 1975).

Durante a esporulação, o esporângio desenvolve uma parede basal transversal (septo), isolando o rizóide do corpo de célula, e uma papila de descarga, abertura na parede através da qual no final da esporulação são liberados para o meio os zoósporos produzidos. Em presença de nutrientes apropriados, os zoósporos reiniciam o ciclo produzindo os germens (Lovett, 1975). Depois da germinação, as células podem retomar o crescimento caso encontrem as condições nutricionais adequadas.

3.1 – Resposta ao choque térmico e ao cádmio em *Blastocladiella emersonii*

A resposta ao choque térmico em *Blastocladiella emersonii* é dependente do estágio de desenvolvimento. A exposição das células a temperaturas elevadas (38°C) em diferentes fases do ciclo de vida do fungo mostrou uma síntese diferencial das proteínas de choque térmico (Bonato *et al.*, 1987). Conjuntos específicos de proteínas de choque térmico têm sua síntese induzida em cada fase do desenvolvimento (esporulação, germinação e crescimento), demonstrando, assim, uma expressão não coordenada dos genes de choque térmico. Ao todo foram identificados em géis bidimensionais 22 polipeptídeos, sendo que dentre estes apenas sete são induzidos pelo choque térmico em qualquer fase do desenvolvimento. Dentre estes polipeptídeos cuja síntese foi induzida estão aqueles de massa molecular aproximada de 82 kDda, 76 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 25kDa e 17kDa que estão envolvidos no fenômeno de termoproteção ou termotolerância a temperaturas letais, sendo que a esporulação e o final da germinação são as fases onde mais peptídeos são expressos (Bonato *et al.*, 1987; Silva *et al*, 1987).

O gene codificando a proteína Hsp70 de *B. emersonii* foi isolado e caracterizado em nosso laboratório e apresenta um íntron de 165 pb localizado na região amino-terminal da proteína correspondente (Stefani & Gomes, 1995). O processamento do íntron ocorre corretamente durante o choque térmico a 38°C, mas é parcialmente inibido na temperatura extrema de 42°C (Stefani & Gomes, 1995). Em qualquer fase do ciclo de vida do fungo, o gene da Hsp70 é induzido pelo estresse de temperatura, mas também é expresso em temperaturas fisiológicas durante a fase de esporulação, onde se observa a síntese máxima da proteína aos 120 minutos deste processo (Bonato *et al.*, 1987; Stefani & Gomes, 1995). Análise da região regulatória do gene *hsp70* mostrou diversas seqüências similares ao elemento HSE, apesar de nenhuma das combinações presentes seguir exatamente o consenso para HSE (NGAANNTTCNNGAAN) descrito em outros organismos (Stefani & Gomes, 1995).

O gene *hsp90* de *B. emersonii* também foi caracterizado e apresenta um íntron de 184 pb, localizado na região N-terminal da proteína correspondente, que é completamente removido

quando as células são submetidas a choque térmico (38°C). O mRNA do gene *hsp90* também está presente durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e é induzido pelo aumento da temperatura. Análise da região regulatória do gene *hsp90* mostrou uma seqüência putativa similar a HSE além de uma seqüência similar ao elemento de resposta a estresse STRE, CCCT (Pugliese *et al.*, 2006).

Os cDNAs codificando as chaperoninas Hsp60/Hsp10 foram também caracterizados em *B. emersonii*, e os níveis dos mRNAs correspondentes a estes genes foram analisados durante o desenvolvimento do fungo em condições fisiológicas e no choque térmico. Verificou-se que os genes *hsp60* e *hsp10* são expressos durante todo o ciclo de vida de *B. emersonii* e induzidos por choque térmico tanto na germinação quanto na esporulação (Pugliese, 2002).

Em *B. emersonii*, experimentos de *Northern blot* mostraram a indução de mRNAs de proteínas de choque térmico quando as células eram submetidas ao tratamento com cádmio. Nestas células foram observados níveis aumentados de mRNAs das proteínas Hsp10, Hsp60, Hsp90 e Hsp100 quando comparados com células mantidas em condições fisiológicas. No entanto, estes níveis foram inferiores aos níveis de mRNA observados quando as células foram submetidas ao choque térmico, sugerindo que estas Hsps desempenham um papel mais importante e específico na resposta ao choque térmico do que na resposta ao estresse por cádmio (Georg, R.C., dados não publicados; Pugliese, 2002).

Nesta tese, descrevemos a realização de um programa de seqüenciamento de ESTs de *B. emersonii* obtidos a partir de mRNAs de células submetidas a choque térmico e ao estresse por cádmio. As seqüências obtidas foram processadas, analisadas e anotadas. Além disso, clones provenientes de bibliotecas de cDNA construídas em diversas fases do ciclo de vida do fungo (Ribichich *et al.*, 2005) e em condições de estresse foram utilizados na construção de microarranjos de DNA contendo mais de 3.700 genes putativos de *B. emersonii*. Esses microarranjos foram empregados na análise da expressão gênica em resposta a choque térmico e cádmio em *B. emersonii*. A família das Hsp70 foi caracterizada quanto à expressão de seus membros durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e em condições de choque térmico. O cDNA correspondendo à proteína Hsp17 foi caracterizado e a expressão de seu mRNA foi avaliada durante os estágios de germinação e esporulação de *B. emersonii* em condições fisiológicas e no choque térmico.

II – OBJETIVOS

1 – Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto foi analisar a expressão gênica do fungo aquático *B. emersonii* em resposta a diferentes condições de estresse, como o choque térmico e exposição a cádmio, e avaliar o envolvimento dos genes diferencialmente expressos no desenvolvimento do fungo em condições fisiológicas.

2 – Objetivos específicos

2.1 – Analisar o padrão de expressão gênica de células expostas a cádmio e choque térmico nos estágios de esporulação e germinação de *B. emersonii*.

Para tanto nos propusemos:

2.1.1 – Realizar um seqüenciamento de clones de bibliotecas de cDNA obtidas a partir de mRNA de células de *B. emersonii* expostas a choque térmico e a cádmio na esporulação.

2.1.2 – Analisar a expressão gênica global de *B. emersonii* em resposta ao estresse por cádmio e o choque térmico nos estágios de esporulação e germinação deste fungo, utilizando a técnica de microarranjos de DNA.

2.2 – Analisar o padrão de expressão gênica dos genes da família das Hsp70 de *B. emersonii* durante o desenvolvimento do fungo e sob choque térmico.

2.3 - Investigar a expressão do gene que codifica a proteína Hsp17.

III - MATERIAIS & MÉTODOS

1 – Cultivo de *B. emersonii*

Para o crescimento de *B. emersonii* as culturas foram renovadas diariamente através de repique de zoósporos em placas de petri contendo meio PYG-ágar (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,3%; ágar 1,5%) e ampicilina 100 µg/mL. As placas foram mantidas por cerca de 16 h a 19°C, quando os zoósporos germinaram aderidos a superfície do ágar e as células entraram em crescimento vegetativo. A seguir, as placas foram transferidas para uma estufa a 28°C por cerca de 8 h, quando ocorreu a esporulação espontânea. Para o repique os zoósporos foram coletados, diluídos 1:10 em água *milliQ* estéril e semeados em outra placa.

2 – Linhagens e plasmídeos

2.1 – Cepas de *Escherichia coli*

DH5α - *supE44 lacU169 (80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1*.

2.2 – Vetores de clonagem e expressão

pSPORT 1 – vetor de clonagem (Invitrogen)

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 e Invitrogen

T4 DNA ligase - New England Biolabs e Invitrogen

T4 polinucleotídeo quinase – New England Biolabs

Random primer – Rediprime II kit – Amersham

Big Dye Terminator Sequencing Kit - Applyed Biosystems

4 – Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Invitrogen, Promicro e Sinapse.

4.1 - Reações de seqüenciamento

T7 (*forward*) - 5´ TAATACGACTCACTATAGGG 3´

SP6 (*reverse*) - 5´ ATTTAGGTGACACTATAG 3´

Hsp70FOW - 5´ GTGCCCGTCGAGGAGAAC 3´

Hsp70FOW2 - 5´ GACTTCAAGAAGCGCACG 3´

Hsp70REV - 5´ ATGACCGTGACAAAGTGG 3´

5 – Meios de cultura

As linhagens de *E. coli* foram crescidas a 37°C em meio LB (triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%; pH 7,5) ou SOB (triptona 2%; extrato de levedura 5%; NaCl 0,06%; KCl 0,02%; pH 6,8). Quando necessário foi adicionada ampicilina (100 µg/mL). Os meios sólidos continham ágar 1,5%.

Para crescimento diário de *B. emersonii* foi utilizado o meio PYG-ágar. Para experimentos que necessitaram de grande quantidade de células foi utilizado o meio líquido PYG-P (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,15%; KH_2PO_4 2,5 mM; K_2HPO_4 2,5 mM; pH 6,8).

Para o crescimento sincronizado das células de *B. emersonii* foi utilizado o meio definido DM4 (Maia & Camargo, 1974), composto por $CaCl_2$ 1 mM; $MgSO_4$ 10 mM; $FeSO_4.7\ H_2O$ 0,6 µg/mL; $CuSO_4.5\ H_2O$ 0,1 µg/mL; $ZnSO_4.7\ H_2O$ 0,2 µg/mL; $MnSO_4.H2O$ 0,2 µg/mL; glicose 0,33%; tiamina 0,04 µg/mL; glicina 0,2 mM; L-histidina 0,13 mM; L-isoleucina 0,4 mM; L-lisina HCl 0,4 mM; L-metionina 0,1 mM; L-fenilalanina 0,2 mM; L-serina 0,2 mM; L-treonina 0,4 mM; L-triptofano 0,04 mM; L-tirosina 0,2 mM; L-valina 0,4 mM; L-arginina 0,24 mM; ácido glutâmico 2,7 mM; extrato de levedura 120 µg/mL; NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 1 mM pH 6,8; tampão Tris-maleato 3,5 mM; pH 6,8. O pH do meio foi ajustado com KOH 1 M e a concentração final de K^+ foi ajustada para 50 mM com KCl 1 M.

6 – Condições de cultivo sincronizado de *B. emersonii* para preparação de RNA total ou extração de proteínas totais

Para a obtenção de amostras sincronizadas durante a fase de esporulação 2 x 10^5 zoósporos/mL, oriundos de crescimento em PYG-ágar, foram inoculados em meio DM4 e a cultura foi incubada durante 16 h a 16°C sob agitação de 150 rpm. A contagem dos zoósporos foi feita em Câmara de Neubauer após a fixação em solução de formaldeído 3,5% saturada com $CaCO_3$. As células vegetativas obtidas foram coletadas por filtração através de uma tela Nytex, lavadas em solução de esporulação (Tris-maleato 1 mM, pH 6,8 contendo $CaCl_2$ 1 mM), e ressuspensas na mesma solução a uma densidade de 3,2 x 10^5 células/mL. As células foram então incubadas a 27°C sob agitação de 150 rpm até a liberação total dos zoósporos (aproximadamente 3,5 h). Em diferentes tempos após a indução da esporulação, alíquotas de células foram coletadas para

extração do RNA total ou de proteínas totais (0, 30, 60, 90 e 120 min). Foram seguidos os mesmos procedimentos para a obtenção de amostras durante as fases de esporulação e germinação, sendo que para esta última fase foi necessária a posterior obtenção de zoósporos. Os novos zoósporos foram inoculados em meio DM4 a uma concentração de 2×10^6 células/mL e a cultura foi incubada sob agitação de 150 rpm. As alíquotas de células para extração do RNA total ou de proteínas foram coletadas a 30, 60, 90 e 120 min após a indução da germinação. Para a obtenção de RNA total ou extrato protéico de células submetidas a estresses culturas sincronizadas de *B. emersonii* foram submetidas ao choque térmico (38°C) e cádmio ($CdCl_2$ 50 μM, 100 μM e 200μM) em diferentes períodos de seu desenvolvimento.

O progresso e a sincronia dos cultivos foram acompanhados tomando-se amostras de células e examinando-as ao microscópio óptico para a observação das transições fenotípicas descritas para estas etapas: de célula vegetativa a célula papilada e esporângio vazio para a esporulação, e de zoósporo a célula germinativa para a germinação.

7 – Construção de bibliotecas de cDNA a partir de células submetidas a estresses

Para a construção das bibliotecas de cDNA, RNA total foi extraído de células de *B. emersonii* submetidas a estresse térmico (38°C - HSR) ou a cádmio ($CdCl_2$ 50 μM - CDM) dos 30 aos 60 min após a indução da esporulação. Para a construção da terceira biblioteca de cDNA, RNA total foi extraído de células de *B. emersonii* submetidas a cádmio ($CdCl_2$ 100 μM - CDC) dos 60 aos 90 min após a indução da esporulação.

7.1 – Extração de RNA total e isolamento de mRNA de culturas de *B. emersonii*

A extração de RNA total foi realizada utilizando o reagente Trizol LS (Invitrogen). As células foram coletadas por filtração em papel Whatman Nº 1 e em seguida foram retiradas do papel (células em esporulação) ou juntamente com o papel (células em germinação) foram colocadas em cadinho de porcelana previamente esterilizado a 180ºC e resfriado em banho de gelo seco. As células foram então maceradas na presença de nitrogênio líquido e de Trizol (2×10^7 células/1,5 mL Trizol). A mistura congelada foi então aquecida em banho a 65ºC até dissolver. A seguir foram adicionados 500 μL de água *milliQ* tratada com DEPC (0,1%) previamente para a inativação de ribonucleases. A mistura foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente durante 5 min. A seguir foram adicionados 300 μL de clorofórmio e, após agitação vigorosa, as amostras foram incubadas novamente a temperatura ambiente por mais 3 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x *g* durante 15 min a 4ºC e a fase aquosa foi

precipitada com isopropanol (0,5 mL/mL Trizol) durante 10 min a temperatura ambiente, seguindo-se centrifugação a 12.000 x *g* durante 10 min a 4ºC. Os precipitados obtidos foram lavados com etanol 75% tratado com DEPC (0,1%) e foram secos a vácuo. O RNA total obtido foi ressuspenso em água *milliQ* e aquecido a 65ºC para total ressuspensão. A quantificação e a avaliação do grau de pureza foram feitos medindo-se a absorbância da amostra em λ=260nm e λ=280nm.

Para verificação da integridade do RNA uma alíquota de cada amostra foi diluída em tampão de amostra de RNA (formamida 0,66%; MOPS 0,13%; formaldeído 0,08%; azul de bromofenol 0,2%) contendo brometo de etídio e submetida à eletroforese em gel de agarose 1,5% - formaldeído 2,2 M. Após a eletroforese o gel foi observado sob luz ultravioleta (UV). O RNA poliA$^+$, foi isolado por cromatografia em coluna de oligo (dT)-celulose, seguindo as instruções do *Oligotex mRNA mini kit* (Qiagen).

7.2 – Construção das bibliotecas de cDNA

Três bibliotecas de cDNA foram construídas usando o kit *SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning* (Invitrogen), partindo de aproximadamente 1,25 µg dos mRNAs poli A$^+$ isolados, e seguindo as instruções do fabricante. Este sistema utiliza como vetor o plasmídeo pSPORT 1 e permite a clonagem unidirecional dos insertos, além de contar com o sistema de seleção por *lac*Z na presença de IPTG e X-gal. As bibliotecas de cDNA foram denominadas HSR (células submetidas a o choque térmico), CDM (células submetidas a $CdCl_2$ 50µM) e CDC (células submetidas a $CdCl_2$ 100µM - construída e seqüênciada por L. D. Navarro).

7.3 – Crescimento dos clones das bibliotecas de cDNA e preparação dos plasmídeos

Células de *E. coli* DH5α transformadas com as reações de ligação entre os cDNAs e o plasmídeo pSPORT1 foram plaqueadas em meio LB, contendo ampicilina 100 µg/mL, na presença de IPTG e X-gal. Aproximadamente 2000 colônias brancas (positivas) isoladas de cada biblioteca foram inoculadas em placas de 96 poços contendo 1 mL de meio Circle-grow (carbenecilina 200 µg/mL) por poço. As placas foram incubadas durante 22 h a 37ºC sob agitação de 200 rpm. Foram feitas réplicas de cada clone em glicerol (concentração final: 20%), que foram armazenadas a -80 ºC.

Após crescimento das culturas, os plasmídeos foram isolados de acordo com o procedimento descrito por Sambrook e colaboradores (1989) com modificações. As culturas foram centrifugadas a 2700 rpm, durante 8 min, a 20ºC. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com a solução GET (glicose 9%; EDTA 10mM; Tris-HCl 250µM; pH 8,0) 240 µL/poço. A

seguir foram acrescentados 90 µL de GET/RNase (GET acrescido de 150 µg/mL de RNAse A) em cada poço e, após suspensão das células, foram adicionados consecutivamente 60 µL de solução de lise (NaOH 0,2 M; SDS 1%) e 60 µL de solução de neutralização (acetato de potássio 3M; ácido acético glacial 1,5%). As placas foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min, transferidas para uma estufa a 90ºC por 90 min, e então colocadas no gelo por 40 min. Procedeu-se a centrifugação a 4.000 rpm durante 30 min a 4ºC e o sobrenadante foi transferido para uma placa de filtração MAGVN 2250 (Millipore) e o filtrado foi recolhido em 110 µL de isopropanol 100%, mediante centrifugação a 4.000 rpm durante 40 min a 4ºC. Os precipitados contendo o DNA foram lavados com etanol 70%, secos e suspensos em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

8 – Análise das seqüências isoladas

8.1 – Seqüenciamento dos cDNAs

Os plasmídeos purificados e conservados a –20°C foram descongelados. Alíquotas na concentração de 200-500 ng/mL, determinadas por absorbância em λ=260 nm, foram submetidas a reações de seqüenciamento pelo método de terminadores de cadeia (Sanger *et al.*, 1977), usando o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) e a seqüência determinada nos Sequenciadores ABI 377 ou ABI 3100 (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas em 1 ciclo de desnaturação a 96ºC por 2 min, seguido de 35 ciclos de 96ºC por 45 seg, 50ºC por 30 seg e 60ºC por 4 min. Como a clonagem do cDNA no plasmídeo pSPORT 1 é unidirecional, o seqüenciamento dos cDNAs foi realizado a partir da extremidade 5', utilizando-se o oligonucleotídeo universal T7.

8.2 – Processamento das seqüências

As seqüências expressas obtidas nas diferentes bibliotecas de cDNA foram processadas pelo pacote de programas ESTWeb (Paquola *et al.*, 2003; Figura 3). O ESTWeb utilizou a combinação dos programas PHRED (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998), Crossmatch e PHRAP (Green, 1996) ou CAP3 (Huang & Madan, 1999) para, respectivamente, atribuir os nomes às bases, mascarar o vetor usado e comparar as ESTs entre si para a formação de grupos prováveis de mRNAs provenientes dos mesmos genes (*contigs*). Neste caso foi utilizado o CAP3 para fazer o agrupamento, com os parâmetros padrão, que mostrou ter melhor consistência que o PHRAP para a formação dos grupos (Telles & Silva, 2001). O pacote também mascarou os adaptadores usados na construção da biblioteca, a cauda de poliA$^+$ e as bases de qualidade ruim, selecionando as seqüências de 150 ou mais bases contendo pelo menos 75 bases de boa qualidade em uma janela de

100. O mínimo valor de qualidade *Q* escolhido para a seleção foi *Q* = 15. O valor é atribuído pelo programa PHRED, onde *Q* = -10 log *p*, sendo *p* a probabilidade de erro (portanto, $p \leq 0{,}032$). Também informou possíveis contaminações de seqüências de outros organismos usando o algoritmo BlastN (Altschul *et al.*, 1997). As seqüências do DNA ribossomal e do DNA mitocondrial de *B. emersonii*, e de bactérias contaminantes (que tiveram pelo BlastN um *E-value* $\leq 10^{-20}$ e pelo menos 95% de identidade ao longo de 75 nucleotídeos) foram eliminadas da análise (Figura 3). As seqüências expressas referidas neste trabalho foram depositadas na seção EST do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), e receberam os número de acesso EE730389 a EE736848.

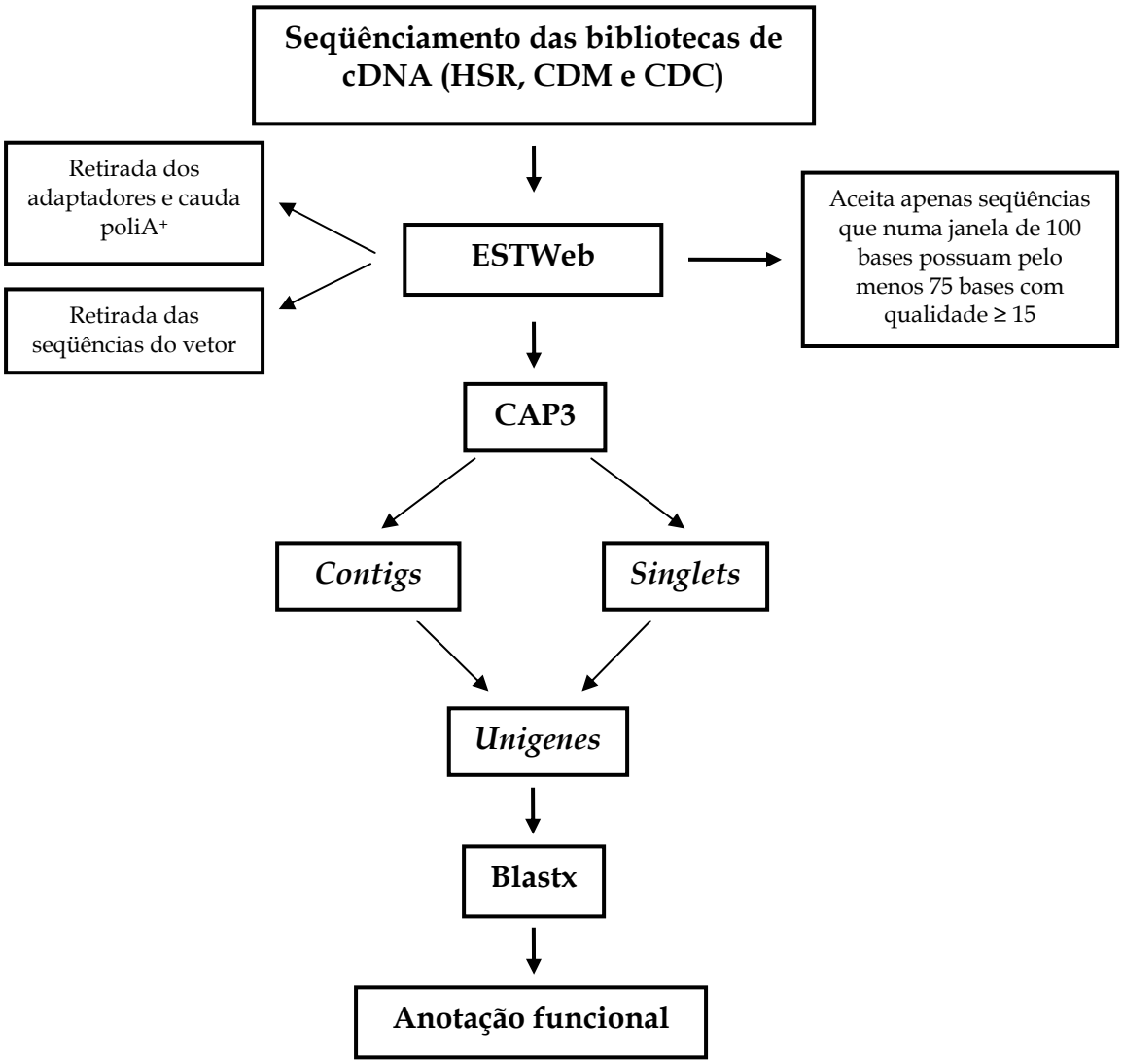


Figura 03 – Diagrama representando o processamento ao qual foram submetidas às seqüências isoladas das bibliotecas de cDNA.

8.3 – Anotação das seqüências

Como resultado do processamento das seqüências foram gerados grupos de seqüências superpostas, com probabilidade de serem mRNAs provenientes dos mesmos genes (*contigs*) e seqüências isoladas não incluídas em nenhum *contig* (*singlets*). A soma dos *singlets* e um representante de cada *contig* (*unigenes*) perfizeram o número de seqüências únicas que estariam sendo expressas (Figura 3). Os *unigenes* maiores do que 150 pb foram anotadas usando-se o algoritmo BlastX (Altschul *et al.*, 1997), por comparação com a base de dados não redundante (nr) do GenBank do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). As seqüências também foram anotadas contra a base de dados curada *Swiss-Prot and TrEMBL* disponível no *Swiss Institute of Bioinformatics* (http://www.expasy.org), atribuindo automaticamente os termos do *Gene Ontology Consortium* (GO) (http://www.geneontology.org). Na montagem da base de dados local utilizamos os dados anotados pelo GO para *Homo sapiens, Drosophila melanogaster, Arabidopsis thaliana, Oryza sativa, Caenorhabditis elegans, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe e Vibrio cholerae*, além de uma base de dados curada disponível na página do GO. Na pesquisa foi usada a matriz BLOSUM 62 e penalidades de 11 e 1 para a abertura e a extensão de lacunas, respectivamente. No caso da primeira anotação, os alinhamentos obtidos com um *Score* ≥ 55 (*Score* normalizado ou *bit score*) foram consideradas como identidades putativas (esse valor equivale aproximadamente a um valor esperado ou *E-value* ≤ 10^{-6} para o tamanho atual da base nr do GenBank) e, para a segunda anotação, foram considerados os alinhamentos obtidos com um valor esperado ≤ 10^{-6}.

9 – Preparo de células competentes para transformação por eletroporação

Uma colônia isolada de *E. coli* (DH5α) foi inoculada em 5 mL de meio SOB e incubada a 37°C, sob 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 densidade ótica (DO) 600nm entre 0,45 e 0,6. As células foram, então, centrifugadas a 7.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 mL de água *milliQ* estéril gelada. Novamente foram centrifugadas e lavadas com 100 mL de glicerol 10% estéril gelado e transferidas para tubos Falcon. Novamente as células foram centrifugadas por 10 min a 3.000 x *g* a 4°C e depois ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%. Alíquotas foram feitas com 30 μL de células e congeladas a –80°C.

10 – Transformação de *E. coli*

As células preparadas para eletroporação foram descongeladas em gelo. Foram utilizadas duas alíquotas para a transformação com cada biblioteca de cDNA, ou uma alíquota para a obtenção de clones isolados. Em cada caso, foram acrescentados até 5 µL de produto de ligação dialisado por cada alíquota de bactérias. A mistura foi colocada em uma cubeta de 0,1 cm de largura e em seguida submetida a eletroporação no aparelho *Gene pulser* (Bio-Rad), usando-se como condições 1,85 kV, 25 µF e 200 Ω. A seguir, as células foram recuperadas em 1 mL de SOC por 1 h a 37ºC sob agitação de 150 rpm e espalhadas em placa de LBA.

11 – Microarranjos de DNA

11.1 – Montagem dos microarranjos de DNA

Os insertos, provenientes das bibliotecas de cDNA HSR, CDM e CDC, foram amplificados por PCR (40 ciclos, hibridização a 51 ºC, volume final da reação: 100 µL), a partir dos clones de bactéria, utilizando-se os oligonucleotídeos universais T7 e SP6. Os produtos da amplificação foram purificados em placas de filtração Multiscreen da Millipore (MAFB NOB 50) e eluídos em 50 µL de tampão Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. Cada produto de PCR foi analisado em gel de agarose 1% para verificar a presença ou não de bandas.

Após estas etapas, os genes de *B. emersonii* foram arranjados em placas de 384 poços, na presença de DMSO (50% v/v), e então depositados em lâminas espelhadas do tipo 7 star (Amersham Biosciences) utilizando o *spotter* Generation III Microarray Spotter (Amersham Biosciences). A concentração final dos produtos de PCR a serem imobilizados na lâmina de vidro deveria estar entre 200-400 fmol/µL de DNA, sendo que cada ponto deveria ter no mínimo 100 pg de DNA. O aparelho permitiu a deposição de 4.608 amostras de DNA organizadas em 12 subconjuntos de 384 pontos (12 linhas x 32 colunas). O conjunto de 4608 pontos foi depositado em duplicata nas duas metades longitudinais da lâmina. Após a deposição dos fragmentos de DNA, as lâminas foram tratadas com 50 mJ de luz UV para fixar o DNA e armazenadas em dissecador com umidade relativa em torno de 5%.

Todos os clones presentes arranjados na lâmina, provenientes das bibliotecas acima citadas e das bibliotecas construídas por Ribichich e colaboradores (2005), foram seqüenciados novamente. Um total de 87% dos genes tiveram sua identificação putativa confirmada e os demais foram re-anotados de acordo com a classificação funcional do GO.

11.2 – Ensaios para avaliar a influência do choque térmico e cádmio nos fenótipos de *B. emersonii* nas fases de germinação e esporulação

Zoósporos de *B. emersonii* obtidos de placas de PYG-ágar foram transferidas para placas de cultura de células de 3,5 cm de diâmetro a uma concentração de 10^5 zoósporos/mL de meio DM4 em um volume final de 2,4 mL. As placas foram incubadas durante 30 min a 27ºC e, posteriormente, tratadas com cádmio ($CdCl_2$ 100 μM ou 200 μM) ou submetidas ao choque térmico (38°C) por 30 min. Após esse período, as células tratadas com cádmio foram lavadas três vezes com 2,4 mL de meio DM4 e mantidas na presença do meio até 6 h da indução da germinação. As células submetidas ao choque térmico, ao final de 30 min de tratamento, foram retornadas a temperatura de 27°C até 6 h da indução da germinação. Após esse período as células foram lavadas três vezes com 1,1 mL de solução de esporulação (SE) e foram induzidas a esporular em SE em um volume de 1,4 mL. Após a lavagem das células, as mesmas foram incubadas durante 30 min a 27ºC e, posteriormente, tratadas com cádmio ($CdCl_2$ 100 μM ou 200 μM) ou submetidas ao choque térmico (38°C) por 30 min. Após esse período as células que haviam sido tratadas com cádmio foram lavadas três vezes com 1,1 mL de SE e mantidas na presença desta solução até 36 h após a indução da esporulação. As células submetidas ao choque térmico, ao final de 30 min de tratamento, foram retornadas a temperatura de 27°C até 36 h após a indução da germinação.

11.3 – Síntese dos cDNAs e marcação com fluoróforos

A síntese e marcação de cDNAs foram feitas utilizando o *kit* Cy-Scribe Post Labelling (Amersham Biosciences). A síntese do cDNA foi feita a partir de 10 μg de RNA total, utilizando-se oligo-dT como iniciador, uma mistura de nucleotídeos, amino-alil dUTP, tampão 1 x, DTT e a transcriptase reversa Cy-Scribe nas quantidades recomendadas pelo fabricante. A reação foi mantida a 42°C por 3 h. Em seguida os RNAs foram degradados através de hidrólise alcalina e os cDNAs modificados com amino-alil dUTP foram purificados em placas de filtração Multiscreen da Millipore. A marcação dos cDNAs foi feita quando o CyDye NHS-éster reage com os grupos amino-alil incorporados no cDNA. Este acoplamento foi feito utilizando o Cy-Dye liofilizado, que foi suspenso em bicarbonato de sódio e incubado com o cDNA por 1 h a temperatura ambiente, protegido da luz. A reação foi interrompida através da adição de hidroxilamina e o cDNA marcado foi purificado em placas de filtração Multiscreen. O fluoróforo total incorporado foi quantificado medindo-se a absorbância a λ=550 nm (Cy3) e a λ=650 nm (Cy5). A quantidade de cDNA sintetizado foi medido pela absorbância a λ=260 nm.

11.4 – Hibridização nos microarranjos

As hibridizações foram realizadas na presença de tampão de hibridização 25% (GE Healthcare) e formamida 50% por 16 horas a 42 ºC. As lavagens foram feitas a 55°C com 1 x SSC, 0,2% SDS por 10 min, 0,1 x SSC, 0,2% SDS por 10 min, duas vezes, e 1 x SSC por 1 min. As lâminas foram secas com vapor de nitrogênio e a aquisição das imagens foi feita no Generation III Scanner (Amersham Biosciences). Imagens independentes foram obtidas para as amostras marcadas com Cy3 e Cy5, utilizando *laser* de λ=532 nm e λ=633 nm, respectivamente.

Todos os experimentos foram realizados com pelo menos três réplicas biológicas distintas (três extrações de RNA independentes) e cada gene foi depositado em duplicata nas lâminas de microarranjos, portanto, tem-se um total de seis réplicas para cada ponto.

11.5 – Quantificação dos sinais de fluorescência

Após a obtenção das imagens de cada lâmina, as intensidades de sinal de cada ponto foram extraídas utilizando o programa Array Vision 6.0 (Image Research). Para quantificar a intensidade de fluorescência do ponto utilizou-se a medida Median-based Trimmed Mean Density (MTMDens) que consistiu em uma medida de densidade, excluindo-se os *pixels* que apresentaram sinal acima ou abaixo de quatro desvios absolutos da mediana (MAD), permitindo a exclusão de *pixels* que apresentassem poeira ou artefatos de hibridização. A intensidade de fluorescência de cada ponto foi determinada como sendo o valor de MTMDens subtraindo-se a mediana do sinal de fundo. Pontos que apresentaram irregularidades foram marcados para exclusão nas etapas subseqüentes da análise dos dados.

12 – Análise dos dados dos microarranjos de DNA

12.1 – Normalização dos dados

A normalização dos dados deve ser realizada para corrigir diferenças na marcação e detecção dos fluoróforos e também diferenças na quantidade inicial de RNA das amostras referência e teste (Quackenbush, 2001; Yang *et al.*, 2002). Os dados foram normalizados utilizando-se o método LOWESS (*LOcally WEighted regreSSion*), que assumiu que a maioria dos genes não apresentou diferença entre as condições referência e teste, ou que as diferenças entre as duas condições foram contrabalançadas. A função LOWESS consiste em uma série de regressões lineares locais que se juntam para formar um ajuste global não-linear. A normalização foi feita no espaço M x S, onde M é a razão da intensidade de fluorescência das duas medidas para cada *spot* [M =

$\log2(I_{teste}/I_{referência})$] e S representa a média da intensidade total do *spot* [$S = \log2(I_{teste}/2 + I_{referência}/2)$].

12.2 – Determinação dos genes diferencialmente expressos

Para determinar a variabilidade experimental intrínseca aos experimentos de microarranjos de DNA, foram realizadas hibridizações homotípicas (*self-self*) independentes. Nestes experimentos a mesma amostra de RNA controle foi utilizada para a síntese de cDNA e marcação com os fluoróforos Cy3 e Cy5, e posteriormente hibridizados na lâmina de cDNA de *B. emersonii*.

Utilizou-se as hibridizações homotípicas para determinar a função densidade de probabilidade, testando a hipótese nula: "não há hibridização diferencial entre as amostras referência e teste". Este procedimento resultou na determinação dos limites superior e inferior, dependentes da intensidade, da variabilidade intrínseca ao experimento, tornando possível a aplicação desses limites a experimentos reais (Vêncio & Koide, 2005). Portanto, os genes que apresentaram razão de expressão consistentemente acima ou abaixo desses limites foram considerados diferencialmente expressos. O algoritmo utilizado está implementado no *website*: http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself.

Após definir o limite superior e inferior para os genes não diferencialmente expressos (curvas homotípicas), foram avaliados outros experimentos de microarranjos, realizados nas mesmas condições técnicas que os experimentos homotípicos. A curva homotípica foi ajustada utilizando-se os seguintes parâmetros: intervalo de credibilidade de 99%, passo 0,2 e janela 0,1. O resultado (M,S) de um determinado gene nos dados de interesse (não homotípicos) foi comparado às curvas da hibridização homotípica. Optou-se por considerar diferencialmente expressos apenas os genes que tivessem no mínimo quatro réplicas válidas e que apresentassem 80% das réplicas com valor M acima ou abaixo dos limites delimitados pelas curvas homotípicas.

13 – Determinação das categorias funcionais altamente representadas

Para encontrar as categorias funcionais altamente representadas utilizou-se a ferramenta denominada BayGO (http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/BayGO/) (Vêncio *et al.*, 2006), desenvolvida com o objetivo de encontrar categorias funcionais (de acordo com a terminologia do GO) altamente representadas em listas de genes diferencialmente expressos (Cavalieri & De Filippo, 2005). O programa resumiu os dados apresentando o número de genes em cada categoria funcional do GO e calculou a medida de associação entre "ser diferencialmente expresso" e "pertencer a uma dada categoria GO". Esta medida de associação, denominada *G*, foi calculada como descrito por

Goodman & Kruskal (1954). Uma categoria foi considerada como altamente representada se o valor da probabilidade $P \geq 0,05$.

14 – RT-PCR quantitativo em tempo real

Os oligonucleotídeos específicos para os genes selecionados foram desenhados utilizando-se o programa Primer Express 2.0 (Applied Biosystems). As seqüências correspondentes estão listadas na tabela 1. Este programa otimizou o desenho dos oligonucleotídeos para a reação de RT-PCR quantitativo em tempo real, considerando-se que o produto de PCR deveria ter entre 50 e 150 pb e sua temperatura de dissociação deveria ser em torno de 80°C. As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o *kit* Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) em um equipamento GeneAMp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

5 µg de RNA total, previamente tratado com DNase, foram utilizados para produzir os cDNAs, utilizando-se 200 U de transcriptase reversa SuperscriptII (Invitrogen), 50 ng de oligonucleotídeos aleatórios, 250 ng de oligo-dT, 2,5 mM de dNTPs, 10 mM de DTT, 40 U de RNAse OUT e tampão 1 x da transcriptase reversa. Os cDNAs obtidos foram diluídos em água *milliQ* para a concentração final de 2 ng/µL. Em seguida, foi realizada a reação de PCR utilizando-se 10 ng de cDNA como molde, 800 nM dos oligonucleotídeos direto e reverso e 10 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), sob os seguintes parâmetros: 50ºC por 2 min, 95ºC por 10 min, 40 ciclos de 95ºC por 15 seg e 60ºC por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas pelo aparelho.

Tabela 01 – Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR quantitativo.

Clone ID	Gene putativo	Oligo direto (5' - 3')	Oligo reverso (5' - 3')
BeE120N26B11	Cystinosin	GCGTCCTCGACATTATGAACTTC	ATCTGCGGGATGTACTTGATGA
BeE120N37A02	Glutathione S-transferase 1	AGGTCGAGTACCCGGACATG	GAACTTGACCCAGTCCTTTTCG
BeE60C17C02	Metal homeostasis protein	GCCGTGTCGAGATGATCGA	TTGGTTGAGGAGAGCGAAAAG
BeE60H06D11	Hsp17	GGCGTCCTGTGCATCGA	ACACAAAACGCCTACTGGATCTC
BeE60H26A05	Related to phosphatidylserine decarboxilase	GTTCCCGCTGACCAACAAGA	AGACGAGGCGCAGGATGA
BeE60H30A07	Psi1	GCGTCTTCATCATGGACAACTG	GAGTCGACGATGCCCTTGAC
BeE60H30D04	Mitochondrial RNA helicase-like protein	ACTCGGGATACGACGTGCTT	GATGCGGTTGATGGAGAGGTT
BeE60N04D09	Pirin-like protein	TTATGGTCACGGGAGCATTTG	CAGATCGCCAGCGTCGAT
BeE90D07E02	NADH-dependent flavin oxidoreductase	TCCACTACCTCGACCAGTACATGT	GAGTTTATTAAGCGCGAGGAGCTA

Para normalizar a quantidade de RNA total para cada uma das amostras, utilizou-se o gene correspondente a uma RNA helicase mitocondrial putativa, uma vez que foi verificada que a expressão deste gene não se alterava nos diferentes experimentos de microarranjos de DNA. O valor da razão de cada um dos cDNAs testados foi calculado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Foram realizados dois experimentos biológicos independentes para cada gene.

15 – Extração de DNA de *B. emersonii*

Para a obtenção de zoósporos em grandes quantidades, cerca de 7 x 10^7 zoósporos obtidos de placas de PYG-ágar foram inoculados por litro de PYG-P. A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer, diluindo-se os zoósporos 1:10 em solução de formaldeído 3,7% saturada com $CaCO_3$. A cultura permaneceu por aproximadamente 16h a 22°C sob agitação de 150 rpm, quando, então, as células vegetativas foram coletadas por filtração em rede de náilon (30 μm de poro) e lavadas com 1,4 L de solução de esporulação.

A seguir as células foram ressuspensas em 600 mL desta solução e incubadas a 27°C, sob agitação de 150 rpm até o desenvolvimento e liberação dos zoósporos. Os zoósporos foram separados dos esporângios por filtração em rede de náilon, sendo os zoósporos concentrados por centrifugação a 4.000 rpm por 5 min.

Os zoósporos obtidos (aproximadamente 2,3 x 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 (3:1). A mistura foi agitada por 30 min a temperatura ambiente e centrifugada a 4.500 rpm por 20 min. À fase aquosa coletada foram adicionados 40 mL de etanol 100% gelado, incubando-se por 30 min em gelo seco. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm a 4°C por 15 min e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado final foi ressuspenso em 4 mL de uma solução 1 x SSC e dialisado contra 0,1 x SSC a 4°C durante a noite. A seguir adicionou-se ao próprio conteúdo da membrana de diálise 0,2 mL de 20 x SSC (NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M) e as enzimas α-amilase IIA 200 μg/mL, RNAse A 400 μg/mL e RNAse T1, 280 U. O tratamento com as enzimas foi feito a 37°C dialisando-se a amostra contra 1 x SSC. Após três horas de incubação, mediu-se a absorbância em λ=260nm do tampão de diálise para verificar a saída dos nucleotídeos livres gerados pela digestão com as RNAses. O tampão de diálise foi trocado seguidamente até que se obtivesse um valor de absorbância em λ=260nm próximo a zero. A seguir foram adicionados 350 μg/mL de pronase e incubou-se por 2 h a 37°C.

A solução foi então misturada com fenol saturado em tampão B (Tris HCl 0,5 M pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 10 mM; SDS 0,5%) e agitada por 15 min a temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4.500 rpm por 20 min. À fase aquosa coletada foram adicionados 40 mL de etanol gelado, e incubou-se por 30 min em gelo seco. A suspensão foi centrifugada em a 8.000 rpm, 4°C, por 15 min e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de 0,1 x SSC e dialisado contra 0,1 x SSC a 4°C durante a noite. A solução contendo o DNA foi estimada medindo-se a absorbância em λ=260nm, assumindo-se que quando a absorbância = 1, a concentração de DNA seria de 50 μg/mL.

16 – *Southern blot* genômico

Aproximadamente 10 μg de DNA total extraído de zoósporos de *B. emersonii* foram digeridos com diferentes enzimas de restrição e com combinações duplas dessas enzimas, durante 4 h a 37°C. O volume total da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl 89 mM, pH 8,0; ácido bórico 89 mM; EDTA 20 mM) a 80 V. O resultado da digestão foi visualizado com luz ultravioleta na presença de tampão contendo brometo de etídeo e fotografado. Após a eletroforese, o gel foi tratado com solução de depurinação (HCl 250 mM) por 15 min, seguido por solução de desnaturação (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) por 20 min, a seguir com solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 1,5 M) 20 min, sob agitação e, ao final, com 10 x SSC por 5 min.

Após o tratamento do gel, o produto das digestões foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond N, Amersham) embebida em 10 x SSC mediante pressão positiva, utilizando o sistema de transferência Posiblot (Stratagene) durante 1 hora sob 75 mmHg de pressão. A seguir a membrana foi seca por 10 min 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 (tampão fosfato de potássio 60 mM pH 6,2, contendo SSC 2 x, EDTA 10 mM, SDS 0,1%, formamida 50% e leite em pó desnatado 5%) por no mínimo 30 min a 42°C sob agitação em forno de hibridização (Hybaid). Ao final desse tempo a sonda radioativa (marcada de acordo com o item III-18), previamente desnaturada durante 5 min a 94°C, foi adicionada a essa solução, que foi incubada durante 16 h a 42°C. Após esse período a solução de hibridização contendo a sonda foi retirada e foram feitas três lavagens a 42°C, com duração de 30 min cada, primeiramente com solução SSC 2 x; SDS 0,1%, depois com SSC 0,5 x; SDS 0,1% e por último com SSC 0,1 X; SDS 0,1%. Após as

lavagens a membrana foi exposta a filme de raios-X (X-Omat, Kodak) em cassete com tela intensificadora a -80°C.

17 – 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, ou tratadas com choque térmico e cádmio, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão MOPS 1 x contendo 2,2 M de formaldeído. As amostras de RNA misturadas ao tampão de amostra para RNAs (item III-7.1) foram aquecidas por 10 min a 65°C e aplicadas no gel. Após aproximadamente 3 h de eletroforese a 100 V, 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 M de NaOH durante 30 min sob agitação lenta e depois tratado com uma solução Tris-HCl 100 mM pH 7,5 e NaCl 150 mM nas mesmas condições. Os RNAs do gel foram transferidos por pressão com SSC 10 x, utilizando o sistema de transferência da Posiblot (Stratagene) para uma membrana de náilon (Hybond N+, Amersham), durante 2 horas sob 75 mmHg de pressão. As membranas foram secas por 10 min a 80°C e os RNAs transferidos para a membrana foram fixados por exposição à luz ultravioleta.

Após a fixação dos RNAs as membranas foram incubadas em solução de pré-hibridização (Na_2HPO_4 120 mM pH 7,2; NaCl 250 mM; EDTA 1 mM; formamida 40% ; SDS 7%) por no mínimo 1 hora a 42°C sob agitação em forno de hibridização (Hybaid). Ao final desse tempo a sonda radioativa, previamente desnaturada durante 5 min a 94°C, foi adicionada a essa solução e incubada durante uma noite a 42°C sob agitação.

Após esse período a solução de hibridização contendo a sonda foi retirada e as membranas foram lavadas em três etapas de 30 min cada a 42°C: SSC 2 x, SDS 0,1%; SSC 0,5 x, SDS 0,1%; SSC 0,1 x, SDS 0,1%. Após a lavagem as membranas foram expostas a filmes de raios-X Hyperfilm (Amersham) em cassete com tela intensificadora, por no mínimo um dia a –80°C.

18 – Preparação de sonda radioativa

A marcação de sondas radioativas foi feita pela técnica de síntese por oligonucleotídeos de seqüências aleatórias (*random primed synthesis*) (Feinberg & Volgestein, 1984) e, para isso, foi utilizado o *kit* Redi-prime II (Amershan Pharmacia) conforme as especificações do fabricante. A reação foi incubada por, no mímino, 1 h 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 tampão STE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM e NaCl 100 mM) ou utilizou-se o *kit* QIAquick nucleotide removal (Qiagen).

19 – Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose

Para isolar fragmentos de interesse para clonagem ou uso como sonda cerca de 5-10 μg de plasmídeo foram digeridos em um volume total de 50 μL, conforme descrito anteriormente (item III-16). O DNA digerido foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1 x (Tris-HCl 89 mM pH 8,0; EDTA 20 mM; ácido bórico 89 mM). Após a eletroforese o gel foi corado em uma solução contendo brometo de etídeo e a banda correspondente ao fragmento de interesse foi visualizada sob luz ultravioleta. Duas incisões foram feitas usando um bisturi imediatamente acima e abaixo da banda de interesse. Nessas incisões foram colocados dois pedaços de papel de filtro carregado positivamente - Whatman DE81 (Millipore) - com o auxílio de pinças. O gel foi submetido a mais alguns min de eletroforese e então foi possível notar que a banda de interesse ficou retida no papel posicionado logo abaixo dela. O papel foi então retirado do gel e colocado em um tubo *eppendorf* contendo 500 μL de tampão TE-NaCl (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; NaCl 1 M) e 10 μg de tRNAs de levedura. Agitou-se vigorosamente por 10 seg e incubou-se à temperatura ambiente no mínimo 1 h. Após a incubação o tubo *eppendorf* foi centrifugado a 12.000 x *g* por 10 min à temperatura ambiente. Recuperou-se o sobrenadante e procedeu-se a uma purificação com fenol, fenol/clorofórmio (v/v) e clorofórmio. Após a purificação foram adicionadas duas vezes o volume de etanol 100% para a precipitação do DNA, seguida de centrifugação a 12.000 x *g* por 15 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante, lavou-se a amostra com 500 μL de etanol 70% e repetiu-se a centrifugação. Descartou-se novamente o sobrenadante e o precipitado de DNA foi então seco sob vácuo e centrifugado durante 5 min. O DNA de interesse foi então ressuspenso em 20 μL de tampão TE e agitado vigorosamente por 10 seg.

20 – Indução, purificação e quantificação de proteínas recombinantes

20 mL de um pré-inóculo de bactérias contendo os clones de interesse crescidos durante a noite foram adicionados a 2 L de LBA. As bactérias foram crescidas a 37°C, sob agitação de 200 rpm, até atingirem absorbância igual a 0,6 no λ=600nm, quando, então, foi adicionado IPTG até a concentração final de 0,6 mM. A cultura foi incubada por 3 h, tempo em que se verificava o maior acúmulo das proteínas de interesse. As bactérias foram recolhidas por centrifugação e ressuspensas em um tampão de lise (Tris HCl 50 mM, pH 7,5; imidazol 20 mM; PMSF 1 mM) na proporção de 4 vezes o peso molhado das bactérias, que foram sonicadas em sonicador Branson, na potência 4, em

8 pulsos de 20 seg, com intervalo de 40 seg. Após a sonicação a mistura foi centrifugada por 20 min a 4.500 x *g* e separada em duas frações: precipitado e sobrenadante. Uma alíquota de cada fração foi aplicada em gel *SDS-PAGE* para verificar se a proteína recombinante encontrava-se no precipitado (insolúvel) ou no sobrenadante (solúvel).

20.1 – Solubilização de proteínas em corpos de inclusão

Para solubilizar a proteína a partir de corpos de inclusão, procedeu-se primeiramente a lavagem dos debris celulares usando-se 10 mL de tampão A por precipitado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; KCl 100 mM; glicerol 10%; imidazol 20 mM) com 2% de DOC. Incubou-se por 10 min a temperatura ambiente e centrifugou-se por 10 min a 4°C e 4.500 x *g*. Descartou-se o sobrenadante e lavou-se mais 4 vezes. Para solubilizar as proteínas cada precipitado foi incubado por mais 10 min à temperatura ambiente com 10 mL de tampão A com 0,3% de sarcosil. Após a incubação centrifugou-se por 20 min a 4°C e 4.500 x *g*. O sobrenadante foi, então, recuperado e o volume foi aumentado em mais um volume com tampão A. Para retirar o sarcosil da amostra, o sobrenadante foi dialisado contra 2 L de tampão A a 4°C, efetuando-se 2 trocas. A amostra foi, então, concentrada em Centriprep-10.000 (Amicon) até um volume aproximado de 5 mL.

20.2 – Dosagem de proteínas por Bradford

Para cada 800 μL de amostra contendo proteínas previamente diluídas em água desionizada ou padrão de BSA com concentrações conhecidas, adicionou-se 200 μL de reativo de Bradford (Bio-Rad). Após misturar bem, incubou-se por 5 min a temperatura ambiente. A leitura espectofotométrica foi feita no λ=595 nm. Primeiramente fez-se a curva padrão com a proteína BSA nas concentrações de 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg/mL e, após traçada a curva, leu-se a amostra de interesse.

21 – Produção de anticorpos policlonais

Para a produção de anticorpos policlonais foram utilizadas duas coelhas de aproximadamente 3 meses de idade e 4 kg de peso. Antes do primeiro inóculo da proteína recombinante, 5 mL de sangue de cada coelha foram recolhidos e incubados a 37°C para a completa coagulação. O soro foi separado centrifugando-se por 10 min a 2.000 x *g*, aliquotado e congelado a -20°C (pré-imune). Para o primeiro inóculo, utilizou-se aproximadamente 0,5 mg de proteína diluída em 0,5 mL de tampão PBS misturada a 0,5 mL de adjuvante de Freund completo (Sigma). Essa mistura foi imediatamente injetada próxima às patas traseiras em cada uma das coelhas. Após

3 semanas um segundo inóculo foi feito com 0,5 mg de proteína também diluída em 0,5 mL de tampão PBS, mas agora misturada a 0,5 mL de adjuvante de Freund incompleto, e injetado em cada coelha. Após duas semanas da administração do segundo inóculo 5 mL de sangue foram colhidos e o soro foi separado da mesma forma que o pré-imune e testado por *Western blot* contra extrato total de proteínas extraídas de *B. emersonii*.

Os *Western blots* foram feitos com diferentes diluições dos soros obtidos das duas coelhas (anticorpo primário) para a verificação da titulação destes anticorpos, incubados com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina e revelados com NBT/BCIP.

22 – Extrato de proteínas

Para a extração de proteínas totais foram utilizadas células coletadas de cultivos sincronizados (item III-6) em diferentes tempos após a indução de esporulação e da germinação, tanto à temperatura fisiológica (27°C) quanto durante o choque térmico (38°C). Previamente foram distribuídos 5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 100% em tubos Falcon de 50 mL em gelo. 45 mL de cultura coletados de cada ponto foram adicionados em tubos Falcon contendo TCA até a concentração final de 10%, misturados por inversão e incubados por, no mínimo, 30 min em gelo, seguido de centrifugação a 1.500 x *g* por 10 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados por inversão e os precipitados foram ressuspensos em 1,5 mL de NaOH 0,3 M e depois acrescentou-se 3,6 mL de água *miliQ*. Durante todo o processo os tubos foram mantidos em gelo. As células foram sonicadas em 4 ciclos de 20 seg cada, com intervalos de 40 seg em Sonicador Branson na potência 4 (20%). As células foram checadas ao microscópio para verificação de seu rompimento. Para os zoósporos somente 2 pulsos de sonicação foram necessários, pois estas células não possuem parede de quitina.

Após a sonicação adicionou-se 0,5 mL de TCA 100% e 5,5 mL de TCA 10%. Esta mistura foi incubada em gelo durante 30 min. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 1.500 x *g* durante 5 min a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados, o precipitado foi lavado com duas vezes o volume de etanol 100% gelado (11 mL) e novamente centrifugado. O sobrenadante foi descartado e a lavagem com etanol foi repetida. Após o segundo sobrenadante ter sido descartado, o precipitado foi lavado com o mesmo volume (11 mL) de uma mistura clorofórmio/metanol (v/v) gelado. Após, os tubos foram centrifugados a 1.500 x *g* durante 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi seco a vácuo e ressuspenso, por maceração, em aproximadamente 1 mL de tampão de amostra 2 x (Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2,3%; glicerol 10%; DTT 1 mM; azul de bromofenol 0,01%).

23 – *SDS-PAGE* e *Western blot*

Para a eletroforese de proteínas foi usado o método descrito por Laemmli (1970). O gel de separação conteve uma solução de poliacrilamida a 12% e o gel de empilhamento 4,5%. As amostras de proteínas dissolvidas em tampão de amostra 2 x concentrado foram aquecidas a 100°C durante 3 min e depois centrifugadas por 5 min a 12.000 x *g* a temperatura ambiente. Após a centrifugação foi adicionado DTT 1M até a concentração final de 100 mM. A eletroforese foi feita em tampão Tris-Glicina/SDS 1 x (Tris-base 0,3%; SDS 0,1%; Glicina 1,44%) a 200 volts durante aproximadamente 45 min. Após, o gel foi fixado em uma solução de coloração (0,2% de Coomassie brilhante blue R-250 em etanol 50% e ácido acético 10%) durante 10 min a 80°C. As bandas de proteínas foram visualizadas pela adição da solução de descoloração (etanol 30%; ácido acético7%), sob agitação, efetuando-se várias trocas.

Para o *Western blot* o gel foi colocado em tampão para transferência semi-seca (Tris-base 25mM; glicina 126 mM; etanol 20%) e, além disso, nesta mesma solução, foram colocados seis papéis de filtro e a membrana de nitrocelulose previamente cortados no tamanho do gel. A transferência foi feita por 50 min a 45mA, utilizando-se o sistema Multiphor II (Amersham-Phamacia).

A membrana foi corada com corante Ponceau S (0,1% de Ponceau S em 10% de ácido acético) para visualização das bandas protéicas, que foram transferidas e descoradas com água destilada. A membrana foi bloqueada com TBS-Leite (leite desnatado 5%; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM) durante 30 min sob agitação. Após o bloqueio a membrana foi incubada com 8 mL de TBS-Leite e anticorpo primário (título 1:250) durante 16 horas a 4°C, sob agitação.

A membrana foi lavada, sob agitação, com TBS-Tween (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%) por quatro vezes de 5 min e uma vez com TBS por 10 min a temperatura ambiente. Após as lavagens a membrana foi incubada com 5 mL de TBS-Leite com anticorpo secundário anti-IgG de coelho (1:30.000) conjugado com fosfatase alcalina, durante uma hora, a temperatura ambiente, sob agitação. Após a incubação a membrana foi lavada com TBS-Tween por quatro vezes de 5 min e com TBS por 10 min sob agitação, a temperatura ambiente. Para a revelação com fosfatase alcalina foram utilizados 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; $MgCl_2$ 5 mM).

24 – Identificação de novos genes putativos da família Hsp70 em *B. emersonii*

Com o intuito de verificar a presença de novos genes *hsp70* putativos em *B. emersonii*, uma base de dados local (BDH70 – Base de Dados Hsp70s) foi construída usando seqüências protéicas

de Hsp70s de diferentes organismos disponíveis na base de dados do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov). Para a obtenção dos *unigenes* putativos totais de *B. emersonii* as ESTs provenientes do seqüenciamento de bibliotecas de cDNA a partir de células de diferentes fases do ciclo de vida de *B. emersonii* (Ribichich *et al*., 2005; número de acesso na base de dados de ESTs do NCBI - CO961503 a CO978552), conjuntamente com as ESTs provenientes do seqüenciamento das três bibliotecas de cDNA de células submetidas a estresses foram agrupados utilizando-se o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). Esses *unigenes* foram alinhados usando-se a ferramenta BlastX (Altschul *et al*., 1997) contra a base BDH70 e aceitos como candidatos a genes da família Hsp70 os *unigenes* que obtiveram um *E-value* ≤ 10^{-20}. Posteriormente, os *unigenes* candidatos foram checados manualmente quanto à presença de domínios característicos da família Hsp70, sendo submetidos ao pacote de programas do INTERPRO (http://www.ebi.ac.uk/InterProScan) ou do Pfam (http://www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam).

25 – Identificação de proteínas putativas da família Hsp70 em outros genomas de fungos e comparação de seqüências das Hsp70 de *B. emersonii*

Além da busca por novos cDNAs codificando proteínas Hsp70 em *B. emersonii*, foi realizada também uma busca por proteínas Hsp70 em genomas fúngicos disponíveis e totalmente sequenciados. Diferentes bases de dados locais foram construídas usando-se seqüências protéicas de *Ustilago maydis*, *Neurospora crassa*, *Aspergillus nidulans* e *Magnaporthe grisea* disponibilizadas no site do FIG (**F**ungal **G**enome **I**nitiative - http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi) e na base de dados do NCBI. Todas as proteínas Hsp70 de *Saccharomyces cerevisiae* (usado como modelo porque possui a melhor família de Hsp70 caracterizada em fungos) foram alinhadas contra as bases de dados locais dos fungos acima descritos, usando-se o programa BlastP. As proteínas que apresentaram, após a comparação de seqüências, um *E-value* ≤ 10^{-20} foram aceitas como putativas Hsp70s. Como a base de dados de *Schizosaccharomyces pombe* (http://www.genedb.org/genedb/pombe) está totalmente anotada, não foi necessária a construção de uma base de dados local para esse fungo e foi realizada apenas uma busca funcional por proteínas da família Hsp70.

Na busca por ortólogos, foram comparadas as dez Hsp70 putativas de *B. emersonii*, utilizando-se o programa BlastP contra os bancos de dados de *U. maydis*, *N. crassa*, *A. nidulans* e *M. grisea*, bem como contra os bancos de dados de *S. cerevisiae* e *S. pombe* disponíveis na base de dados do NCBI. Foram aceitos como pares de ortólogos aqueles que apresentaram um *E*-value ≤ 10^{-5}.

26 – Análise filogenética

As seqüências dos cDNA de interesse foram traduzidas e as seqüências de aminoácidos deduzidas foram alinhadas com outras seqüências obtidas do GenBank usando-se o programa ClustalW versão 1.82 (Thompson *et al.*, 1994; http://www.ebi.ac.uk/clustalw). Os alinhamentos foram revisados manualmente e foram feitas árvores baseadas no algoritmo de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*), usando o pacote de programas MEGA versão 3.1 (Kumar *et al.*, 2004; http://www.megasoftware.net) e o teste de amostragem (*bootstrap*) (Felsenstein, 1985) sobre 1.000 repetições, para estimar o suporte da árvore obtida.

27 – Identificação de seqüências intrônicas

Para a realização da busca de íntrons todas as ESTs obtidas do seqüenciamento das bibliotecas HSR, CDM e CDC foram agrupadas utilizando-se o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) Os *unigenes* obtidos foram alinhados utilizando-se o algoritmo BlastN contra o banco de dados de ESTs provenientes do sequenciamento de bibliotecas de cDNA a partir de células de diferentes fases do ciclo de vida de *B. emersonii* (Ribichich *et al.*, 2005; http://blasto.iq.usp.br). Os *unigenes* que apresentavam regiões de total identidade intercaladas por regiões de nenhuma similaridade e/ou identidade foram selecionados para posterior análise. Foi realizada uma busca manual por junções de *splicing* conservadas (5′ éxon...**GT**...íntron – íntron...**AG**...éxon 3′) nas regiões que flanqueavam as possíveis seqüências intrônicas e uma busca por seqüências similares às seqüências consenso de sítios de ramificação (PuCTNAC – Fietto, 2001) presentes dentro do íntron.

IV - RESULTADOS

1 – Bibliotecas de cDNA de *B. emersonii* submetida a estresses

1.1 – Construção, seqüenciamento e processamento das bibliotecas de cDNA de estresse

Foram construídas três bibliotecas de cDNA a partir de mRNA extraído de células de *B. emersonii* submetidas a choque térmico ou exposição a cádmio durante a esporulação. A fase de esporulação foi escolhida para essa análise, pois após o tratamento com choque térmico, este era estágio do desenvolvimento de *B. emersonii* que apresentava o maior número de diferentes proteínas Hsp induzidas (Bonato *et al*., 1987). Uma das bibliotecas de cDNA foi construída a partir de mRNA extraído de células submetidas a choque térmico a 38°C por 30 min (HSR) e as duas outras bibliotecas de cDNA foram construídas a partir de mRNAs extraídos de células tratadas com cádmio ($CdCl_2$) nas concentrações de 50 μM (CDM) e 100 μM (CDC) por 30 min (Tabela 2). Estas concentrações de cádmio foram selecionadas porque estudos anteriores, nos quais a síntese de proteínas foi analisada em géis unidimensionais, mostraram que estas eram as concentrações que apresentavam o maior número de proteínas induzidas. Além disso, o padrão de síntese de proteínas apresentava mudanças quando as células eram tratadas com diferentes concentrações de cádmio, bem como quando eram submetidas à mesma concentração de cádmio, porém em diferentes estágios do desenvolvimento de *B. emersonii* (Stefani & Gomes, dados não publicados).

Tabela 02 - Bibliotecas de cDNA de *B. emersonii*.

Biblioteca	Condição de obtenção do mRNA
HSR	Células 30 min após a indução da esporulação, submetidas ao choque térmico (38°C) por 30 minutos.
CDM	Células 30 min após a indução da esporulação, tratadas com $CdCl_2$ 50 μM por 30 minutos.
CDC	Células 60 min após a indução da esporulação, tratadas com $CdCl_2$ 100 μM por 30 minutos.

O seqüenciamento dos clones das três bibliotecas gerou no total 7392 ESTs que foram processadas pelo programa ESTWeb para a retirada de seqüências de baixa qualidade, cauda de poliA$^+$, seqüências do vetor e adaptadores, assim como seqüências contaminantes de bactérias, DNA ribossômico e DNA mitocondrial. Após esse procedimento, obtivemos 6350 seqüências de alta qualidade representando 86% das ESTs seqüenciadas. Como resultado do processamento das seqüências pelo programa de agrupamento CAP3 (Huang & Madan, 1999), foram gerados grupos

de seqüências superpostas com probabilidade de serem provenientes de mRNAs dos mesmos genes (*contigs*) e seqüências isoladas não incluídas em nenhum *contig* (*singletes*). A soma dos *singletes* e um representante de cada *contig* perfazem o número de seqüências únicas (*unigenes putativos*) que estariam sendo expressas.

No geral, foram seqüenciados 3072 ESTs da biblioteca HSR, 2400 da CDM e 1920 da CDC, e a redundância observada para cada biblioteca foi de 56%, 53% e 52%, respectivamente (Tabela 3). A redundância estimada para todo o projeto de seqüenciamento de ESTs de estresse foi de 63%, um bom valor para bibliotecas de cDNA não normalizadas.

Uma vez que a região 5' não codificadora (5' UTR) de *B. emersonii* varia entre 65 e 362 nt (Ribichich *et al*., 2005) e a média do tamanho das seqüências obtidas foi de 571 nt, é provável que a maioria das seqüências se estendeu além da região 5' UTR, alcançando a região codificadora do mRNA (Tabela 4).

Tabela 03 - Resultados obtidos do seqüenciamento e agrupamento das ESTs das bibliotecas HSR, CDM e CDC.

Biblioteca	**N° seqüências (total)**	**N° seqüências (alta qualidade)**	***Contigs***	***Singletes***	***Unigenes***	**Redundância**
HSR	3072	2775	345	901	1246	56%
CDM	2400	1900	285	615	899	53%
CDC	1920	1784	327	521	858	52%

Após o seqüenciamento e agrupamento das ESTs das bibliotecas HSR, CDM e CDC observamos 2326 *unigenes* putativos, sendo 51% (1198) deles ainda não descritos em *B. emersonii*. Estes novos *unigenes* representam uma valiosa contribuição deste trabalho para o projeto total de seqüenciamento de ESTs de *B. emersonii* (Tabela 4). Através da comparação das seqüências com o banco de dados do GenBank foi possível determinar para 59% (1369) dos *unigenes* um ortólogo em outro organismo. Porém, 41% (957) dos *unigenes* ainda permanecem sem uma identificação putativa. O agrupamento das ESTs obtidas das bibliotecas HSR, CDM e CDC juntamente com as ESTs obtidas por Ribichich e colaboradores (2005) resultou num total de 6071 *unigenes*, sendo aproximadamente 20% deles provenientes deste trabalho (Tabela 4). Todas as ESTs seqüenciadas neste trabalho foram depositadas na base de dados de ESTs do GenBank com os números de acesso EE730389 a EE736848.

Para diferenciar o agrupamento feito apenas com as ESTs das bibliotecas de cDNA de estresse HSR, CDM e CDC do agrupamento feito juntando as ESTs destas bibliotecas e as ESTs

seqüenciadas por Ribichich e colaboradores (2005), denominamos o primeiro agrupamento como BeSAS (***B***. ***e****mersonii* ***S****tress* ***A****ssembled* ***S****equences*) e o segundo como BeCSAS (***B***. ***e****mersonii Life* ***C****ycle and* ***S****tress* ***A****ssembled* ***S****equences*).

Tabela 04 – Sumário do seqüenciamento das ESTs de *B. emersonii*.

Projeto de seqüenciamento de ESTs das bibliotecas de cDNA de estresse	
Número total de seqüências	7392
Número total de seqüências com alta qualidade[a]	6350
Média do tamanho do inserto[b] (bp)	950
Média do tamanho das seqüências[c] (nt)	571
Número de *unigenes*	2326
Número de *singlets*	1506
Número de *contigs*	820
Número (%) de ESTs com *hits* na base de dados do Genbank	1369 (59)
Número (%) de ESTs sem anotação putativa (*no matches*)	957 (41)
Projeto total de seqüenciamento de ESTs de *B. emersonii*	
Número total de seqüências com alta qualidade[a]	23370
Número total de *unigenes* de *B. emersonii*[d]	6071
Número de novos *unigenes*[e]	1198
Número de *singletes*	947
Número de *contigs*	251

[a] Seqüências com no mínimo 150 pb e qualidade PHRED com valor ≥15.
[b] Estimado por ensaios de PCR realizados com clones das três bibliotecas de cDNA de estresse.
[c] Média das seqüências após processamento.
[d] Agrupamento das ESTs de *B. emersonii* obtidas por Ribichich e colaboradores (2005) e neste trabalho.
[e] Contribuição de novas seqüências obtidas neste trabalho para o projeto total de ESTs de *B. emersonii*.

Os *contigs* foram também organizados por seu tamanho, isto é, o total de ESTs presentes em cada um deles (Figura 4) para avaliar quais seqüências expressas estavam mais representadas em cada biblioteca. Pode se observar que a maioria dos *contigs* é formada por um número pequeno de ESTs nas três bibliotecas. Os *contigs* referentes a ESTs mais representadas em cada biblioteca estão mostrados na tabela 5. O *contig* com 162 seqüências da biblioteca HSR corresponde a ESTs da proteína Hsp17, que foi caracterizada nesse trabalho (item IV-4).

Dentre os *contigs* mais representados na biblioteca de choque térmico (HSR) encontram-se vários codificando proteínas de choque térmico como a Hsp17, a Hsp90, a Hsp10, a Hsp30, a Ciclofilina A e a Peptidil-prolil-cis-trans-isomerase D. C*ontigs* codificando proteínas ribossômicas, que estão envolvidas com a síntese de proteínas, também estavam presentes entre os mais

abundantes na biblioteca HSR, assim como nas bibliotecas de estresse por cádmio (CDM e CDC). Cerca de 64% dos *contigs* mais abundantes (16 em 25) codificam proteínas ribossômicas na biblioteca CDM, enquanto 32% (8 em 25) codificam para esse grupo de proteínas na biblioteca CDC (Tabela 5). Na biblioteca CDC também se observa entre os *contigs* mais abundantes aqueles codificando proteínas com propriedades antioxidantes como Glutationa S-transferases e uma Oxidorredutase dependente de NADH. *Contigs* codificando proteínas relacionadas com a proteólise, como Metacaspases e com apoptose como a Pirina, foram observados tanto na biblioteca CDM quanto na CDC. Dois *contigs* encontram-se entre os mais abundantes nas três bibliotecas, um codifica a Poliubiquitina, uma proteína relacionada com a degradação protéica, e o outro codifica uma proteína de resposta universal a estresses, a proteína USP.

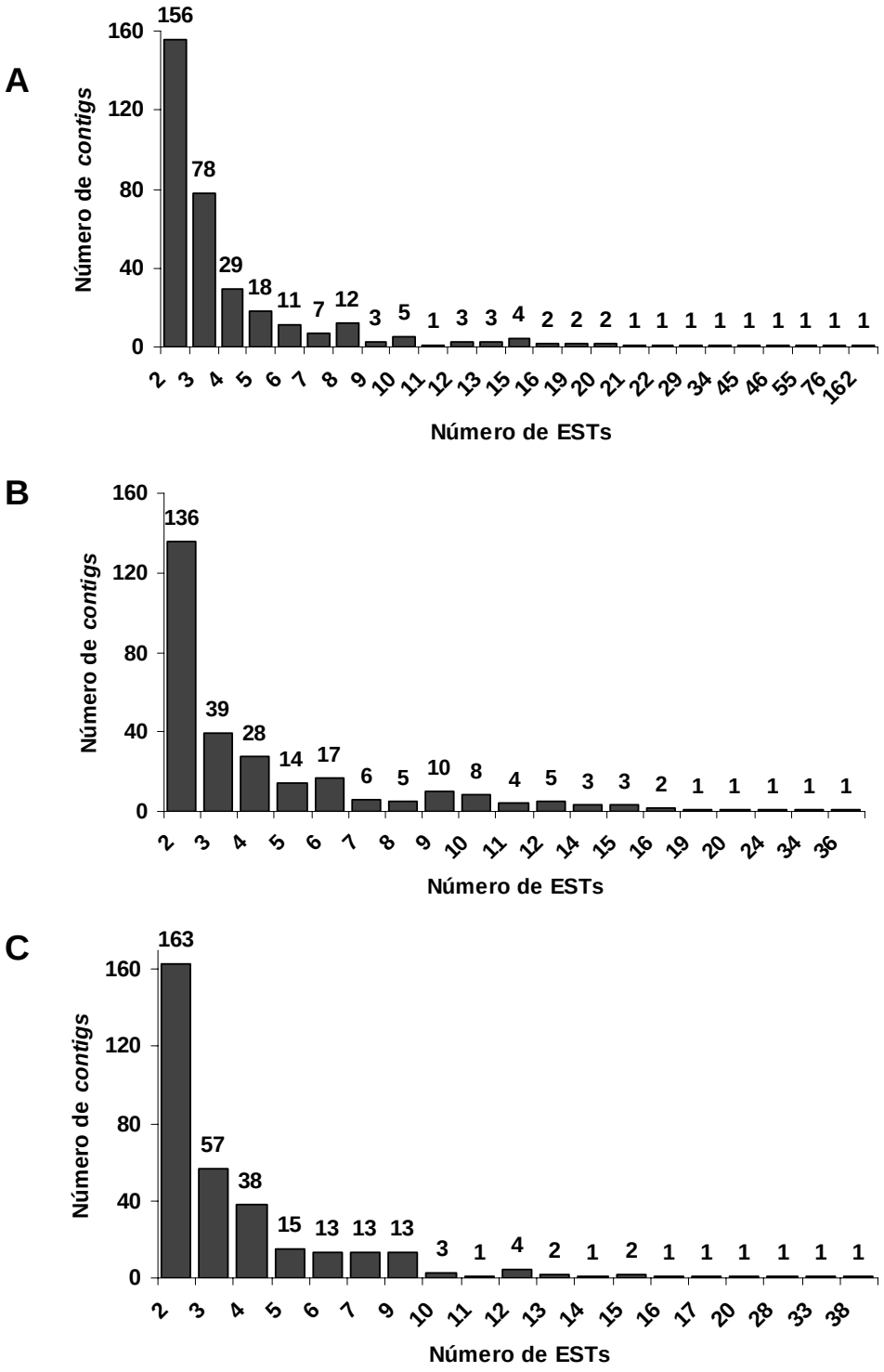


Figura 04 – Distribuição do número de *contigs* das bibliotecas de cDNA de estresse contendo um número determinado de ESTs. **A** – biblioteca HSR; **B** – biblioteca CDM; **C** - biblioteca CDC. As ESTs foram agrupadas pelo programa CAP3.

Tabela 05 – ESTs mais abundantes nas bibliotecas HSR, CDM e CDC.

Contig ID	N° de ESTs/ Freqüência (%)	Código do Swiss Prot	Anotação putativa	Processo biológico/Função molecular
HSR				
BeSAS275	162 (5,83)		Hsp17	(b) protein folding
BeSAS376*	76 (2,73)	Q5BBT0	Polyubiquitin	(b) protein modification
BeSAS371	55 (1,98)	Q6ZK13	Hsp90	(b) protein folding
BeSAS459	46 (1,66)	Q5MJG6	Thioredoxin peroxidase	(m) oxidoreductase activity
BeSAS787*	45 (1,62)	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress
BeSAS70	34 (1,22)		Unknown	
BeSAS464	29 (1,04)	Q53IN8	Putative 40S ribosomal protein	(b) protein biosynthesis
BeSAS511	23 (0,82)	Q6USC1	Cyclophilin A	(b) protein folding
BeSAS317	21 (0,75)	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding
BeSAS127	20 (0,72)		Unknown	
BeSAS175	20 (0,72)	Q4WNG3	Hsp30	(b) protein folding
BeSAS330	19 (0,68)		Unknown	
BeSAS547	19 (0,68)	Q7YZR8	Ferritin GF2	(b) iron ion transport
BeSAS133	15 (0,54)		Unknown	
BeSAS282	15 (0,54)	Q2M3Z6	Ribosomal protein L23	(b) protein biosynthesis
BeSAS662	15 (0,54)	Q6BLZ6	Glutathione peroxidase 3	(b) response to oxidative stress
BeSAS80	15 (0,54)	Q4HXF6	Peptidylprolyl cis-trans isomerase D	(b) protein folding
BeSAS90	15 (0,54)		Unknown	
BeSAS383	14 (0,50)	Q9FJX2	60S ribosomal protein L26 (RPL26B)	(b) protein biosynthesis
BeSAS139	13 (0,47)		Unknown	
BeSAS142	13 (0,47)		Unknown	
BeSAS100	12 (0,43)	Q5NCC5	Guanine nucleotide binding protein	
BeSAS294	12 (0,43)	P41340	Actin-3	(m) structural constituent of cytoskeleton
BeSAS381	12 (0,43)	O59950	40S ribosomal protein S4	(b) protein biosynthesis
BeSAS134	11 (0,39)	Q7YZZ5	Putative alpha-tubulin	(b) microtubule-based movement
CDM				
BeSAS383*	36 (1,89)	Q9FJX2	60S ribosomal protein L26	(b) protein biosynthesis
BeSAS391*	34 (1,79)	Q7XIH5	Arsenite inducible RNA associated protein	(b) zinc ion binding
BeSAS415	24 (1,26)	Q2TYA2	40S ribosomal protein S18	(b) protein biosynthesis
BeSAS243	20 (1,05)	Q6FT24	Ribosomal protein L36a.e.c14	(b) protein biosynthesis
BeSAS464	19 (1,00)	Q53IN8	Putative 40S ribosomal protein	(b) protein biosynthesis
BeSAS436	16 (0,84)	Q8ISN9	Ribosomal protein S25	(b) protein biosynthesis
BeSAS154	15 (0,79)	Q9XZ03	Ribosomal protein S7	(b) protein biosynthesis
BeSAS20	15 (0,79)	Q8MY15	Ubiquitin	(b) protein modification
BeSAS376*	15 (0,79)	Q5BBT0	Polyubiquitin	(b) protein modification
BeSAS818	15 (0,79)	Q4UDC9	40s ribosomal protein s15a	(b) protein biosynthesis
BeSAS309	14 (0,74)	O74836	60S ribosomal protein L1-B	(b) protein biosynthesis
BeSAS540*	14 (0,74)	Q764D2	Putative ribosomal protein S3a	(b) protein biosynthesis
BeSAS75	14 (0,74)	Q7PXS7	Putative ribosomal protein S28	(b) protein biosynthesis
BeSAS370	12 (0,63)		Unknown	
BeSAS485	12 (0,63)	Q2M3Y3	60S ribosomal protein L39 (RPL39C)	(b) protein biosynthesis
BeSAS787*	12 (0,63)	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress

BeSAS790*	12 (0,63)	O00625	Putative pirin-like protein	(b) transcription from RNA polymerase II promoter
BeSAS99	12 (0,63)		Unknown	
BeSAS397*	11 (0,58)	Q6FPX9	Metacaspase	(b) proteolysis
BeSAS53	11 (0,58)	Q6FNN1	Putative 60S ribosomal protein L27A	(b) protein biosynthesis
BeSAS531	11 (0,58)	Q4WZH8	Ribosomal protein L37a	(b) protein biosynthesis
BeSAS717	11 (0,58)	Q9C2P2	Protein component of the small (40S) ribosomal subunit	(b) protein biosynthesis
BeSAS321	10 (0,53)	O14388	60S ribosomal protein L27-A	(b) protein biosynthesis
BeSAS338	10 (0,53)	O75000	60s ribosomal protein l12	(b) protein biosynthesis
BeSAS350	10 (0,53)	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity
CDC				
BeSAS771	38 (2,13)	Q4H7X8	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport
BeSAS397*	32 (1,98)	Q6FPX9	Metacaspase	(b) proteolysis
BeSAS376*	28 (1,57)	Q5BBT0	Polyubiquitin	(b) protein modification
BeSAS134	20 (1,21)	Q7YZZ5	Putative alpha-tubulin	(b) microtubule-based movement
BeSAS391*	17 (0,95)	Q7XIH5	Arsenite inducible RNA associated protein	(b) zinc ion binding
BeSAS458	15 (0,84)	Q3M328	Putative glutathione S-transferase-like 4	(b) cell redox homeostasis
BeSAS544	15 (0,84)		Unknown	
BeSAS790*	15 (0,84)	O00625	Putative pirin-like protein	(b) transcription from RNA polymerase II promoter
BeSAS540*	14 (0,78)	Q764D2	Putative ribosomal protein S3a	(b) protein biosynthesis
BeSAS479	13 (0,73)	Q6MWL5	Probable 40S ribosomal protein S5	(b) protein biosynthesis
BeSAS804	13 (0,73)	Q86QS5	Ribosomal protein L10	(b) protein biosynthesis
BeSAS567	12 (0,67)		Unknown	
BeSAS6	12 (0,67)		Unknown	
BeSAS788	12 (0,67)	Q5WKC0	Chitinase A1 precursor	(b) chitin catabolism
BeSAS483	11 (0,62)		Unknown	
BeSAS256	10 (0,56)	Q90YT9	Ribosomal protein L28	(b) protein biosynthesis
BeSAS383*	10 (0,56)	Q9FJX2	60S ribosomal protein L26 (RPL26B)	(b) protein biosynthesis
BeSAS289	9 (0,50)	Q9BMX5	40S ribosomal protein S6	(b) protein biosynthesis
BeSAS623	9 (0,50)	Q6MYN9	CipA protein, putative	(b) regulation of nitrogen utilization
BeSAS710	9 (0,50)	Q3M328	Putative glutathione S-transferase-like 5	(b) cell redox homeostasis
BeSAS718	9 (0,50)	Q962Y8	Ribosomal protein L18	(b) protein biosynthesis
BeSAS787*	9 (0,50)	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress
BeSAS56	8 (0,45)	Q7QFZ1	Ribosomal protein S2	(b) protein biosynthesis
BeSAS595	8 (0,45)		Unknown	
BeSAS778	8 (0,45)		Unknown	

O asterisco destaca os *contigs* que aparecem entre os mais abundantes em pelo menos duas bibliotecas.

1.2 – Anotação putativa dos *unigenes*

As seqüências obtidas e processadas foram anotadas com base na similaridade com proteínas encontradas nos bancos de dados públicos. Os *unigenes* de *B. emersonii* foram comparados com a base de dados não redundante (nr) do GenBank do NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) usando o algoritmo BlastX. Os melhores alinhamentos obtidos para cada *unigene* foram selecionados utilizando-se como ponto de corte o *bit score* ≥ 55.

Além disso, fizemos uma segunda anotação dos genes de acordo com a classificação do Consórcio *Gene Ontology* – GO (http://www.geneontology.org). O GO é um projeto desenvolvido pelo *Gene Ontology Consortium* que visa fornecer um vocabulário controlado para descrever os genes e os produtos gênicos de forma que os termos possam ser aplicados a todos os organismos. Esta anotação descreve, quando possível, três categorias para o mesmo produto gênico: função molecular, processo biológico e componente celular. Foram designados os termos do GO às seqüências de *B. emersonii* após comparação usando BlastX contra uma base de dados local construída com seqüências das proteínas presentes no Swiss Prot (www.expasy.org) associadas com os termos do GO (Materiais e métodos, item III-8). Os melhores alinhamentos foram anotados automaticamente nas categorias do GO, utilizando-se como ponto de corte o *E*-value ≤ 10^{-6}.

Do total de 2326 *unigenes* distintos obtidos neste trabalho, 1282 apresentaram similaridade com alguma seqüência do banco de dados do Swiss Prot e foram anotados em pelo menos uma das categorias do GO. Este número é bastante similar ao obtido (1369) quando fizemos a comparação de seqüências usando o banco de dados do GenBank. A diferença observada pode ser devido a algumas proteínas hipotéticas que não são consideradas nas categorias do GO. Considerando a classificação do GO, 1113 *unigenes* foram classificados na categoria de função molecular, 999 em processo biológico e 650 em componente celular. A figura 5 mostra a distribuição dos *unigenes* anotados nos processos biológicos do GO.

Podemos verificar que a maior parte dos *unigenes* foi classificada nos seguintes processos biológicos: metabolismo de proteínas (34%), metabolismo de ácidos nucléicos (16%), e organização celular e biogênese (10%). É interessante notar que a subcategoria enovelamento de proteínas é responsável por 19% de todas as proteínas presentes na categoria de metabolismo de proteínas e a subcategoria proteólise por 11%. É esperado que bibliotecas de cDNA construídas com mRNA extraído de células expostas a choque térmico e a cádmio possuam um enriquecimento em ESTs codificando este tipo de proteínas.

De acordo com os critérios utilizados na anotação, 41% dos genes putativos de *B. emersonii* codificam proteínas sem similaridade com qualquer proteína depositada no GenBank ou com

proteínas de função desconhecida, enquanto 45% não foram classificados em nenhuma das categorias do GO. A alta porcentagem de genes sem identidade putativa pode ser um reflexo do estágio inicial na anotação dos genomas de fungos, particularmente da classe dos quitridiomicetos.

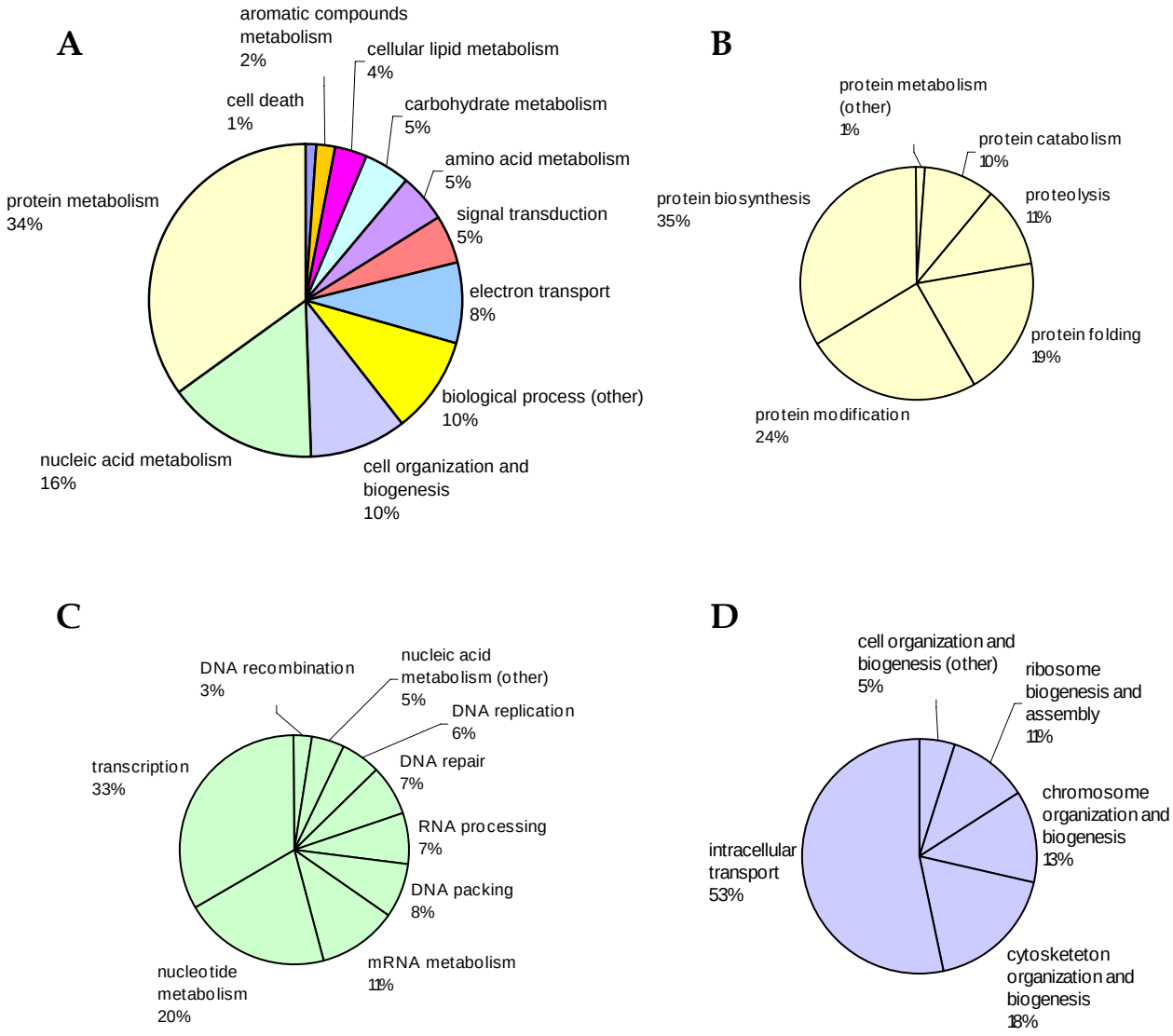


Figura 05 – Classificação funcional de 999 ESTs nos processos biológicos do GO. **A** - Porcentagem dos genes putativos únicos obtidos no seqüenciamento das bibliotecas HSR, CDM e CDC classificados nas principais categorias dos processos biológicos do GO; **B**, **C** e **D –** Porcentagem dos genes anotados nas subcategorias *protein metabolism*, *nucleic acid metabolism* e *cell organization and biogenesis*, respectivamente. O nome das categorias foi mantido na língua original do GO.

1.3 – Chaperones moleculares de *B. emersonii*

As chaperones moleculares constituem um grupo de proteínas relacionadas pela sua função de auxiliar o enovelamento protéico na célula, tanto em condições fisiológicas quanto em condições de estresse. Com o intuito de verificar quais chaperones moleculares estavam presentes no transcriptoma parcial de *B. emersonii*, fizemos uma busca por essas proteínas entre os *unigenes* do projeto total de seqüenciamento de ESTs (BeCS). Através desta análise identificamos 78 *unigenes* codificando chaperones moleculares e proteínas relacionadas (Tabela 6). Destes 78 *unigenes*, 51 foram observados nas bibliotecas de estresse, 69 nas bibliotecas normais e 41 em ambas. Considerando que foram seqüenciadas bem menos ESTs das bibliotecas de estresse (37%) do que das bibliotecas normais (63%), esses dados sugerem que houve um enriquecimento de ESTs de chaperones moleculares e proteínas associadas nas bibliotecas de estresse, como seria esperado.

Foram observadas chaperones moleculares de todas as famílias conhecidas, como as HSP de baixo peso molecular (sHsps), que inclui o *unigene* mais altamente representado na biblioteca HSR, correspondente à proteína Hsp17, além dos *unigenes* codificando as proteínas Hsp16, Hsp20 e Hsp30. A família das Hsp40, que é constituída por proteínas que possuem um domínio J, responsável pela regulação da atividade de ATPase das Hsp70, apresentou 17 membros distintos. A família das Hsp40 conjuntamente com a família de PPIases (Peptidil-prolil-cis-trans-isomerases) foram as que apresentaram o número mais diverso de membros. Dentre os membros da família das Hsp60 encontrou-se as chaperoninas Hsp60 e Hsp10, que já haviam sido previamente caracterizadas (Pugliese, 2002), e todas as oito subunidades da chaperone mitocondrial TriC/CCT, o complexo eucariótico homólogo às chaperoninas Hsp60/10 presentes no citoplasma.

A família das Hsp70 apresentou 10 membros distintos, incluindo o gene que havia sido caracterizado anteriormente, correspondendo à proteína Hsp70-1 (Stefani & Gomes, 1995). Os membros da família Hsp70 de *B. emersonii* foram selecionados para uma melhor caracterização durante este trabalho (item IV-3) (Georg & Gomes, 2006). O *unigene* correspondente à Hsp90 foi também encontrado, sendo que o gene correspondente já havia sido previamente caracterizado em *B. emersonii* (Pugliese *et al*., 2006). No entanto, a presença de uma Hsp90 de retículo endoplasmático ainda não havia sido descrita neste fungo e foi identificada neste trabalho.

Tabela 06 – *Unigenes* de *Blastocladiella emersonii* correspondentes a chaperones moleculares e proteínas associadas.

Gene ID	Anotação putativa	Número de ESTs	
		Estresse (6350 total)	Normal (17020 total)
sHsps (*small* Hsps)			
BeCSAS208	Hsp16	8	2
BeCSAS404, 2538*	Hsp17	167	26
BeE90D17A05	Hsp20	1	0
BeCSAS301, 2381*	Hsp30	20	1
Hsp40			
BeCSAS1990	DnaJ chaperone	1	1
BeE90D04F09	DnaJ domain protein	1	0
BeCSAS3	DnaJ heat shock protein-like	2	0
BeE60H01H06	DnaJ homolog, subfamily C	1	0
BeCSAS1859	DnaJ homolog, subfamily B	4	2
BeCSAS2407	DnaJ homolog, subfamily B	6	0
BeE90N07C07	DnaJ protein	0	1
BeCSAS2415	Heat shock protein DnaJ-like	3	0
BeCSAS1537	DnaJ protein homolog Atj3	0	3
BeG90N09C04	DnaJ-like protein isoform A	0	1
BeCSAS2147	Heat shock protein DnaJ	0	2
BeCSAS2259	Heat shock protein DnaJ	2	1
BeCSAS307	Member of the DnaJ family Ydj1p	4	5
BeG30N15F01	Probable DnaJ-like heat-shock protein	0	1
BeCSAS465	Protein psi1	2	2
BeE60N02H05	Putative heat shock protein Hsp40	0	1
BeCSAS2119	Related to chaperone protein DnaJ	0	2
Hsp60			
BeCSAS1821, BeE60C01B04	Hsp10	26	56
BeCSAS143, 145, 2510*	Hsp60	5	13
BeCSAS1995	Prefoldin subunit 1	1	3
BeCSAS2310	Prefoldin subunit 3	0	4
BeCSAS1895	Prefoldin subunit 4	2	2
BeCSAS711	Prefoldin subunit 5	0	2
BeCSAS2323	T-complex protein 1 subunit alpha	0	2
BeCSAS346, 2470, BeE90D04C01	T-complex protein 1 subunit beta	13	10
BeCSAS2537, 2570	T-complex protein 1 subunit delta	7	2
BeCSAS662	T-complex protein 1 subunit epsilon	0	2
BeCSAS2016	T-complex protein 1 subunit eta	5	5
BeCSAS2083	T-complex protein 1 subunit gamma	4	11
BeCSAS1573	T-complex protein 1 subunit theta	4	9
BeCSAS1877, 1722	T-complex protein 1 subunit zeta	3	7
Hsp70			
BeCSAS1269, 1896*	Hsp70-1	29	22
BeCSAS2351	Hsp70-2	2	7

BeCSAS1325	Hsp70-3	4	24
BeCSAS1203	Hsp70-4	0	2
BeCSAS300	Hsp70-5	4	3
BeCSAS1126	Hsp70-6	0	3
BeCSAS2111	Hsp70-7	19	6
BeCSAS386	Hsp70-8	4	2
BeCSAS1666, 551	Hsp70-9	8	7
BeCSAS2174	Hsp70-10	0	6
Hsp90			
BeCSAS1871	Hsp90 (citoplasmática)	64	25
BeCSAS305	Hsp90 (retículo endoplasmático)	1	1
BeCSAS371	Hsp90 co-chaperone Aha1	3	0
BeCSAS195	Hsp90 co-chaperone Cdc37	5	1
BeG120N03E07	Protein interacting with Hsp90 1	0	1
Hsp100			
BeCSAS2434, 2575	Hsp100	6	5
PPIases e Ciclofilinas			
BeCSAS2369, BeE90D07F08* BeE60C14D08*	Cyclophilin A	37	60
BeCSAS345, 1476*	Cyclophilin B	4	7
BeCSAS1684, BeE60H23F12*	Cyclophilin D	19	7
BeCSAS1954, 2437*	FK506 binding protein	10	11
BeCSAS598	FK506 binding protein 2	2	4
BeCSAS1029	FK506-binding protein 4	0	15
BeCSAS1434, BeE30N18E01	Peptidyl prolyl isomerase H	0	3
BeCSAS1227	Peptidyl prolyl isomerase B	1	4
BeG120N01F07	Peptidyl prolyl isomerase Cwc27	0	1
BeCSAS1312	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase CypC	1	1
BeE90N18C11	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase Cyp15	0	1
BeCSAS1259	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase Cyp6	1	1
BeCSAS1982	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	3	0
BeCSAS219	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 4	0	2
BeE90N03B10	Peptidyl prolyl cis-trans isomerase-like 2	0	1
HSF			
BeE90N08B10	Heat shock factor protein (HSF)	0	1
Outras chaperones			
BeE30N21F02	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 2	0	1
BeCSAS1695	Chaperone regulator	0	2
BeCSAS385	Chitin synthase chaperone-like protein Chs7	1	1
BeCSAS878	FAD-linked sulfhydryl oxidase ERV2	0	3
BeE90N01H05	Heat shock regulated-1 homolog	0	1
BeE90D14A05	Hsp like protein	1	0
BeCSAS1199, BeE60H29E12*	Prohibitin	4	5
BeCSAS686	Prohibitin 2	2	3
BeE60N17E10	Protein UXT	0	1
BeCSAS1978	Putative heat shock protein	3	0

BeCSAS1552, BeE60C05G05*	Tubulin cofactor A	9	10
BeE90D08G10	Tubulin-specific chaperone B	1	0
BeCSAS605	Vacuolar transporter chaperone 1	0	2

BeCSAS (***B***. ***e****mersonii life* ***C****ycle and* ***S****tress* ***A****ssembled* ***S****equence*) corresponde aos *unigenes* observados no agrupamento feito com todas as ESTs seqüenciadas de *B. emersonii* (ESTs obtidas por Ribichich *et al*., 2005 e ESTs originadas deste trabalho). *Indica seqüências do mesmo gene, porém contendo seqüências intrônicas. Estresse, se refere a ESTs originadas das bibliotecas de cDNA de estresse (HSR, CDM e CDC) e Normal, corresponde a ESTs provenientes das bibliotecas de cDNA obtidas durante o ciclo de vida de *B. emersonii* em condições fisiológicas. Entre parênteses está indicado o número total de ESTs seqüenciadas em cada caso.

2 – Análise global da expressão gênica sob condições de estresse usando microarranjos de DNA

A análise global dos genes expressos em *B. emersonii* em resposta ao estresse térmico e ao estresse por cádmio foi realizada utilizando a técnica de microarranjos de DNA, que permite o estudo simultâneo da expressão de milhares de genes e pode auxiliar na identificação de genes diferencialmente expressos e de padrões de expressão gênica. Nestes arranjos, uma coleção de genes é fixada em uma lâmina de vidro que é então hibridizada com cDNAs obtidos a partir de RNA de células cultivadas nas condições em que se deseja estudar (condição teste) juntamente com cDNAS obtidos de células controle. A intensidade do sinal de hibridização relativo entre as duas condições reflete a abundância dos transcritos na condição teste em relação ao controle, permitindo a análise global da expressão gênica em diferentes condições.

2.1 - Seleção dos clones e construção dos microarranjos de DNA

A construção dos microarranjos e seleção dos clones para compô-lo foi realizada em colaboração com a então doutoranda Silvia Maria Salem Izacc. Para compor as lâminas foram selecionadas 4224 ESTs de boa qualidade obtidas de 13 bibliotecas distintas de cDNA, as quais foram construídas com RNA de células de diversas fases do ciclo de vida do fungo (Ribichich *et al.*, 2005) e em condições de estresse. A tabela 7 lista as bibliotecas cujos clones foram utilizados na construção dos microarranjos de DNA de *B. emersonii*.

Na ocasião em que foi realizada a seleção dos clones, nosso banco de dados contava com aproximadamente 21000 ESTs, correspondendo a cerca de 5400 genes putativos distintos. Dentre estes clones, poderíamos utilizar apenas 4224 ESTs, número máximo de genes que podem ser depositados em nossas lâminas. Para isto, selecionamos, inicialmente, o melhor representante de cada *contig*, utilizando os seguintes critérios: a) entre os *contigs* que apresentavam identidade putativa, foi selecionada a EST que apresentava a maior similaridade na comparação com as seqüências do banco de dados não redundante do GenBank; b) entre os *contigs* que não apresentaram similaridade significativa com as seqüências do GenBank, foram escolhidos os clones que apresentavam a seqüência processada mais longa. Em seguida, descartamos aleatoriamente alguns *singletes* que não apresentavam similaridade com qualquer proteína do banco de dados (GenBank), selecionando o suficiente para completar as 4224 ESTs.

Tabela 07 - Bibliotecas de cDNA utilizadas na construção dos microarranjos de DNA.

Biblioteca	Condição de obtenção do mRNA	Fonte
ZSPN	Zoósporos	Ribichich, 2005
G30N	Gérmens, 30 minutos após a indução da germinação	Ribichich, 2005
G60N	Gérmens, 60 minutos após a indução da germinação	Ribichich, 2005
G90N	Células vegetativas, 90 minutos após a indução da germinação	Ribichich, 2005
G120N	Células vegetativas, 120 minutos após a indução da germinação	Ribichich, 2005
NSVP	Células vegetativas imediatamente antes da indução da esporulação	Ribichich, 2005
E30N	Zoosporângios, 30 minutos após a indução da esporulação	Ribichich, 2005
E60N	Zoosporângios, 60 minutos após a indução da esporulação	Ribichich, 2005
E90N	Zoosporângios, 90 minutos após a indução da esporulação	Ribichich, 2005
E120N	Zoosporângios, 120 minutos após a indução da esporulação	Ribichich, 2005
HSR	Zoosporângios de 30 minutos de esporulação submetidos a 38 ºC por 30 minutos	*Georg, RC
CDM	Zoosporângios de 30 minutos de esporulação incubados com 50μM de $CdCl_2$ por 30 minutos	*Georg, RC
CDC	Zoosporângios de 60 minutos de esporulação incubados com 100μM de $CdCl_2$ por 30 minutos	*Georg, RC

* Bibliotecas de cDNA construídas neste trabalho.

Os clones selecionados foram rearranjados em placas de 96 poços com o auxílio do robô Microgrid (Biorobotics). Os insertos de cDNA destes clones foram amplificados por PCR empregando-se os oligonucleotídeos universais T7 e SP6 cujas seqüências alvo flanqueiam o inserto no vetor pSPORT 1. Ao todo 3563 insertos foram amplificados com sucesso, apresentando uma única banda no gel de agarose com tamanho entre 0,5 a 1,7 kb. Após purificação dos insertos, os produtos de PCR foram rearranjados em placas de 384 poços, na presença de DMSO e então depositados em lâminas de vidro utilizando o *spotter* Generation III Microarray Spotter (GE Healthcare). Esta foi a primeira versão da lâmina de microarranjos de DNA de *B. emersonii*.

Logo após a construção da primeira versão da lâmina, seqüenciamos a biblioteca de cDNA CDC e cerca de 600 novos *unigenes* putativos foram observados nesta biblioteca. Como ainda havia espaço na lâmina, resolvemos amplificar 220 insertos correspondendo a novos *unigenes* da biblioteca CDC e depositá-los na lâmina de microarranjos de *B. emersonii*. Assim, esta segunda versão da lâmina apresenta um total de 3773 ESTs distintas depositadas.

Todas as ESTs utilizadas na construção dos microarranjos de DNA foram seqüenciadas novamente para avaliar se as seqüências dos clones depositados nas lâminas realmente correspondiam às seqüências selecionadas. As seqüências novas foram processadas pelo programa

ESTWeb e posteriormente comparadas com as seqüências depositadas no banco de dados de *B. emersonii* (http://blasto.iq.usp.br). Os alinhamentos que apresentavam *E*-value ≤ 10^{-20} e uma área de cobertura > 20% foram considerados como sendo a mesma seqüência. De acordo com este critério, 87% dos clones amplificados com sucesso (3282 ESTs) tiveram sua identificação putativa confirmada. Os demais clones foram reanotados após comparação de seqüências usando BlastX contra a base de dados Swiss Prot (http://expasy.org/sprot) utilizando como ponto de corte um *E*-value ≤ 10^{-6}.

Os genes depositados nas lâminas foram classificados funcionalmente de acordo com as categorias do GO. A figura 6 mostra a distribuição dos genes de acordo com os processos biológicos do GO. Como se pode observar, os genes utilizados nos microarranjos cobrem uma ampla variedade de funções biológicas, permitindo a obtenção de dados importantes para a análise da expressão gênica de *B. emersonii*.

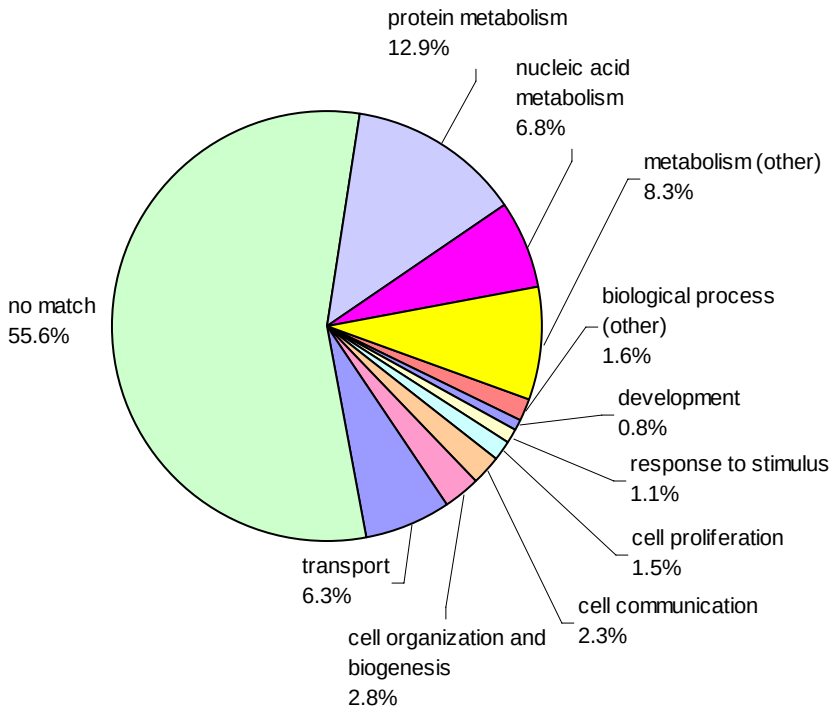


Figura 06 – Classificação funcional dos 3773 genes de *B. emersonii* presentes nos microarranjos de DNA (versão 2). A figura mostra o número de genes de *B. emersonii* classificados nos processos biológicos do GO. O nome das categorias foi mantido na língua original do GO.

2.2 – Hibridizações competitivas

A expressão gênica global em resposta aos estresses de choque térmico e cádmio foi estudada durante a germinação e a esporulação de *B. emersonii* em experimentos de microarranjos. Células após 30 minutos da indução da germinação ou da indução da esporulação foram submetidas a choque térmico (38°C) ou incubadas com cádmio (100 e 200 µM) por 30 minutos, sendo o RNA total destas células extraído imediatamente após esse período. Estes RNAs foram utilizados como teste nos ensaios de microarranjos e como referência foram usadas amostras de RNA de células após 60 minutos da indução da germinação ou 60 minutos da esporulação em condições fisiológicas normais. A tabela 8 resume os ensaios de microarranjos realizados.

Os microarranjos de DNA foram hibridizados competitivamente com os cDNAs correspondentes às amostras referência e teste, marcados com os fluoróforos Cy3 ou Cy5. Todos os experimentos foram realizados com três réplicas biológicas distintas. Como os genes foram depositados em duplicata nas lâminas de microarranjos, temos um total de 6 réplicas para cada gene.

Após as hibridizações, as lâminas foram lavadas em condições crescentes de estringência, secas com nitrogênio e então, as imagens foram captadas com a utilização de um escaner. A intensidade de fluorescência de cada ponto foi determinada pela varredura da lâmina, com a geração de imagens monocromáticas para os canais Cy3 e Cy5 separadamente. As intensidades de sinal foram extraídas utilizando o programa Array Vision 6.0 (Image Research).

Tabela 08 – Hibridizações competitivas realizadas nos ensaios de microarranjos de DNA.

RNA referência	RNA teste
G60 (células de 60 min após a indução da germinação em condições fisiológicas)	**G60H** (células submetidas ao choque térmico dos 30 aos 60 min após a indução da germinação)
E60 (células de 60 min após a indução da esporulação em condições fisiológicas)	**E60H** (células submetidas ao choque térmico dos 30 aos 60 min após a indução da esporulação)
G60 (células de 60 min após a indução da germinação em condições fisiológicas)	**G100** (células submetidas a $CdCl_2$ 100 µM dos 30 aos 60 min após a indução da germinação)
G60 (células de 60 min após a indução da germinação em condições fisiológicas)	**G200** (células submetidas a $CdCl_2$ 200 µM dos 30 aos 60 min após a indução da germinação)
E60 (células de 60 min após a indução da esporulação em condições fisiológicas)	**E100** (células submetidas a $CdCl_2$ 100 µM dos 30 aos 60 min após a indução da esporulação)
E60 (células de 60 min após a indução da esporulação em condições fisiológicas)	**E200** (células submetidas a $CdCl_2$ 200 µM dos 30 aos 60 min após a indução da esporulação)

A figura 7 mostra um exemplo das imagens captadas pelo escaner. Esta lâmina corresponde à hibridização E60HxE60. Os genes induzidos na amostra marcada com Cy3 aparecem como pontos verdes e os genes reprimidos aparecem como pontos vermelhos. Os genes com o mesmo nível de expressão nas duas condições aparecem com a cor amarela.

2.3 – Normalização dos dados e determinação dos genes diferencialmente expressos

Os dados obtidos nos experimentos de microarranjos foram normalizados para corrigir diferenças na incorporação dos fluoróforos e diferenças na intensidade de fluorescência entre Cy3 e Cy5. Para isto, utilizamos o método LOWESS (***LO****cally* ***WE****ighted regre****SS****ion*) que assume que a maioria dos genes não apresenta diferença de expressão entre as condições referência e teste, ou que as diferenças entre as duas condições são contrabalançadas. A figura 8 mostra um exemplo de normalização dos nossos dados utilizando essa metodologia.

Para classificar os genes como diferencialmente expressos, utilizamos a metodologia HTSelf (Vêncio & Koide, 2005) com base em hibridizações homotípicas (*self-self*), ou seja, a mesma amostra de cDNA marcada separadamente com os fluoróforos Cy3 e Cy5. Esta metodologia está disponível no endereço http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself. Foram realizadas duas hibridizações homotípicas independentes: uma utilizando RNA de células de 60 minutos após a indução da germinação e outra usando RNA de células de 60 minutos após a indução da esporulação. Os valores de "M" e "S" obtidos para cada gene nos dois experimentos independentes foram usados e aplicados separadamente para a obtenção das curvas homotípicas. Após definir o limite superior e inferior para os genes não diferencialmente expressos (curvas homotípicas), os experimentos de hibridizações competitivas, realizados nas mesmas condições técnicas que os experimentos homotípicos, foram avaliados. O resultado (M, S) de um determinado gene nos dados de interesse (não homotípicos) foi comparado às curvas da hibridização homotípica, onde M é a variável relacionada à razão de expressão e S é a variável relacionada à intensidade. Um dado gene (M, S) pode estar acima (induzido), abaixo (reprimido) ou dentro das curvas homotípicas (não diferencialmente expresso). Foram considerados como diferencialmente expressos os genes que apresentaram no mínimo 4 réplicas válidas e que apresentaram mais de 80% das réplicas usadas fora do intervalo determinado nos experimentos homotípicos. A figura 9 mostra as curvas homotípicas obtidas com 99% de intervalo de credibilidade (A) e um exemplo da aplicação destes limites aos dados obtidos nas hibridizações competitivas (B).

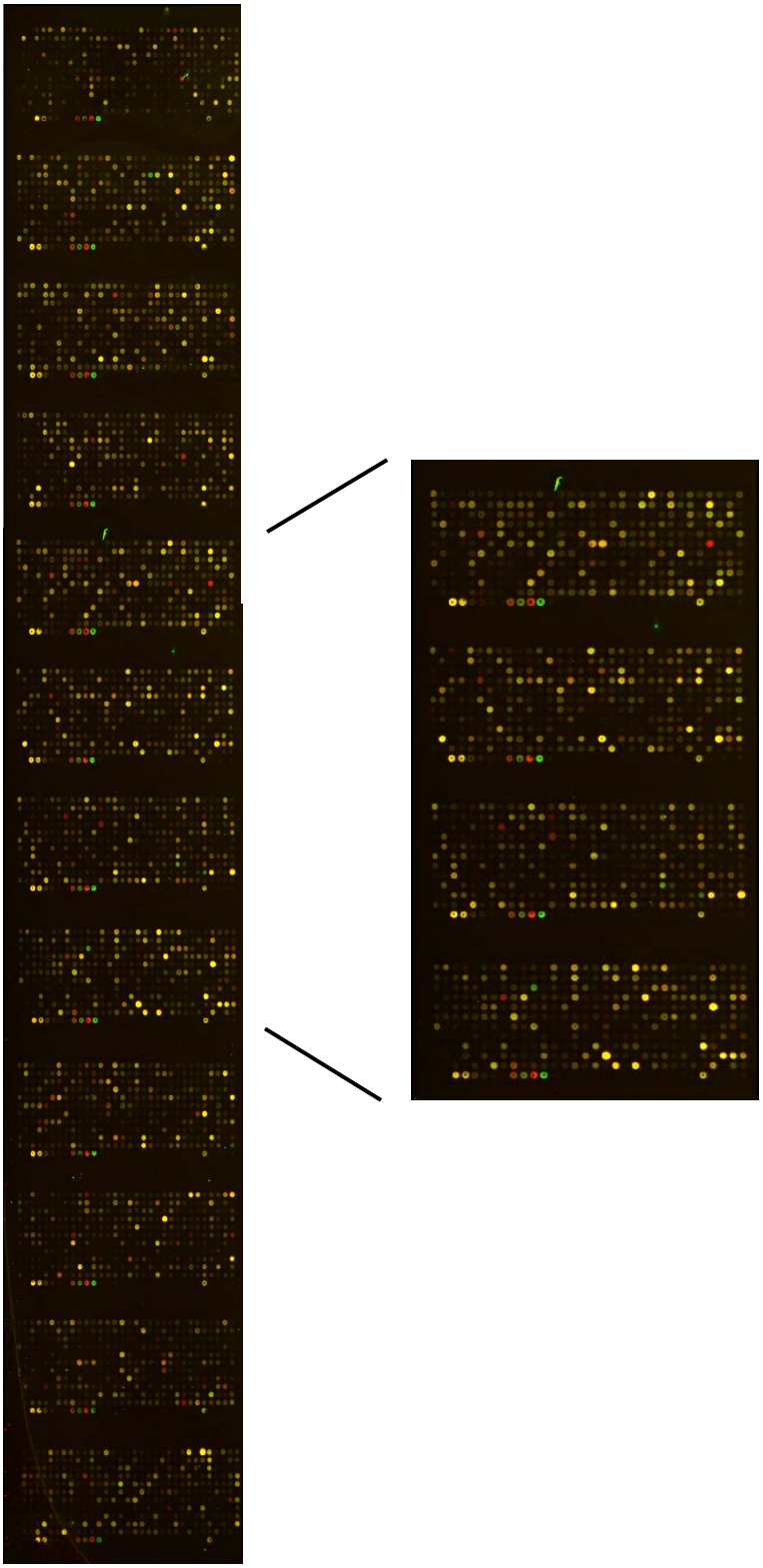


Figura 07 – Imagem de uma lâmina contendo 3773 cDNAs distintos. Esta imagem é resultado de uma hibridização competitiva (E60HxE60). A figura mostra a porção esquerda do microarranjo com os 12 subconjuntos e uma ampliação dos subconjuntos 5 a 8. Os pontos em vermelho representam os genes reprimidos, em verde os induzidos e em amarelo os invariantes.

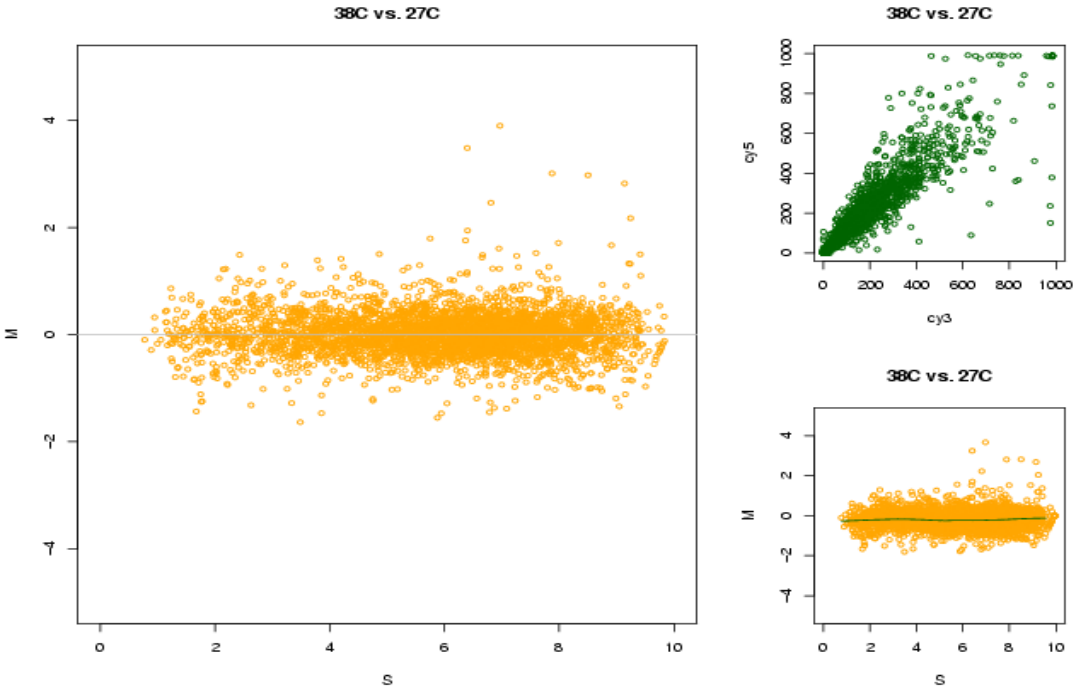


Figura 08 - Normalização dos dados de microarranjos utilizando o método LOWESS. Painel superior à direita: gráfico de dispersão dos dados não-normalizados indicando a intensidade do sinal no canal Cy3 e Cy5. Painel inferior à direita: gráfico M x S dos mesmos dados onde $M = \log_2 (I_{teste}/I_{referência})$ e $S = \log_2 (I_{teste}/2 + I_{referência}/2)$. Note a linha ajustada do LOWESS em verde escuro. Painel à esquerda: gráfico M x S dos dados normalizados.

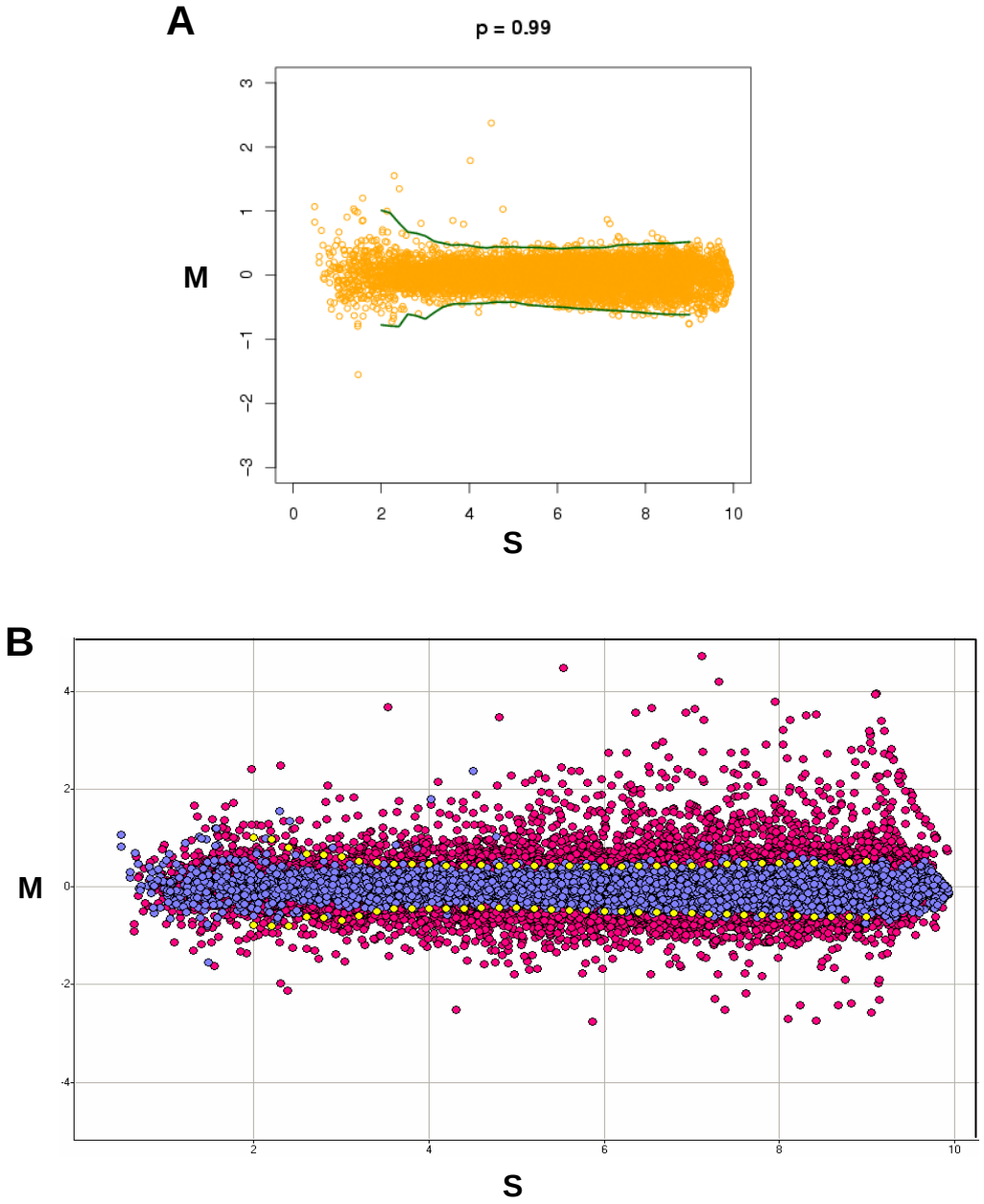


Figura 09 – Gráficos de dispersão representando as curvas homotípicas e a aplicação das mesmas nos experimentos de hibridização competitiva. **A** – Hibridização homotípica. O experimento foi realizado utilizando RNA obtido de células de *B. emersonii* aos 60 min da germinação. O eixo y representa $M=\log_2(G60\text{-}Cy5/G60\text{-}Cy3)$ e o eixo x refere-se a $S=\log_2(G60\text{-}Cy5/2 + G60\text{-}Cy3/2)$. **B** – Hibridização competitiva. O experimento foi realizado utilizando como referencia RNA obtido de células aos 60 min da germinação a temperatura fisiológica (G60) e como teste RNA obtido de células submetidas a choque térmico (38ºC) dos 30 aos 60 min da germinação (G60H). $M=\log_2(G60H/G60)$ e o eixo x refere-se a $S=\log_2(G60H/2 + G60/2)$. As curvas dos experimentos homotípicos estão destacadas em amarelo, delimitando os genes não diferencialmente expressos. Em azul estão destacados os pontos referentes ao experimento homotípico e em vermelho, os pontos referentes ao experimento de choque térmico. Os pontos acima da linha superior e abaixo da linha inferior amarela são considerados como genes induzidos e reprimidos, respectivamente.

2.4 – Análise do fenótipo das células de *B. emersonii* submetidas a estresses

2.4.1 – Choque térmico

Foi observado anteriormente através de microscopia ótica, que a exposição das células de *B. emersonii* a um choque térmico a 38°C durante a esporulação acarreta um atraso na finalização deste estágio de desenvolvimento. Entretanto, células do estágio de germinação quando submetidas ao estresse térmico pareciam não ter sido afetadas e foram capazes de formar o tubo germinativo (Bonato *et al*., 1987). Para confirmar estes resultados, analisamos por microscopia ótica (Figura 10) o fenótipo das células de *B. emersonii* em resposta às mesmas condições de estresse térmico utilizadas na construção da biblioteca de cDNA HSR e nos ensaios de microarranjos de DNA.

As células de *B. emersonii* após 30 min da indução da germinação foram tratadas por 30 min a 38°C e acompanhadas ao longo do crescimento vegetativo até 6 h a 27°C. Estas células foram então induzidas a esporular e seu desenvolvimento foi acompanhado até 210 min após a indução da esporulação a 27°C. Interessantemente, observamos que as células de germinação submetidas a choque térmico apresentaram um fenótipo bem semelhante ao controle, tanto em tamanho quanto em aparência das células após 6 h de crescimento (Figura 10-A,B). Entretanto, estas mesmas células quando eram induzidas a esporular apresentaram um atraso na liberação dos zoósporos em relação às células controle (Figura 10-C,D). Enquanto nas culturas controle, 82% dos zoosporângios encontram-se vazios após 210 min da indução da esporulação, em culturas tratadas com choque térmico este número foi de aproximadamente 30%. Estes resultados mostram que o choque térmico na germinação afeta a esporulação.

Para avaliar o efeito do choque térmico na fase de esporulação, células após 30 min da indução deste estágio foram tratadas por 30 min a 38°C e acompanhadas até 18 h após a indução da esporulação a 27°C. Quando as células do estágio de esporulação foram submetidas ao estresse térmico, 99% dos zoosporângios encontravam-se cheios após 210 min da indução da esporulação, enquanto nas células controle este número foi de apenas 18% (Figura 10-E,F). Entretanto, a maior parte dos zoosporângios encontravam-se vazios 18 h após a indução da esporulação, indicando que o choque térmico provoca um atraso, mas não o bloqueio da esporulação (Figura 10-G,H).

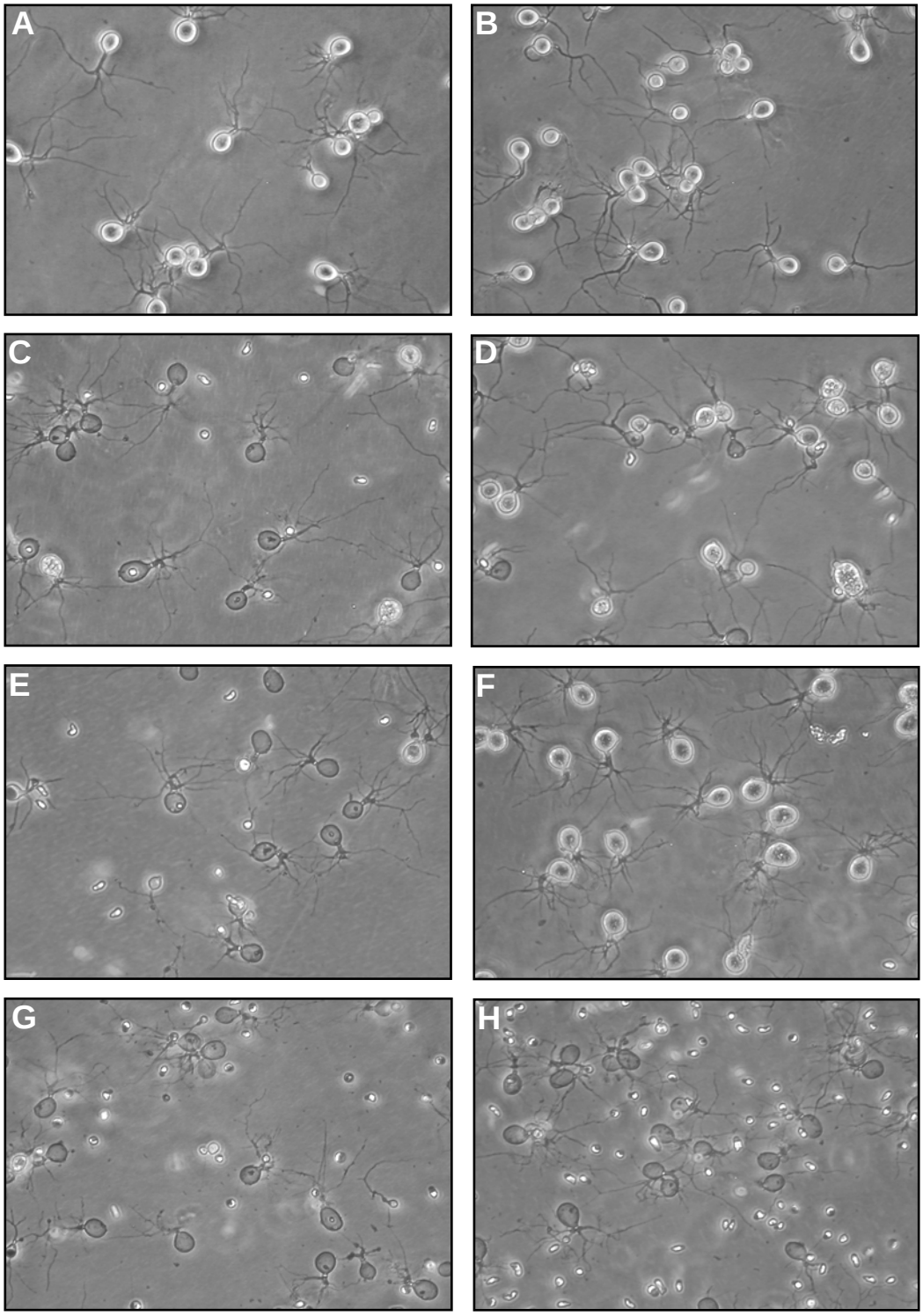


Figura 10 – Microscopia ótica de células em diferentes tempos do crescimento vegetativo e da esporulação em condições fisiológicas (27°C) e após o choque térmico a 38°C. Os painéis à esquerda correspondem ao controle e os painéis à direita aos tratamentos. **A** – células vegetativas de 6 h após a indução da germinação; **B** – células vegetativas de 6 h após a indução da germinação, expostas a 38°C dos 30 aos 60 min da germinação; **C** e **E** – células mostradas em A, 210 min após a indução da esporulação; **D** – células mostradas em B, 210 min após a indução da esporulação; **F** – células mostradas em A, 210 min após a indução da esporulação, expostas a 38°C dos 30 aos 60 min da esporulação; **G** – células mostradas em A, 18 h após a indução da esporulação; **H** - células mostradas em F, 18 h após a indução da esporulação.

2.4.2 - Cádmio

Em *B. emersonii*, a resposta a cádmio havia sido estudada apenas utilizando-se géis uni e bidimensionais de proteínas e analisando o processamento do íntron do gene *hsp70-1* (Stefani & Gomes, dados não publicados), assim como ensaios de *Northern blot* para genes específicos como o gene *hsp90* (Pugliese *et al*., 2006). Para avaliar o fenótipo de *B. emersonii* em resposta ao tratamento com cádmio, culturas foram inoculadas com duas concentrações diferentes de cádmio (100 e 200 μM final) nas duas fases de diferenciação do fungo. As condições utilizadas neste ensaio foram as mesmas usadas nos experimentos de microarranjos de DNA.

Inicialmente, células de *B. emersonii* após 30 min da indução da germinação foram tratadas por 30 min com 100 ou 200 μM de $CdCl_2$ e acompanhadas ao longo do crescimento vegetativo até 6 h a 27°C. Estas células vegetativas foram então induzidas a esporular pelo carenciamento de nutrientes e acompanhadas até 210 min após a indução da esporulação a 27°C. Observou-se após 6 h de crescimento vegetativo que as células tratadas com cádmio são bem menores do que as células controle (Figura 11-A,B e Figura 12-A,B) e que até 210 min após a indução da esporulação não tinham esporulado (Figura 11-C,D e Figura 12-C,D). Quando as células tratadas com cádmio na germinação não foram induzidas a esporular e permaneceram em meio de cultura a 27°C na ausência de cádmio, elas cresceram de forma mais lenta alcançando um tamanho semelhante ao das células controle. Estas células apresentaram posteriormente a capacidade de esporular (dados não mostrados), indicando que as mesmas não sofreram danos irreversíveis na presença destas concentrações de cádmio.

Para avaliar o fenótipo em resposta ao cádmio na fase de esporulação, células de *B. emersonii* 30 min após a indução da esporulação foram tratadas por 30 min com 100 ou 200 μM de $CdCl_2$ e acompanhadas até 26 h após a indução da esporulação a 27°C. As células tratadas com cádmio durante a esporulação não foram capazes de esporular até os 210 min após a indução, quando a maioria das células controle já havia esporulado (Figura 11-E,F e Figura 12-E,F). No entanto, 26 h após a indução da esporulação 100% das células expostas a cádmio haviam liberado seus zoósporos (Figura 11-G,H e Figura 12-G,H). Estes dados indicam que o tratamento com cádmio atrasa o desenvolvimento das células de *B. emersonii*, porém elas permanecem capazes de sobreviver e continuar seu desenvolvimento mesmo que de uma forma mais lenta. É interessante notar que o estresse por cádmio aqui descrito atrasa mais o desenvolvimento de *B. emersonii* do que o choque térmico, uma vez que os zoosporângios 18 h após a indução da esporulação, que foram previamente tratados com choque térmico, estão em sua grande maioria vazios, enquanto os

zoosporângios previamente tratados com cádmio permanecem na sua totalidade cheios após 18 h de incubação (Figura 13).

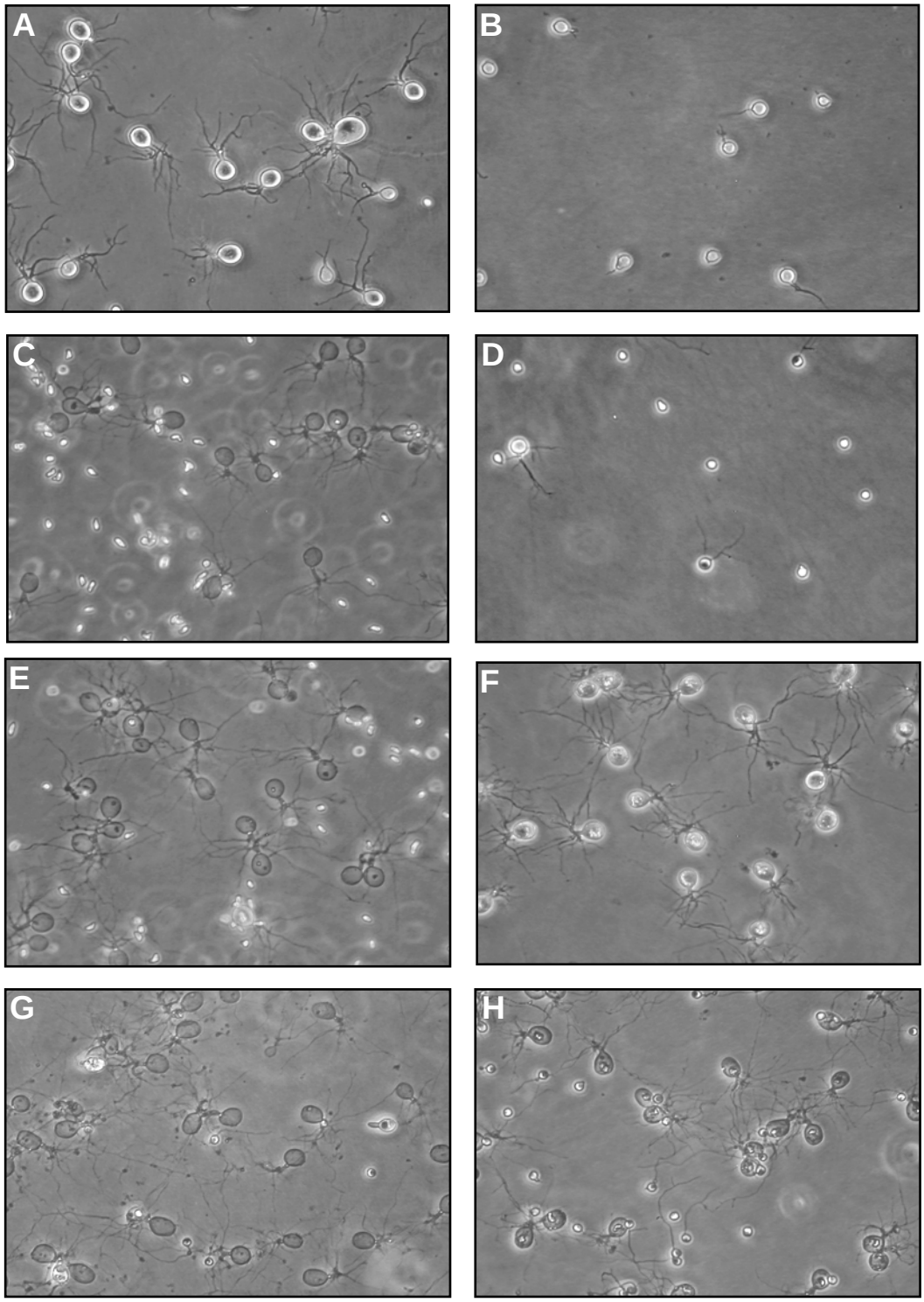


Figura 11 – Microscopia ótica de células em diferentes tempos da germinação e esporulação em condições fisiológicas ou expostas a 100 μM de $CdCl_2$. Os painéis à esquerda correspondem ao controle e os painéis à direita aos tratamentos. **A** – células vegetativas de 6 h após a indução da germinação; **B** – células vegetativas de 6 h após a indução da germinação, expostas a 100 μM de $CdCl_2$ dos 30 aos 60 min da germinação; **C** e **E** – células em A, 210 min após a indução da esporulação; **D** – células mostradas em B, 210 min após a indução da esporulação; **F** – células mostradas em A, 210 min após a indução da esporulação, expostas a 100 μM de $CdCl_2$ dos 30 aos 60 min da esporulação; **G** – células mostradas em A, 26 h após a indução da esporulação; **H** - células mostradas em F, 26 h após a indução da esporulação.

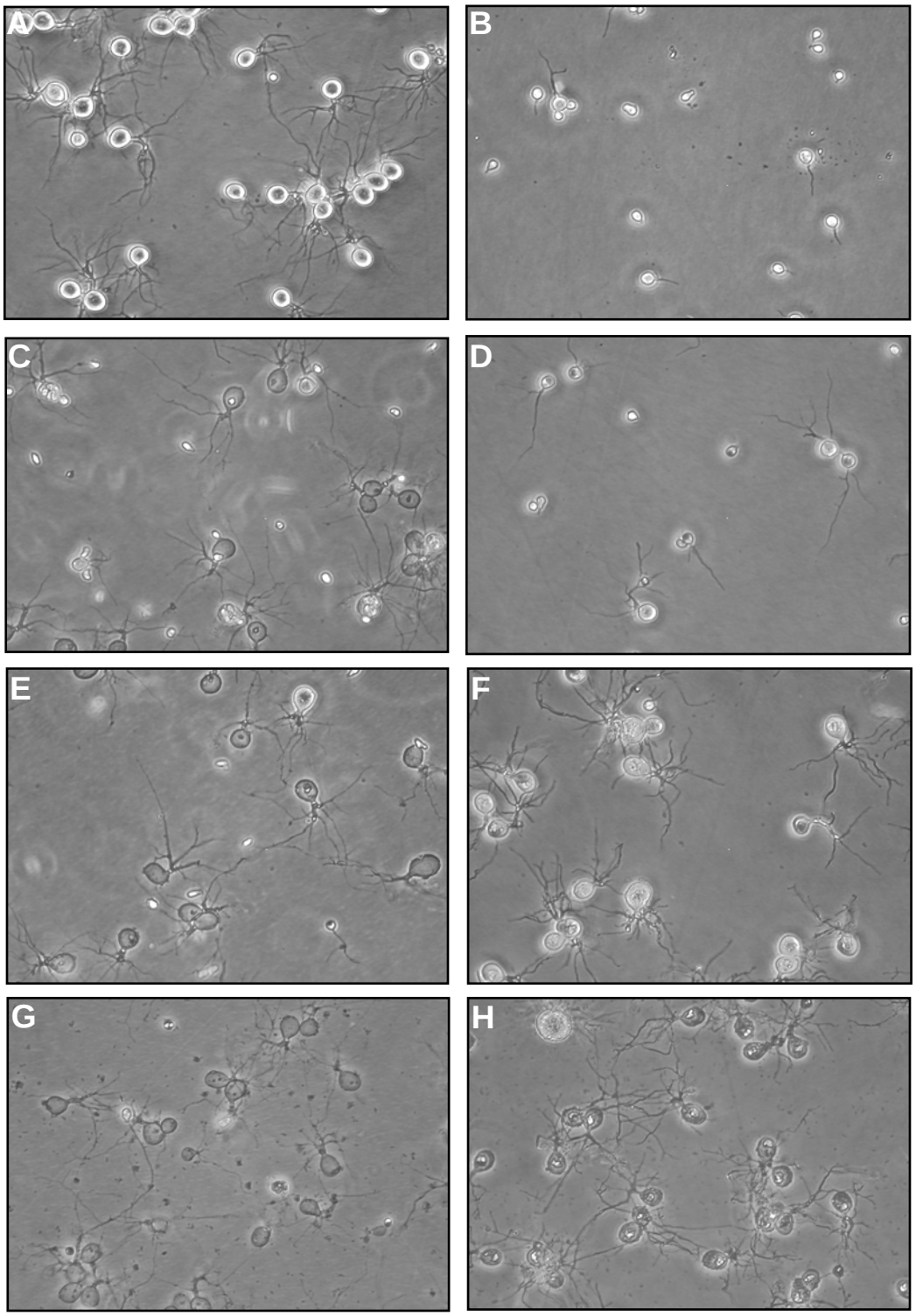


Figura 12 – Microscopia ótica de células em diferentes tempos da germinação e esporulação em condições fisiológicas ou expostas a 200 μM de $CdCl_2$. Os painéis à esquerda correspondem ao controle e os painéis à direita aos tratamentos. **A** – células vegetativas de 6 h após a indução da germinação; **B** – células vegetativas de 6 h após a indução da germinação, expostas a 200 μM de $CdCl_2$ dos 30 aos 60 min da germinação; **C** e **E** – células em A, 210 min após a indução da esporulação; **D** – células mostradas em B, 210 min após a indução da esporulação; **F** – células mostradas em A, 210 min após a indução da esporulação, expostas a 100 μM de $CdCl_2$ dos 30 aos 60 min da esporulação; **G** – células mostradas em A, 26 h após a indução da esporulação; **H** - células mostradas em F, 26 h após a indução da esporulação.

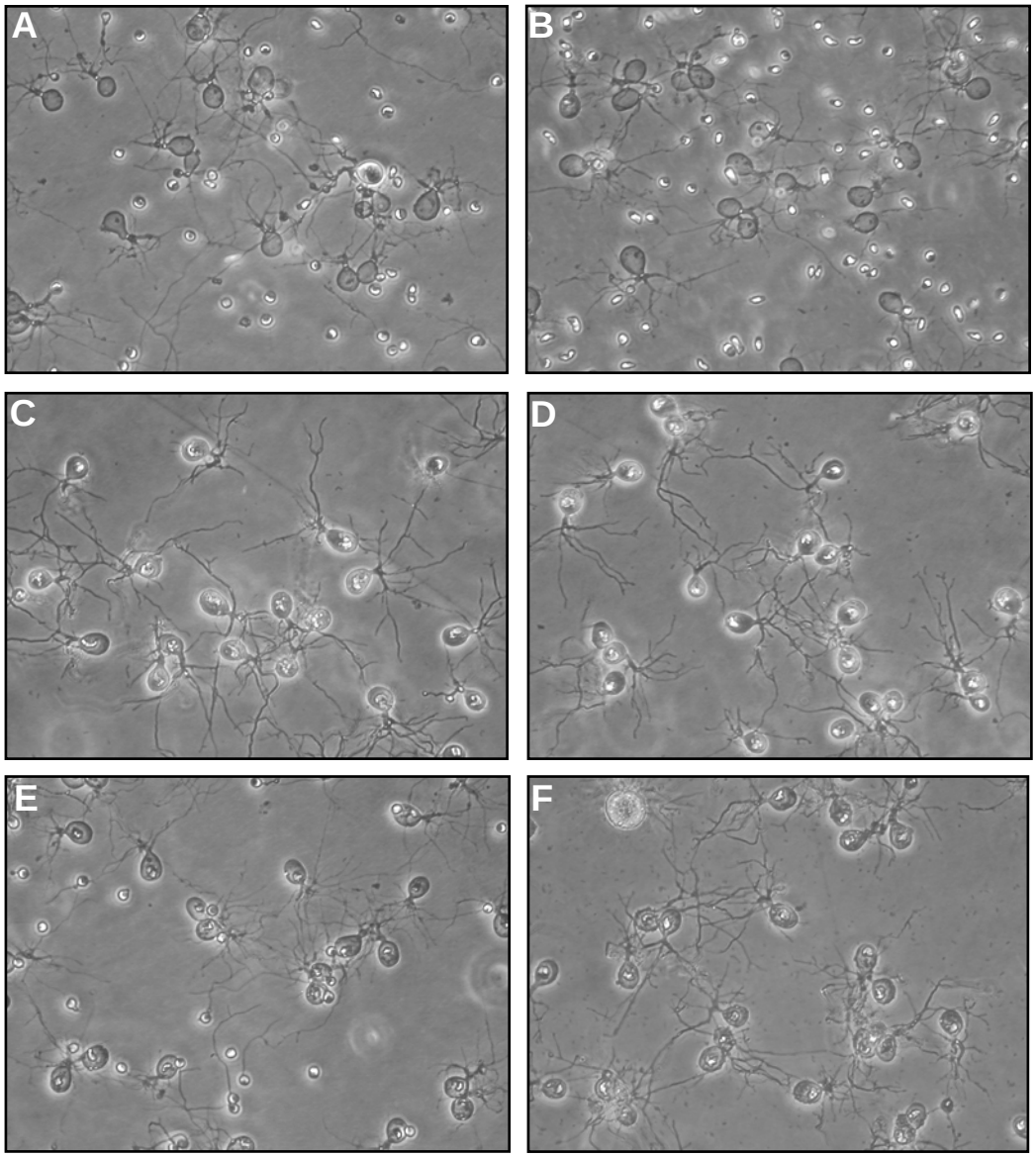


Figura 13 – Microscopia ótica de células da fase de esporulação em condições fisiológicas e submetidas ao choque térmico (38°C) ou cádmio. **A** – células de 18 h após a indução da esporulação (controle); **B** – células de 18 h após a indução da esporulação, expostas a 38°C dos 30 aos 60 min da esporulação; **C** – células de 18 h após a indução da esporulação, expostas a cádmio ($CdCl_2$ 100 μM) dos 30 aos 60 min da esporulação; **D** – células de 18 h após a indução da esporulação, expostas a cádmio ($CdCl_2$ 200 μM) dos 30 aos 60 min da esporulação; **E** - células mostradas em C, 26 h após a indução da esporulação; **F** - células mostradas em D, 26 h após a indução da esporulação.

2.5 – Análise dos genes diferencialmente expressos em resposta ao choque térmico em *B. emersonii*

As hibridizações competitivas foram realizadas utilizando RNA provenientes de células de *B. emersonii* submetidas a choque térmico (38°C) dos 30 aos 60 min após a indução da germinação ou da esporulação (Tabela 8). Após a análise dos dados, 101 genes foram identificados como diferencialmente expressos em resposta ao choque térmico durante a esporulação, sendo 61 deles induzidos e 40 reprimidos. Em resposta ao choque térmico durante a germinação, foram identificados como diferencialmente expressos 115 genes, sendo 95 deles induzidos e 20 reprimidos.

Dentre os genes induzidos por choque térmico, tanto na esporulação (S) quanto na germinação (G), encontramos como esperado um grande numero de genes que codificam proteínas relacionadas com o enovelamento de proteínas e com a proteólise (23%-S e 20%-G), bem como proteínas com propriedades antioxidantes (8%-S e 5%-G), proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos (7%-S e 6%-G) e no metabolismo de carboidratos (5%-S e 4%-G) (Figura 14). Nas tabelas 9 e 10 são mostrados os genes induzidos por choque térmico na esporulação e na germinação, respectivamente, os quais apresentaram similaridade com alguma seqüência do banco de dados do GenBank e/ou do Swiss Prot. A lista completa dos genes diferencialmente expressos em resposta ao choque térmico em *B. emersonii* está apresentada no Material suplementar (Tabelas S1, S2, S3 e S4).

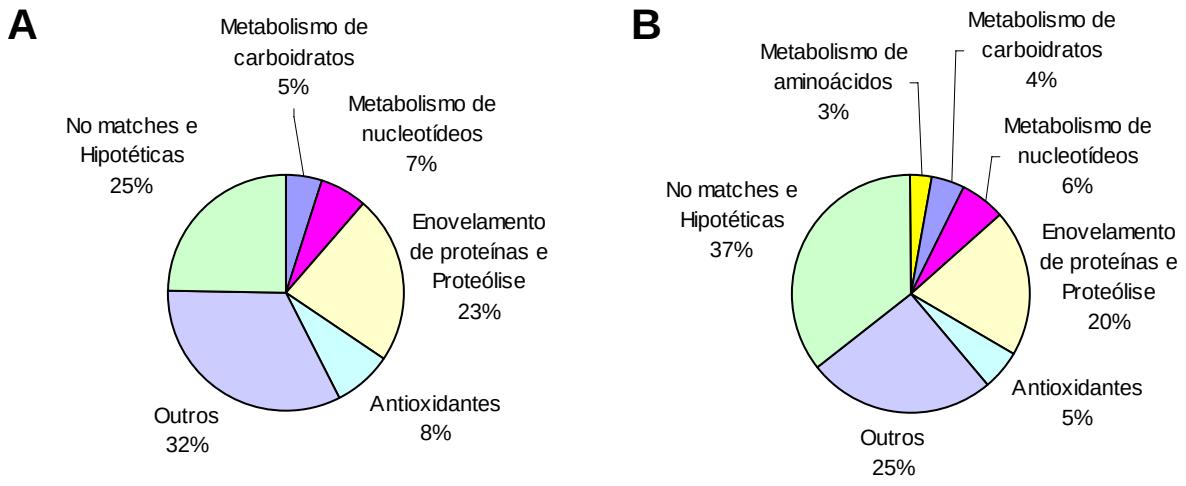


Figura 14 – Anotação em categorias funcionais dos genes induzidos por choque térmico. **A** – Categorias dos genes induzidos na esporulação. **B** – Categorias dos genes induzidos na germinação.

Tabela 09 – Genes induzidos por choque térmico na esporulação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	E_HS
Metabolismo de carboidratos				
BeE90D03C08	P34335	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain	(b) carbohydrate metabolism	2
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	2
BeG90N03E03	P42894	Enolase	(b) glycolysis	3
Metabolismo de nucleotídeos				
BeG120N03B10	Q4PG43	Activator 1 38 kDa subunit	(b) DNA replication	4
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication	17
BeE60H29B05	Q5W6B8	Putative polyprotein	(b) DNA transposition	2
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2
Enovelamento de proteínas e proteólise				
BeE60H06D11		Hsp17	(b) protein folding	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding	4
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	3
BeZSPN11F12	Q4P232	Hsp60	(b) protein folding	2
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2
BeE60H15E02	Q5KLR7	Member of the DnaJ family Ydj1p	(b) protein folding	2
BeG90N10D09	Q4PFU5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	(b) protein folding	2
BeE60N13G10	P40046	Vacuolar transporter chaperone 1	(b) protein folding	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	2
BeE90D17A05	Q3X668	Hsp20	(b) protein folding	3
BeG60N08F12	Q4P5L7	SAC3/GANP domain protein	(b) protein modification	5
BeE60H23F08	Q93561	Der1-like protein 2	(b) protein transport	2
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism	3
Antioxidantes				
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase 1	(m) oxidoreductase activity	2
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxin	(m) oxidoreductase activity	2
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	2
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity	2
Outros				
BeE60H22D05	Q4WXC6	Mitochondrial acidic protein MAM33		2
BeE60H26A01	Q9D7M1	Protein C20orf11 homolog		2
BeE120N01E11	Q7Q5S6	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II	(m) phosphoric monoester hydrolase activity	2
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	5
BeG90N05C03	Q31ME1	SAM-dependent methyltransferases	(m) SAM-dependent methyltransferase activity	2
BeE60H28B12	Q4P9H4	Acetolactate synthase Ilv2	(m) thiamin pyrophosphate binding	2
BeNSVP10H03	Q873A4	Cytochrome-c oxidase activity	(b) electron transport	2
BeE60H32G06	Q9P7N9	Trafficking protein particle complex subunit 5	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	11
BeG60N08E04	Q6NYZ1	Nucleosome assembly protein (NAP)	(b) nucleosome assembly	2
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport	2

BeG120N07D11	Q5KEP5	Diacylglycerol cholinephosphotransferase	(b) phospholipid biosynthesis	2
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	3
BeZSPN17C11	Q6C3M2	Secretory pathway GDP dissociation inhibitor	(b) regulation of GTPase activity	2
BeE60H29E01	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress	2
BeE90D13B08	Q7Q7M3	GTPase	(b) ribosome biogenesis	2
BeG90N18F12	Q4HU89	GTPase of unknown function	(m) GTP binding	2
BeG60N05A06	Q7PSD1	GTP binding protein	(m) nucleotide binding	2
BeG60N20C08		TPR domain protein		2
BeE120N38F02		Leucine Rich Repeat domain containing protein		2
BeE30N20B08		Putative elicitor-responsive gene		4

As categorias *No match* e Hipotéticas não são mostradas nas tabelas. A coluna E_HS corresponde à razão de expressão dos genes em relação ao controle sem choque térmico. Processo Biológico (b) e Função Molecular (m) representam categorias do Gene Ontology (GO). Swiss Prot corresponde ao código das proteínas presentes neste banco de dados com as quais foi observada similaridade através de BlastX com os respectivos genes putativos de *B. emersonii* (Clone ID).

Tabela 10 – Genes induzidos por choque térmico na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G_HS
Metabolismo de aminoácidos				
BeE30N10F07	Q6NWC3	Amino acid permease	(b) amino acid transport	2
BeZSPN17H06	O06479	Amino acid permease	(b) amino acid transport	2
BeE60C15E06	Q5X330	Glutamine synthetase	(b) glutamine biosynthesis	2
Metabolismo de carboidratos				
BeE90D03C08	P34335	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain	(b) carbohydrate metabolism	3
BeE90D02G04	Q4INK9	Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	(b) carbohydrate metabolism	3
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	3
BeE60C31B06	Q4AQV4	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase precursor	(b) glycerol metabolism	3
Metabolismo de nucleotídeos				
BeG120N03B10	Q4PG43	Activator 1 38 kDa subunit	(b) DNA replication	3
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication	9
BeE60H29B05	Q5W6B8	Putative polyprotein	(b) DNA transposition	3
BeZSPN17B12	Q8S819	Putative transposase	(b) DNA transposition	2
BeE60H22E01	Q9ES84	snRNP core protein SMX5d	(b) mRNA processing	2
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2
Enovelamento de proteínas e proteólise				
BeE60H06D11		Hsp17	(b) protein folding	2
BeE30N03D10	Q6USC1	Cyclophilin A	(b) protein folding	2
BeE60C24C07	Q7ZA53	FK506-binding protein	(b) protein folding	2
BeE60H32E04	Q75UL2	FK506-binding protein	(b) protein folding	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding	4
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	2
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2
BeE60H19D03	Q99170	Hsp70-8	(b) protein folding	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	4
BeG90N10D09	Q4PFU5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	(b) protein folding	2
BeG60N12E03	Q4G0C5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	(b) protein folding	3
BeE60H24H06	Q3U0J1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase like	(b) protein folding	2
BeG120N25A08	O14334	Probable prefoldin subunit 1	(b) protein folding	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2
BeE60N02A06	Q4I9S8	Ubiquitin-activating enzyme E1 (UBA)	(b) protein modification	3
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism	7
BeE60C30D10	Q6C2Y1	Related to ubiquitin-activating enzyme E1	(b) protein modification	2
BeE60N10G05	Q9CZJ2	Hsp70-10	(m) nucleotide binding	2
BeG60N08F12	Q4P5L7	SAC3/GANP domain protein	(m) protein modification	3
Antioxidantes				
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxin	(m) oxidoreductase activity	2
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase 1	(m) oxidoreductase activity	3
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	2
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	2
Outros				
BeG60N15E05	P17624	NUD-1 protein	(b) cell division	2

BeNSVP10H03	Q873A4	Cytochrome-c oxidase activity	(b) electron transport	2
BeE60H32G06	Q9P7N9	Trafficking protein particle complex subunit 5	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	13
BeE60N03G10	Q5KJC4	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	(b) lipid biosynthesis	2
BeE120N09D11	Q4P363	AMP-binding protein	(b) metabolism	2
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport	3
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	4
BeE90D07H12	Q6NWC3	40S ribosomal protein S2	(b) protein biosynthesis	2
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis	2
BeE60H32H12	Q7Q7M3	ADP-ribosylation factor-like protein 1	(b) small GTPase mediated signal transduction	2
BeE90D04C07	Q4P6E9	Cofilin	(m) actin binding	2
BeE60N16C07	Q5U3C0	ARMC4 protein	(m) binding	2
BeE120N31D03	Q2TL59	Calreticulin	(m) calcium ion binding	2
BeE120N38E10	Q9D5P6	Similar to Calmodulin-like protein	(m) calcium ion binding	2
BeG30N12F01	Q6XQ94	Putative endonuclease	(m) endonuclease activity	3
BeE60N13A07	Q7KQS3	Nuclear pore protein SEH1	(m) protein binding	2
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	4
BeE120N25H03	Q2PBB6	14-3-3 protein	(m) protein domain specific binding	2
BeG90N05C03	Q31ME1	SAM-dependent methyltransferases	(m) SAM-dependent methyltransferase activity	2
BeNSVP03D01	Q7RXW0	Probable nuclear protein SNF4		2
BeE120N38F02		Leucine Rich Repeat domain containing protein		2
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein		2
BeE60N05B05		Leucine-rich protein		2
BeE90N15B12		Cytochrome P-450		2

G_HS corresponde à razão de expressão dos genes em relação ao controle sem choque térmico. Outros detalhes estão descritos na Tabela 9.

2.5.1 - Enovelamento de proteínas e proteólise

Como esperado, vários genes que codificam chaperones moleculares, responsáveis pelo correto enovelamento de proteínas foram induzidos pelo estresse térmico tanto na germinação quanto na esporulação. Dentre eles encontra-se o gene que codifica a Hsp17, uma proteína que faz parte da família das Hsps de baixo peso molecular (*small* Hsps). O gene *hsp17* foi o que apresentou o maior número de ESTs seqüenciados na biblioteca de cDNA de choque térmico (Tabela 5) e foi caracterizado neste trabalho (item IV-4). Os genes codificando as proteínas Hsp10, Hsp90 e PPIase C foram observados como induzidos nos ensaios de microarranjos e também estão entre as ESTs mais abundantes da biblioteca de cDNA de choque térmico (HSR). Observamos também a indução de genes que codificam as proteínas de choque térmico Hsp100, Hsp60, Hsp70-2, Hsp70-8, Hsp20, Hsp70-10, Ciclofilina A, FK506-*binding protein*, Prefoldina e Psi1, além de outras PPIases. A caracterização da expressão dos diferentes genes da família Hsp70 de *B. emersonii* durante o desenvolvimento do fungo em temperatura fisiológica e durante o choque térmico foi também realizada neste trabalho e os resultados obtidos serão apresentados no item IV-3 da tese.

Genes que codificam proteínas relacionadas com a proteólise também foram observados entre os genes induzidos por choque térmico na germinação e esporulação. Dentre estes genes encontra-se aquele codificando a proteína Der1, que é especificamente requisitada no processo de degradação de proteínas desenoveladas presentes no lúmen do retículo endoplasmático (Knop *et al.*, 1996). Outro gene relacionado com a proteólise é o que codifica a proteína Arginina-tRNA transferase que é responsável pela inserção pós-traducional de arginina na extremidade N-terminal de outras proteínas, direcionando-as para a proteólise dependente de ubiquitina (Meinnel *et al.*, 2006). Dois genes relacionados com a proteólise dependente de ubiquitina também foram observados como induzidos pelo choque térmico. Eles codificam dois parálogos putativos da enzima ativadora de ubiquitina E1, que é responsável pelo primeiro passo da via de ubiquitinação de proteínas. Esta ubiquitinação pode alterar a função e/ou a localização das proteínas ou direcioná-las para a degradação através do proteassomo 26S (Sun & Chen, 2004).

2.5.2 – Proteínas com propriedades antioxidantes

Cinco genes foram observados como induzidos pelo choque térmico na germinação na categoria de antioxidantes, e correspondem exatamente aos mesmos genes desta categoria induzidos pelo estresse térmico na esporulação. Eles codificam as Glutationa-S transferases 1, 2 e 3, e as proteínas Tiorredoxina peroxidase e Peroxirredoxina. Em *S. pombe*, estes genes fazem parte da

resposta geral a estresses ambientais (*core environmental stress response*), e apresentam-se induzidos em pelo menos quatro tipos diferentes de estresse (Chen *et al.*, 2003).

2.5.3 – Proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos

Genes codificando proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos também foram observados como induzidos em nossas análises. Estes genes codificam proteínas relacionadas com o metabolismo de glicogênio, como a cadeia regulatória alfa da fosforilase B; proteínas importantes da via glicolítica, como a Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e a Enolase, assim como proteínas do metabolismo de glicerol, como um precursor da Glicerofosforil-diester fosfodiesterase. Genes relacionados com o metabolismo de carboidratos têm sido também observados como induzidos em resposta a outros estresses ambientais em fungos (Fauchon *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003).

2.5.4 – Categorias do GO mais representadas entre os genes induzidos em resposta ao choque térmico na germinação e esporulação

Utilizando o programa BayGO (Vencio *et al.*, 2006), procuramos as categorias do GO mais representadas entre os genes induzidos em resposta ao choque térmico. Coerente com os resultados observados, as categorias mais altamente representadas em resposta ao choque térmico na esporulação foram as de *protein folding* (GO:0006457), *response to unfolded protein* (GO:0006986) e *unfolded protein binding* (GO:0051082). Já as categorias mais altamente representadas entre os genes induzidos em resposta ao choque térmico na germinação foram as de: *protein folding* (GO:0006457), *response to unfolded protein* (GO:0006986), e *peptidyl-prolyl-cis-trans-isomerase activity* (GO:0003755).

2.5.5 – Genes induzidos tanto na esporulação como na germinação e genes específicos da resposta ao choque térmico

Dos genes observados como induzidos, um total de 34 apresentou indução por choque térmico tanto na fase de esporulação quanto na germinação (Tabela 11). Estes genes comuns aos dois estágios codificam principalmente as proteínas de choque térmico mencionadas acima e proteínas com propriedades antioxidantes. Dentre os 46 genes que possuem uma função putativa e são induzidos na esporulação por choque térmico, 74% são também induzidos na germinação em resposta ao choque térmico. É interessante notar que 18 genes mostraram ser específicos da resposta ao choque térmico (isto é, não foram observados como diferencialmente expressos nas células tratadas com cádmio nos ensaios de microarranjos, como veremos adiante), sendo que destes, 39% não apresentaram uma função putativa (Tabela 12).

Tabela 11 – Genes induzidos por choque térmico em *B. emersonii* tanto na esporulação quanto na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G_HS	E_HS
BeG60N08F12	Q4P5L7	Hypothetical protein	(b) apoptosis	3	5
BeE90D03C08	P34335	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain	(b) carbohydrate metabolism	3	1
BeG120N03B10	Q4PG43	Activator 1 38 kDa subunit	(b) DNA replication	3	4
BeE60H16G11	Q6CCZ9	Similar to 40S ribosomal protein	(b) DNA replication	9	17
BeE60H29B05	Q5W6B8	Putative polyprotein	(b) DNA transposition	3	1
BeE60H32G06	Q9P7N9	Trafficking protein particle complex subunit 5	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	13	11
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	3	2
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport	3	2
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	4	3
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(b) protein binding	4	5
BeE60H06D11		Hsp17	(b) protein folding	2	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding	4	4
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	2	3
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	4	2
BeG90N10D09	Q4PFU5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	(b) protein folding	2	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2	2
BeE60H14B07	Q4P2B7	Hypothetical protein	(b) regulation of protein catabolism	7	3
BeNSVP10H03	Q873A4	Hypothetical protein	(m) cytochrome-c oxidase activity	2	2
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2	2
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase 1	(m) oxidoreductase activity	3	2
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxin	(m) oxidoreductase activity	2	2
BeG90N05C03	Q31ME1	SAM-dependent methyltransferases	(m) SAM-dependent methyltransferase activity	2	2
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	2	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	2	2
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity	2	2
BeE60H26G08		Hypothetical protein		3	2
BeE120N01H03		Unknown		3	2
BeE120N38F02		Unknown		2	2
BeE60H08F12		Unknown		9	10
BeE60H15D02		Unknown		4	3
BeE60H26C07		Unknown		5	4
BeE60N01B04		Unknown		3	2
BeE90N13H07		Unknown		6	8

Notação conforme Tabela 9.

Tabela 12 - Genes induzidos em *B. emersonii* apenas no choque térmico.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G_HS	E_HS
BeG120N03B10	Q4PG43	Activator 1 38 kDa subunit	(b) DNA replication	3	4
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	3	2
BeE60H06D11		Hsp17	(b) protein folding	2	2
BeE60N10G05	Q9CZJ2	Hsp70-10	(m) ATP binding	2	-
BeG60N08F12	Q4P5L7	Hypothetical protein	(b) protein modification	9	10
BeNSVP10H03	Q873A4	Hypothetical protein	(m) cytochrome-c oxidase activity	2	2
BeE60H26G08		Hypothetical protein		3	2
BeG90N10D09	Q4PFU5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	(b) protein folding	2	2
BeE90D03C08	P34335	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain	(b) carbohydrate metabolism	3	1
BeE60H29B05	Q5W6B8	Putative polyprotein	(b) DNA transposition	3	1
BeG90N05C03	Q31ME1	SAM-dependent methyltransferases	(m) SAM-dependent methyltransferase activity	2	2
BeE60H32G06	Q9P7N9	Trafficking protein particle complex subunit 5	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	13	11
BeE120N01H03		Unknown		3	2
BeE120N03D02		Unknown		2	-
BeE120N38F02		Unknown		2	2
BeE60C24E07		Unknown		2	-
BeE60H16A10		Unknown		2	-
BeE60N05B05		Unknown		2	-

Notação conforme Tabela 9.

2.5.6 – Genes reprimidos durante o choque térmico

Grande parte dos genes cuja expressão diminui durante o choque térmico não apresentou uma função putativa. Foram classificados como *unknown*, 67% dos genes reprimidos por esse estresse na esporulação. Já entre os genes reprimidos por choque térmico na germinação, este número é menor (35%). A lista completa dos genes reprimidos pelo choque térmico é apresentada no Material suplementar (Tabelas S3 e S4). Embora a maioria dos genes reprimidos na esporulação e germinação não possua uma função putativa, as categorias do GO *biosynthesis* (GO:0009058) e *protein polymerization* (GO:0051258) foram observadas como altamente representadas entre os genes reprimidos na esporulação e as categorias *oligopeptide transport* (GO:0006857) e *ribosome biogenesis and assembly* (GO:0042254) na germinação.

2.6 - Análise dos genes diferencialmente expressos em resposta a cádmio

Para determinar os genes induzidos ou reprimidos na presença de cádmio, hibridizações competitivas foram realizadas utilizando amostras de RNA provenientes de células de *B. emersonii* expostas a $CdCl_2$ (concentração final de 100 e 200 μM) dos 30 aos 60 min após a indução da germinação ou da esporulação (Tabela 8). A análise dos dados revelou 203 genes como diferencialmente expressos durante a esporulação em resposta a cádmio, sendo 117 deles induzidos e 85 reprimidos. Em resposta ao estresse por cádmio durante a germinação, foram identificados como diferencialmente expressos 151 genes sendo 100 deles induzidos e 51 reprimidos.

Os genes induzidos por cádmio tanto na esporulação (S) quanto na germinação (G) codificam principalmente proteínas com propriedades antioxidantes (9%-S e 17%-G), proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos (11%-S e 6%-G), proteínas relacionadas com o transporte celular (6%-S e 11%-G) e proteínas envolvidas no enovelamento de proteínas e proteólise (7%-S e 7%-G) (Figura 15). Nas tabelas 13 e 14 são mostrados os genes induzidos por cádmio na esporulação e germinação, respectivamente, que apresentaram similaridade com seqüências do banco de dados do GenBank e/ou do Swiss Prot. A lista completa dos genes diferencialmente expressos em resposta a cádmio em *B. emersonii* pode ser vista no Material suplementar (Tabelas S5, S6, S7 e S8).

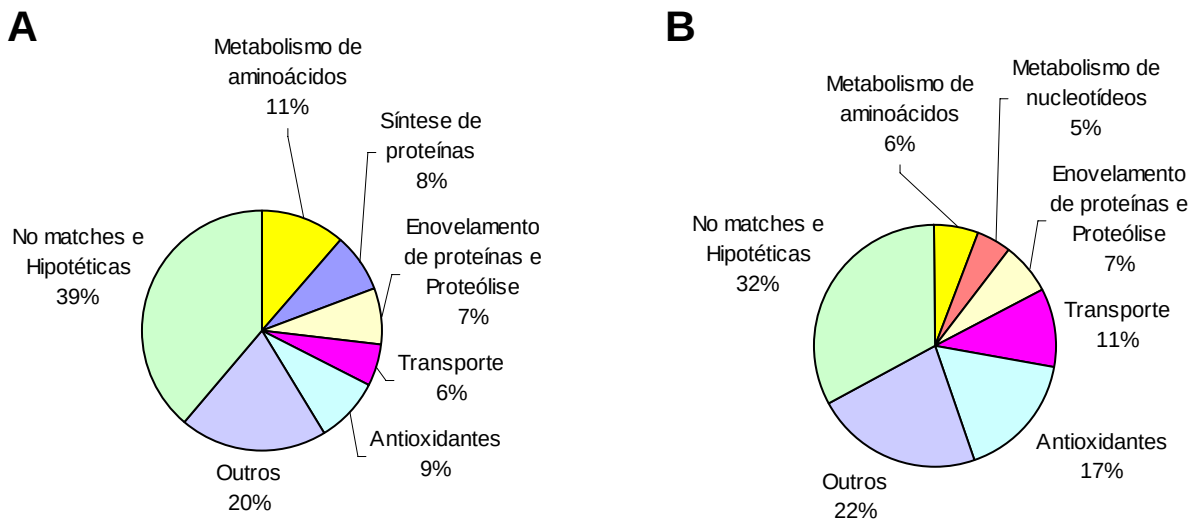


Figura 15 – Classificação dos genes induzidos por cádmio em categorias funcionais. **A** – Classificação dos genes induzidos na esporulação. **B** – Classificação dos genes induzidos na germinação.

Tabela 13 – Genes induzidos por cádmio na esporulação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	E100	E200
Metabolismo de aminoácidos					
BeE120N02B11	Q9Y823	Homocitrate synthase, mitochondrial precursor	(b) amino acid biosynthesis		2
BeE60C11F11	Q6FWJ8	Argininosuccinate synthase	(b) amino acid biosynthesis	3	
BeE90D12G12	Q03393	6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	(b) amino acid metabolism	5	3
BeG120N15B05	Q00266	S-adenosylmethionine synthetase	(b) amino acid metabolism		2
BeG120N26D12	Q5KJ92	Glutamate dehydrogenase	(b) amino acid metabolism	2	
BeG60N01F09	Q4WZ19	High affinity methionine permease	(b) amino acid transport	2	4
BeZSPN05A11	Q6BS26	Amino acid permease	(b) amino acid transport	3	8
BeE30N06E01	Q34DS8	Amino acid permease family protein	(b) amino acid transport		2
BeE60H21G09	Q8PLF9	Cationic amino acid transporter	(b) amino acid transport		2
BeG30N07G09	Q7NI34	Probable amino acid transporter	(b) amino acid transport		4
BeG30N12H02	Q7NK14	Probable amino acid transporter	(b) amino acid transport		3
BeG30N13H09	Q3WZJ7	Amino acid transporters	(b) amino acid transport		2
BeG90N09B05	Q43YH9	Sodium:dicarboxylate symporter	(b) dicarboxylic acid transport		2
BeE30N19D09	Q54X49	N5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	(b) methionine biosynthesis		2
Síntese de proteínas					
BeE90D13A09	Q962Y8	Ribosomal protein L18	(b) protein biosynthesis	2	2
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis		2
BeE90D11C10	Q4P991	Ribosomal L10 protein, putative	(b) protein biosynthesis		2
BeG120N17E03	Q754C8	Elongation factor 2	(b) protein biosynthesis		3
BeG90N19F12	O14460	Elongation factor 2	(b) protein biosynthesis		3
BeZSPN01B08	Q4PEZ5	Ribosomal protein S12	(b) protein biosynthesis		2
BeZSPN09C01	Q5D0C9	Ribosomal protein S20	(b) protein biosynthesis		3
BeE120N26D02	Q4P991	60S ribosomal protein L10	(b) protein biosynthesis	2	
BeG90N05A04	Q6BKG1	60S acidic ribosomal protein P0	(b) ribosome biogenesis and assembly		2
BeG30N16H05	Q4P0C0	Probable eukaryotic translation initiation factor 6	(b) translational initiation	6	3
Enovelamento de proteínas e proteólise					
BeE90D13D07	Q4X1P0	Hsp60	(b) protein folding	2	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding		3
BeG30N02D12	Q6FPX9	Metacaspase	(b) proteolysis	15	3
BeZSPN06B03	Q3AS69	Metacaspase	(b) proteolysis	4	2
BeE120N32F08	Q3J9Z6	Peptidase C14, caspase catalytic subunit p20	(b) proteolysis	3	2
BeZSPN14H04	Q55KQ8	Protein with caspase domain	(b) proteolysis		2
BeG30N17E08	Q59RF7	Peptidase	(b) proteolysis	9	
BeG60N07C03	Q55VL6	Hsp70-3	(m) nucleotide binding		2
BeE90N04D11		Metacaspase		3	3
BeG30N02C03		Metacaspase		18	6
Transporte					
BeG120N22G10	Q4HUL9	Monosaccharide transporter	(b) carbohydrate transport		4
BeG90N16C06	Q5K7D2	Hexose transporter HXT14	(b) carbohydrate transport		2
BeE60C17C02	P38356	Metal homeostatis protein BSD2	(b) metal ion transport	5	6
BeE60C08E01	Q6P7N0	ADP/ATP translocase	(b) mitochondrial transport	2	2
BeZSPN09E08	Q7Z8B6	H(+)-ATPase	(b) proton transport		2

BeE60C03D04	Q7WH61	Putative efflux system transmembrane protein	(b) transport		2
BeE90D08C11	Q35AA5	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7	(b) transport	2	
Antioxidantes					
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 6	(b) cell redox homeostasis	2	2
BeE90D18H03	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 5	(b) cell redox homeostasis	5	3
BeE60H19G07	Q4ING2	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	(b) electron transport	8	4
BeE90D07E02	Q4ING2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport	18	9
BeE90D11E10	Q4PFU9	Disulfide-like protein	(b) electron transport		2
BeE60C04G01	O14463	Thioredoxin	(b) response to reactive oxygen species		2
BeE120N20B11	Q92SR2	Putative glutathione S-transferase 4	(m) glutathione transferase activity	6	3
BeE90D16C06	P91252	Probable glutathione S-transferase 3	(m) glutathione transferase activity	2	
BeE60H29C03	Q36TA0	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	(m) oxidoreductase activity (b) metabolism	2	
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	4	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	4	3
Outros					
BeG30N10B09	Q4I159	Putative aminotransferase	(b) biosynthesis		2
BeE60N03F03	Q4P9L4	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase	(b) carbohydrate metabolism	2	
BeG90N10C12	Q802A8	Heterochromatin protein 1 gamma	(b) chromatin assembly or disassembly		2
BeG120N24F09	P07053	Pathogenesis-related protein 1B precursor	(b) defense response		2
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication		2
BeE60N10H11	Q7PVB7	Kinesin-like protein	(b) microtubule-based movement		2
BeZSPN16B05	Q4E4D1	Choline transporter-like protein 2	(b) phosphate metabolism	2	
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	6	10
BeE90D17B02	Q2UFR5	Isoflavone reductase family protein CipA	(b) regulation of nitrogen utilization	9	5
BeE60H29E01	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress	2	2
BeE60N09E09	Q8LG37	AtPH1-like protein	(b) steroid metabolism		2
BeE60N04D09	O00625	Pirin-like protein 1	(b) transcription from RNA polymerase II promoter	12	5
BeE120N37F12	Q4R349	Similar to human armadillo repeat containing 4	(m) binding	3	3
BeE90D08A05	Q4ILJ0	Hypothetical protein	(m) nucleic acid binding	4	4
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	3	2
BeE60H07F03	Q22020	Hypothetical protein	(m) protein binding		2
BeG30N10E10	Q9VXY3	Dihydrolipoyl transacylase	(m) protein binding		2
BeG30N10B05	Q4ILF9	Chitin synthase class VI	(m) transferase activity, transferring hexosyl groups		2
BeE120N35B10		Super cysteine rich protein; SCRP		6	3
BeG90N07B05	Q5K8Z0	Stomatin-like protein		5	2
BeE30N20B08		Putative elicitor-responsive gene		4	5
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein		3	4
BeG30N09B10		CLB1-like protein			2

As categorias *No match* e Hipotéticas não são mostradas nas tabelas. As colunas E100 e E200 correspondem à razão de expressão dos genes em células tratadas na esporulação com cádmio 100 e 200 μM, respectivamente, em relação ao controle sem cádmio. Processo Biológico (b) e Função Molecular (m) representam categorias do Gene Ontology. Swiss Prot corresponde ao código das proteínas presentes neste banco de dados com as quais foi observada similaridade através de BlastX com os respectivos genes de *B. emersonii* (Clone ID).

Tabela 14 - Genes induzidos por cádmio na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G100	G200
Metabolismo de aminoácidos					
BeG120N15B05	Q00266	S-adenosylmethionine synthetase	(b) amino acid metabolism	3	3
BeE120N26B11	O60931	Cystinosin	(b) amino acid metabolism	11	10
BeE30N06E01	Q34DS8	Amino acid permease family protein	(b) amino acid transport	2	2
BeG30N13H09	Q3WZJ7	Amino acid transporters	(b) amino acid transport		2
BeE90D18C05	Q752N9	Carbamoyl-phosphate synthase, arginine-specific	(b) glutamine metabolism		2
BeE90N13F05	Q9NL96	Glutathione reductase	(b) glutathione metabolism	2	
Antioxidantes					
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 6	(b) cell redox homeostasis	2	3
BeE90D18H03	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 5	(b) cell redox homeostasis	2	5
BeE90D07E02	Q4ING2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport	13	16
BeZSPN10H02	Q7RW00	NADPH oxidase 1	(b) electron transport		2
BeE60H19G07	Q4ING2	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	(b) electron transport	6	
BeE90D18F01	Q754Y9	Glutathione peroxidase 3	(b) response to oxidative stress	2	2
BeE120N20B11	Q92SR2	Putative glutathione S-transferase 4	(m) glutathione transferase activity	2	4
BeE30N15D01	Q7SC51	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	(m) oxidoreductase activity	3	3
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxins	(m) oxidoreductase activity	2	3
BeE60C16F10	Q8XQU5	Putative oxidoreductase protein	(m) oxidoreductase activity		3
BeE60H29C03	Q36TA0	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	(m) oxidoreductase activity		2
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase	(m) oxidoreductase activity	3	
BeE60H08E04	Q4WVA8	Quinone oxidoreductase	(m) oxidoreductase activity	2	
BeE60N16E03	Q4P7C0	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	(m) oxidoreductase activity	3	
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	4	9
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) glutathione transferase activity	3	3
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	4	11
Enovelamento de proteínas e proteólise					
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	3	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	4	3
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding		2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2	
BeG120N23B05	Q5KPI3	T-complex protein 1, eta subunit	(b) protein folding	2	
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism	3	3
Metabolismo de nucleotídeos					
BeE60N08H04	Q6PBZ8	Exosome complex exonuclease	(b) RNA processing	2	
BeZSPN17H02	P35551	Fibrillarin	(b) rRNA processing	2	
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2	2
BeE90N18D12-1	Q8L460	Putative DNA-damage repair protein DRT111	(m) nucleotide binding	2	
BeG30N08H04	Q4P3W3	Putative ATP-dependent RNA helicase	(m) RNA binding	2	
Transporte					
BeE60H27A03	P53337	Surfeit locus protein 4 homolog	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	2	
BeG30N19E11	Q8XMG8	Zinc transporter zupT	(b) metal ion transport	2	
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport		2

BeE60N18F10	O74846	Exocyst complex component sec6	(b) protein transport	2	
BeE120N05F06	Q54HG6	P-type ATPase	(b) proton transport	2	
BeE60C01B07	Q7WXJ8	Probable ferrisiderophore receptor protein, TonB dependent	(b) siderophore transport	2	
BeE60C03D04	Q7WH61	Putative efflux system transmembrane protein	(b) transport	2	3
BeE90D19D04	Q3YB29	ABC transporter, similar to Ycf1	(b) transport		2
BeG30N20G10	Q75HT8	Putative ATP-dependent transmembrane transporter (ABC family)	(b) transport		2
BeE90D17F04	Q3FM35	Inner-membrane translocator:ABC transporter precursor	(b) transport	2	
BeE90D19D08	Q8T665	ABC transporter AbcH.1	(b) transport	2	
Outros					
BeG30N13H07	Q13685	Angio-associated migratory cell protein	(b) cell motility	3	3
BeE60C06F05	Q9A6V8	Propionyl-CoA carboxylase, beta subunit	(b) fatty acid biosynthesis	2	
BeE90N12C06	Q880E1	Filamentous hemagglutinin, intein-containing	(b) intein-mediated protein splicing	2	
BeG30N19E04	Q5BAC2	Cysteine desulfurase, mitochondrial precursor	(b) metabolism		2
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis	4	5
BeE60C09E10	Q7WFQ7	Putative methionine sulfoxide reductase	(b) protein metabolism	2	
BeE90D17B02	Q2UFR5	Isoflavone reductase family protein CipA	(b) regulation of nitrogen utilization	7	13
BeE60H29E01	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress	2	
BeE60N16F05	Q5KHZ2	Aerobic respiration-related protein	(b) small GTPase mediated signal transduction	2	
BeE60N04D09	O00625	Pirin-like protein 1	(b) transcription from RNA polymerase II promoter	8	9
BeE120N37F12	Q4R349	Similar to human armadillo repeat containing 4	(m) binding	3	4
BeE60N12F01	Q4WDH3	Adenyl-nucleotide exchange factor	(m) binding		2
BeZSPN11E04	Q59Z14	HEAT-like (PBS lyase) domain	(m) binding		2
BeE90N16B06	Q7Q0S2	WD-repeat protein	(m) binding	2	
BeZSPN15E12	Q66KT3	HEAT-like (PBS lyase) repeat containing 1	(m) binding	2	
BeE60H08G12	Q75K28	NCS-1/frequenin-related protein	(m) calcium ion binding	2	
BeG30N11A12	Q4PGN7	Putative cytochrome c oxidase assembly protein	(m) copper ion binding	2	
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	2	
BeE60C10B01	Q6LUC6	Predicted nucleotidyltransferase	(m) transferase activity	2	
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein		2	5
BeE60C32D08		Putative integral membrane efflux protein		3	
BeZSPN16E09		Ankyrin containing protein		2	

As colunas G100 e G200 correspondem à razão de expressão dos genes em células tratadas na germinação com cádmio 100 e 200 μM, respectivamente, em relação ao controle sem cádmio. Para maiores detalhes vide Tabela 13.

2.6.1 – Metabolismo de aminoácidos

Vários genes codificando proteínas que participam do metabolismo de aminoácidos foram induzidos em resposta ao cádmio. Dentro desta categoria, destacam-se os genes codificando proteínas transportadoras de aminoácidos, incluindo um transportador de metionina de alta afinidade. Dois genes codificando proteínas envolvidas com a síntese deste aminoácido em *B. emersonii* foram também observados como induzidos por cádmio. Estes genes correspondem às enzimas N5-metiltetraidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferase e S-adenosilmetionina sintetase que são responsáveis respectivamente pela conversão de L-Homocisteína em L-metionina e deste último composto em S-adenosilmetionina. O metabólito S-adenosilmetionina pode ser posteriormente convertido através de outras reações enzimáticas em cisteína, um dos aminoácidos necessários para a síntese de Glutationa (γ-Glu-Cys-Gly, GSH). Outro aminoácido necessário para a síntese de glutationa é o glutamato, e o gene codificando a enzima Carbamoil-fosfato sintase, que está envolvida na síntese deste aminoácido, foi observado como induzido pelo estresse por cádmio. Interessantemente, observamos também o gene codificando uma Glutationa redutase como induzido por cádmio nos experimentos de microarranjos de DNA.

O gene codificando a proteína Cistinosina, que também está envolvida no metabolismo de aminoácidos, está entre os genes que apresentaram maior indução. A possível função desta proteína está relacionada com o transporte de L-cistina (dois resíduos de cisteína ligados por uma ponte dissulfeto) para fora dos lisossomos. Como mencionado acima, este aminoácido é importante para a síntese de glutationa, uma das principais moléculas responsáveis pelo seqüestro de metais dentro das células.

2.6.2 – Enovelamento de proteínas e proteólise

Em outros organismos, a indução de genes codificando Hsps, bem como o aumento da síntese destas proteínas em resposta ao tratamento com cádmio tem sido descrito. Em nossa análise observamos a indução dos genes codificando as proteínas Hsp100, Hsp90, Hsp60, Hsp70-3, Hsp70-2, Hsp10, Psi1 e uma das subunidades da chaperonina CCT. Interessantemente, apenas na esporulação observamos a alta indução de 4 genes codificando Metacaspases putativas e 2 genes codificando proteínas putativas que contêm domínios de caspase. Metacaspases são proteases, da família das caspases, encontradas em plantas, fungos e protozoários, e que estão relacionadas com a morte celular programada (apoptose) (Uren *et al.*, 2000). O gene codificando uma destas Metacaspases (BeG30N02D12) estava entre os genes que apresentaram as ESTs mais abundantes das bibliotecas de cádmio CDM e CDC. Além disso, assim como na resposta ao choque térmico,

observamos no tratamento com cádmio a indução do gene que codifica a proteína Arginina-tRNA transferase, que também está envolvida em proteólise (Meinnel *et al.*, 2006).

2.6.3 – Proteínas com propriedades antioxidantes

Tem sido proposto que a toxicidade do cádmio depende da sua habilidade em formar complexos com o sistema antioxidante de defesa da célula, causando desta forma estresse oxidativo. Interessantemente, dos genes induzidos por cádmio, 9% fazem parte da categoria proteínas com propriedades antioxidantes e foram induzidos em resposta a este estresse na esporulação. Na germinação esta porcentagem é ainda maior, alcançando 17% de todos os genes induzidos. Dentre estes genes encontram-se os codificando Glutationa S-transferases, que são enzimas destoxificadoras presentes em todos os organismos aeróbicos. É interessante notar que em resposta ao estresse por cádmio, *B. emersonii* aumenta a expressão de 6 genes diferentes de Glutationa S-transferases (GST), sendo que três destes genes (*gst* 1, 2 e 3) são também induzidos durante o choque térmico. O gene codificando uma Glutationa peroxidase foi também induzido por cádmio. Esta enzima tem como função principal proteger as células contra os danos causados pelos hidroperóxidos formados endógenamente, através da redução destes compostos por glutationa. Vários outros genes codificando proteínas com propriedades antioxidantes como as oxidorredutases, Peroxirredoxina, Tiorredoxina peroxidase, Tiorredoxina, NADPH oxidase, flavina oxidorreductase NADH-dependente e Quinona oxidorredutase também foram induzidos.

2.6.4 – Síntese de proteínas

Genes codificando proteínas envolvidas na síntese protéica também foram observados como induzidos por cádmio. Curiosamente, a porcentagem de genes induzidos por cádmio dentro desta categoria é maior quando as células de *B. emersonii* são expostas ao metal no estágio de esporulação. Estes genes codificam em sua maioria diferentes proteínas ribossômicas e alguns fatores de elongação da tradução.

2.6.5 – Transporte

O gene codificando uma proteína transportadora de zinco da família ZIP foi induzido pelo estresse com cádmio. Em *S. cerevisiae*, o transportador de baixa afinidade de zinco Ztr1 é o responsável pelo transporte de cádmio para dentro da célula (Gomes *et al.*, 2002). Observamos também vários genes induzidos por cádmio que codificam proteínas transportadoras do tipo ABC (***A**TP-**b**inding **c**assette transporters*). Os transportadores ABC são proteínas de membrana que

possuem vários domínios e são responsáveis pelo controle do efluxo e influxo de substâncias através das membranas celulares. Na levedura *S. cerevisiae*, a proteína responsável pelo transporte do complexo cádmio-bisglutationa do citoplasma para dentro do vacúolo é a proteína Ycf1, um transportador da família ABC (Li *et al*., 1997).

Outro gene interessante, cuja expressão foi bastante aumentada na presença de cádmio, codifica uma proteína de homeostase de metal Bsd2. Esta proteína em *S. cerevisiae* está associada com a regulação do metabolismo de metais pesados, como cádmio e cobre, assim como o metabolismo de radicais livres de oxigênio (Liu & Culotta, 1994). Genes codificando próton ATPases e proteínas transportadoras de carboidratos, foram também induzidos em resposta ao cádmio, sendo que este último grupo foi observado apenas na esporulação.

2.6.6 – Pirina e SCRP

Um gene altamente expresso em resposta a cádmio, tanto na germinação quanto na esporulação, foi o que codifica uma Pirina. Em humanos, a Pirina foi descrita como um cofator de transcrição. Em tomate, foi observado um aumento considerável dos níveis de mRNA da Pirina em células induzidas à morte celular programada (Dechend *et al*., 1999; Orzaez *et al*., 2001). Outro gene altamente induzido em resposta a cádmio foi o que codifica uma proteína rica em aminoácidos cisteína (Super Cysteine Rich Protein – SCRP). Este tipo de proteína desempenha um papel importante como antioxidante celular.

2.6.7 – Categorias do GO mais representadas entre os genes induzidos em resposta a cádmio na germinação e esporulação

Assim como procuramos identificar as categorias do GO mais representadas entre os genes induzidos em resposta ao choque térmico, realizamos esta mesma análise com os genes induzidos em resposta ao estresse por cádmio. As categorias mais altamente representadas em resposta a esse metal pesado na esporulação foram as de *glutathione transferase activity* (GO:0004364), *caspase activity* (GO:0030693), *amino acid transport* (GO:0006865) e *carbohydrate transport* (GO:0008643). Já as categorias mais altamente representadas entre os genes induzidos em resposta ao cádmio na germinação foram as de *glutathione transferase activity* (GO:0004364), *oxidoreductase activity* (GO:0016491) e *peroxidase activity* (GO:0004601).

2.6.8 – Genes induzidos em resposta a cádmio, mas não no estresse térmico

Ao todo 59 genes apresentaram expressão aumentada apenas em resposta ao estresse por cádmio e não no choque térmico, sendo que destes 34% não tem uma função putativa proposta (Tabela 15). Os genes que apresentaram uma possível função codificam principalmente proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, proteínas com propriedades antioxidantes e proteínas de transporte, e possivelmente fazem parte da resposta específica de *B. emersonii* a este estresse. É interessante notar que 5 dos 6 genes que codificam Glutationa S-transferases foram induzidos em todas as condições de cádmio testadas (Tabela 16), assim como os genes da Pirina, da CipA (proteína da família da Isoflavona redutase) e da flavina oxidorredutase NADH-dependente. Alguns genes, codificando proteínas sem função putativa definida, também apresentaram este comportamento.

2.6.9 – Genes reprimidos durante o tratamento com cádmio

Grande parte dos genes reprimidos por cádmio não apresentou uma função putativa, assim como observado no choque térmico. Foram classificados como *unknown* 56% dos genes reprimidos por esse estresse na esporulação. Já entre os genes reprimidos por cádmio na germinação, este número foi maior (67%). A lista completa dos genes reprimidos durante a exposição a cádmio está apresentada no Material suplementar (Tabelas S7 e S8). A única categoria do GO altamente representada entre os genes reprimidos por cádmio foi a *calcium ion binding* (GO:0005509), sendo observada apenas na resposta a este estresse durante a fase de esporulação.

2.7 – Genes induzidos tanto por choque térmico como no tratamento com cádmio

Observamos 28 genes induzidos tanto pelo tratamento com cádmio como pelo choque térmico em pelo menos duas condições testadas (Tabela 17). Estes genes codificam proteínas de choque térmico, como a Hsp100, a Hsp90, a Hsp70, a Hsp60 e a Hsp10, além de proteínas com propriedades antioxidantes como Glutationa S-transferases, Peroxirredoxinas e Tiorredoxina peroxidase. Outro gene que foi induzido tanto pelo estresse com cádmio quanto pelo choque térmico foi o que codifica uma proteína de resposta universal a estresses (USP) e uma proteína relacionada com a fosfatidilserina descarboxilase. Proteínas USP são induzidas em resposta a uma variedade de estresses, porém não possuem ainda sua função caracterizada (Nystrom & Neidhardt, 1994). Possivelmente, os genes induzidos tanto por choque térmico quanto pelo tratamento com cádmio fazem parte da resposta central de *B. emersonii* a estresses ambientais.

Tabela 15 – Genes induzidos apenas pelo tratamento com cádmio (100 μM e/ou 200 μM) na esporulação e/ou germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Identificação	Processo Biológico/ Função Molecular	E100	E200	G100	G200
BeG120N15B05	Q00266	S-adenosylmethionine synthetase	(b) amino acid metabolism		2	3	3
BeE120N26B11	O60931	Cystinosin	(b) amino acid metabolism			11	10
BeE90D12G12	Q03393	6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	(b) amino acid metabolism	5	3		
BeG120N26D12	Q5KJ92	NAD-specific glutamate dehydrogenase	(b) amino acid metabolism	2			
BeG60N01F09	Q4WZ19	High affinity methionine permease	(b) amino acid transport	2	4		
BeZSPN05A11	Q6CCZ9	B(0,+)-type amino acid transporter	(b) amino acid transport	3	8		
BeG30N13H09	Q3WZJ7	Amino acid permease	(b) amino acid transport		2		2
BeE30N06E01	Q34DS8	Amino acid permease family protein	(b) amino acid transport		2	2	2
BeG30N13H07	Q13685	Angio-associated migratory cell protein	(b) cell motility			3	3
BeG90N07B05	Q5K8Z0	Related to stomatin	(b) dicarboxylic acid transport	5	2		
BeG90N09B05	Q43YH9	Proton-glutamate symporter	(b) dicarboxylic acid transport		2		
BeE90D07E02	Q4ING2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport	18	9	13	16
BeE60H19G07	Q4ING2	Hypothetical protein	(b) electron transport	8	4	6	
BeE60H29C03	Q36TA0	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	(b) metabolism	2			2
BeE60C17C02	P38356	Metal homeostatis protein BSD2	(b) metal ion transport	5	6		
BeE60C08E01	Q6P7N0	ADP/ATP translocase	(b) mitochondrial transport	2	2		
BeE90D13A09	Q962Y8	Ribosomal protein L18	(b) protein biosynthesis	2	2		
BeE90D13D07	Q4X1P0	Hsp60	(b) protein folding	2	2		
BeG30N02D12	Q6FPX9	Metacaspase	(b) proteolysis	15	3		
BeE120N32F08	Q3J9Z6	Peptidase C14, caspase catalytic subunit p20	(b) proteolysis	3	2		
BeE90N04D11	Q3AS68	Metacaspase	(b) proteolysis	3	3		
BeZSPN06B03	Q3AS69	Metacaspase	(b) proteolysis	4	2		
BeE90D17B02	Q2UFR5	Isoflavone reductase family protein CipA	(b) regulation of nitrogen utilization	9	5	7	13
BeE90D18F01	Q754Y9	Glutathione peroxidase 3	(b) response to oxidative stress			2	2
BeE60N04D09	O00625	Pirin-like protein 1	(b) transcription from RNA polymerase II promoter	12	5	8	9
BeG30N16H05	Q4P0C0	Probable eukaryotic translation initiation factor	(b) translational initiation	6	3		
BeE60C03D04	Q7WH61	Putative efflux system transmembrane protein	(b) transport		2	2	3
BeE90D19D08	Q8T665	ABC transporter AbcH.1	(b) transport			2	
BeE120N37F12	Q4R349	Similar to human armadillo repeat containing 4	(m) binding	3	3	3	4
BeE60H08G12	Q75K28	NCS-1/frequenin-related protein	(m) calcium ion binding			2	
BeE30N15D01	Q7SC51	Oxidoreductase	(m) oxidoreductase activity			3	3
BeE90D08A05	Q4ILJ0	Hypothetical protein	(m) polynucleotide adenylyltransferase activity	4	4		
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 6	(m) transferase activity	2	2	2	3
BeE90D18H03	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 5	(m) transferase activity	5	3	2	5

BeE120N20B11	Q92SR2	Putative glutathione S-transferase 4 (m) transferase activity	6	3	2	4
BeE120N35B10		Super cysteine rich protein; SCRP	6	3		
BeE60C31H05		Hypothetical protein	15	9		
BeE60N18H09		Hypothetical protein			2	
BeG30N15A08		Hypothetical protein	4			
BeE90D07H03		Unknown	4	2	4	4
BeE90D09D04		Unknown	3	3	2	4
BeE90D17B09		Unknown	3	3	3	3
BeG90N18G02		Unknown		2		2
BeG30N02B03		Unknown	3		2	2
BeG30N01E08		Unknown			2	2
BeG30N08A04		Unknown			2	3
BeG30N10C07		Unknown			2	2
BeE60C16D03		Unknown	7	8	3	
BeE30N06F05		Unknown	11	5		
BeE60C19A10		Unknown	4	3		
BeE60C23B10		Unknown	6	4		
BeE90D08B11		Unknown	3	3		
BeE90D14D07		Unknown	7	3		
BeG30N01C09		Unknown	6	3		
BeG30N02C03		Unknown	18	6		
BeG30N09G04		Unknown	4	3		
BeG90N17D12		Unknown	5	5		
BeE60H29E10		Unknown	2		2	
BeE120N37E05		Unknown			2	

Notação conforme Tabela 13.

Tabela 16 – Genes induzidos pelo tratamento com 100 μM e 200 μM $CdCl_2$, tanto na esporulação quanto na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo Biológico/ Função Molecular	E100	E200	G100	G200
BeE90D07E02	Q4ING2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport	18	9	13	16
BeE90D17B02	Q2UFR5	Isoflavone reductase family protein CipA	(b) regulation of nitrogen utilization	9	5	7	13
BeE120N37F12	Q4R349	Similar to human armadillo repeat containing 4	(m) binding	3	3	3	4
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	4	2	4	9
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	4	3	4	11
BeE120N20B11	Q92SR2	Putative glutathione S-transferase 4	(m) transferase activity	6	3	2	4
BeE90D18H03	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 5	(m) transferase activity	5	3	2	5
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 6	(m) transferase activity	2	2	2	3
BeE60N04D09	O00625	Pirin-like protein 1		12	5	8	9
BeE60H16G08		Unknown		3	4	2	5
BeE90D07H03		Unknown		4	2	4	4
BeE90D09D04		Unknown		3	3	2	4
BeE90D17B09		Unknown		3	3	3	3

Tabela 17 – Genes induzidos tanto por choque térmico quanto por cádmio.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/ Função molecular
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding
BeZSPN11F12	Q4P232	Hsp60	(b) protein folding
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism
BeE60H29E01	Q75LL0	Putative stress-related protein	(b) response to stress
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase 1	(m) oxidoreductase activity
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxins	(m) oxidoreductase activity
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity
BeE30N20B08		Putative elicitor-responsive gene	
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein	
BeE30N20D06		Unknown	
BeE60C08G05		Unknown	
BeE60H08F12		Unknown	
BeE60H15D02		Unknown	
BeE60H26C07		Unknown	
BeE60N01B04		Unknown	
BeE90D17D01		Unknown	
BeE90N13H07		Unknown	

2.8 – Validação dos dados de microarranjos por RT-PCR quantitativo em tempo real

Para validar os dados obtidos nos microarranjos de DNA, realizamos experimentos de RT-PCR quantitativo para 8 genes selecionados, utilizando duas réplicas biológicas independentes para cada uma das condições de estresse analisadas (Tabela 18). Uma comparação direta entre as duas metodologias foi realizada, verificando o número de casos em que as razões de expressão (log_2) obtidas pelos dois métodos apontaram a indução dos genes. Como é possível observar, em 100% dos casos houve uma coincidência qualitativa entre os dados dos microarranjos de DNA e os dados de RT-PCR em tempo real.

Tabela 18 – Comparação entre a razão de indução dos genes obtida por RT-PCR quantitativo em tempo real e nos experimentos de microarranjos de DNA.

Clone ID	Anotação	Razão RT-PCR (SD)	Razão Microarranjos (SD)	Tratamento
BeE60N04D09	Pirin-like protein	6,01 (0,32)	3,55 (0,29)	S100
BeE60N04D09	Pirin-like protein	4,44 (1,2)	2,41 (0,21)	S200
BeE60N04D09	Pirin-like protein	9,37 (2,98)	3,08 (0,9)	G100
BeE60N04D09	Pirin-like protein	10,32 (0,5)	3,09 (1,27)	G200
BeE60H26A05	Related to phosphatidylserine decarboxylase	6,38 (0,18)	2,58 (0,48)	S100
BeE60H26A05	Related to phosphatidylserine decarboxylase	4,89 (1)	3,37 (0,32)	S200
BeE60H26A05	Related to phosphatidylserine decarboxylase	5,09 (1,19)	1,79 (1,05)	S_HS
BeE60H26A05	Related to phosphatidylserine decarboxylase	3,74 (0,6)	2,09 (0,22)	G_HS
BeE60C17C02	Metal homeostatis protein BSD2	8,34 (0,36)	2,34 (0,51)	S100
BeE60C17C02	Metal homeostatis protein BSD2	5,24 (0,49)	2,48 (0,44)	S200
BeE120N37A02	Glutathione S-transferase 1	4,62 (0,28)	1,87 (0,24)	S100
BeE120N37A02	Glutathione S-transferase 1	1,4 (0,18)	1,08 (0,19)	S200
BeE120N37A02	Glutathione S-transferase 1	6,94 (3,28)	1,85 (0,89)	G100
BeE120N37A02	Glutathione S-transferase 1	5,34 (0,91)	3,11 (1,49)	G200
BeE120N37A02	Glutathione S-transferase 1	2,97 (0,74)	0,65 (0,28)	G_HS
BeE120N26B11	Cystinosin	6,81 (2,96)	3,45 (0,7)	G100
BeE120N26B11	Cystinosin	6,49 (0,67)	3,32 (1,91)	G200
BeE90D07E02	NADH-dependent flavin oxidoreductase	7,2 (0,05)	4,16 (0,51)	S100
BeE90D07E02	NADH-dependent flavin oxidoreductase	4,5 (0,91)	3,1 (0,6)	S200
BeE90D07E02	NADH-dependent flavin oxidoreductase	8,39 (2,98)	3,68 (0,65)	G100
BeE90D07E02	NADH-dependent flavin oxidoreductase	8,1 (0,43)	3,99 (1,47)	G200
BeE60H06D11	Hsp17	6,27 (2,18)	2 (0,17)	S_HS
BeE60H06D11	Hsp17	11,41 (3,78)	2 (0,29)	G_HS
BeE60H30A07	Psi1	3,5 (1,1)	1,23 (0,46)	S_HS
BeE60H30A07	Psi1	4,48 (1,97)	0,95 (0,36)	G_HS

G100 e G200 correspondem ao tratamento com cádmio na germinação com as concentrações de 100 e 200 μM, respectivamente. S100 e S200 correspondem ao tratamento com cádmio na esporulação com as concentrações de 100 e 200 μM, respectivamente. G_HS e S_HS correspondem ao tratamento com choque térmico (38°C) na germinação e esporulação, respectivamente. Entre parênteses estão indicados os valores de desvio padrão obtidos. A razão de expressão dos genes está mostrada como log_2.

3 – Genes da família Hsp70 de *Blastocladiella emersonii*

3.1 – Identificação e análise de seqüências dos membros da família multigênica Hsp70 em *B. emersonii*.

Com o objetivo de identificar membros da família *hsp70* em *B. emersonii,* uma coleção de ESTs do fungo previamente seqüenciadas e depositadas na base de dados de ESTs do NCBI (BeEST) (Ribichich *et al*., 2005), assim como as ESTs seqüenciadas neste trabalho (BeSEST) foram analisadas. Foi construída uma base de dados local (BDH70) a partir de seqüências deduzidas de proteínas Hsp70 de vários organismos disponíveis no banco de dados do NCBI e a base BDH70 foi comparada com o conjunto de ESTs de *B. emersonii*. As ESTs correspondentes ao mesmo gene *hsp70* foram agrupadas e sua seqüência consenso foi usada nas análises posteriores.

Foram obtidos dez diferentes *unigenes* codificando proteínas Hsp70 putativas, incluindo o correspondente ao gene *hsp70-1,* o único que havia sido anteriormente descrito em *B. emersonii* (Stefani & Gomes, 1995). Quatro *unigenes* apresentaram a região codificadora completa (*hsp70-1*, 2125 pb; *hsp70-3*, 2089 pb; *hsp70-6*, 1944 pb; e *hsp70-9*, 2112 pb), um não possuía a região correspondente a cerca de 100 aminoácidos da região C-terminal da proteína (*hsp70-7*, 1749 pb) e os outros cinco codificavam apenas uma parte da proteína, correspondendo ou à região N-terminal ou à C-terminal da proteína Hsp70 putativa (*hsp70-2*, 776 pb; *hsp70-4*, 716 pb; *hsp70-5*, 949 pb; *hsp70-8*, 479 pb; e *hsp70-10*, 1231 pb). O gene *hsp70-1* apresentou o maior número de ESTs seqüenciadas (51 ESTs), seguido pelo gene *hsp70-3* (28 ESTs), e os genes *hsp70-7* e *hsp70-9* (15 ESTs). Os genes *hsp70-2*, *hsp70-4*, *hsp70-5*, *hsp70-6*, *hsp70-8* e *hsp70-10* tiveram menos que 10 ESTs seqüenciadas (Figura 16; Tabela 19).

As seqüências de aminoácidos deduzidas correspondentes aos genes *hsp70* completos, foram comparadas entre si usando o programa Align disponível no sítio INTERPRO (http://www.ebi.ac.uk/emboss/align) (Tabela 20). A proteína putativa Hsp70-6 apresentou a menor porcentagem de identidade (aproximadamente 20%) em todas as comparações, enquanto as outras proteínas Hsp70 analisadas apresentaram uma maior porcentagem de identidade (39,1% a 59,4%). Apesar da baixa porcentagem de identidade da proteína Hsp70-6 em relação às outras proteínas Hsp70 de *B. emersonii*, observamos para essa proteína homologia com o domínio conservado de ATPase e de ligação ao substrato presentes na família Hsp70, usando o programa Pfam.

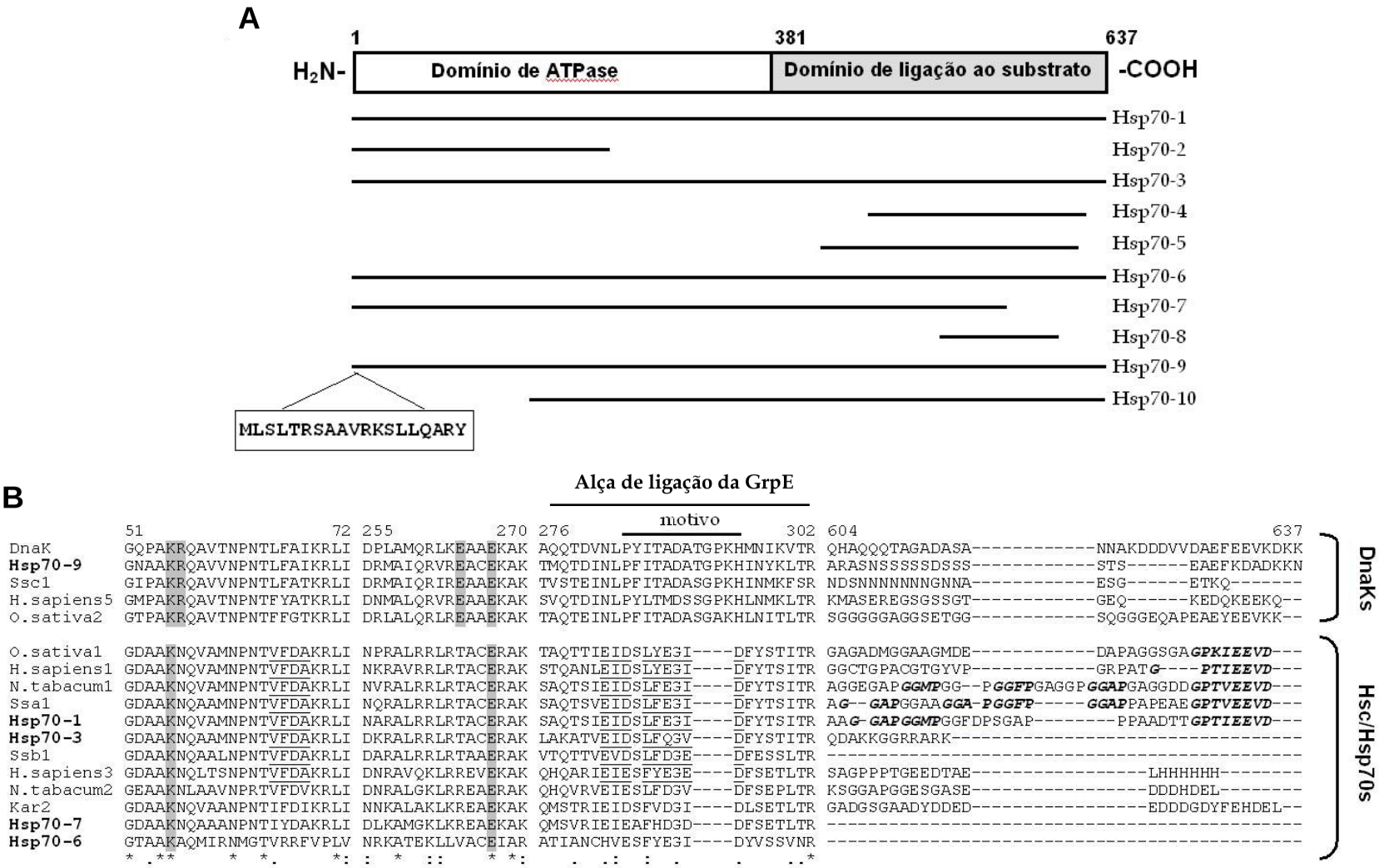


Figura 16 – A - Esquema da estrutura da proteína DnaK de *Escherichia coli* (modificada de Hartl & Hayer-Hartl, 2002) mostrando a posição relativa das dez proteínas putativas da família Hsp70 de *B. emersonii*. A seqüência de aminoácidos mostrada no retângulo corresponde ao possível peptídeo sinal de endereçamento para a mitocôndria da proteína Hsp70-9. **B** – Alinhamento múltiplo das seqüências das proteínas Hsp70-1 (gi| **1346315**), Hsp70-3, Hsp70-6, Hsp70-7 e Hsp70-9 de *B. emersonii* com seqüências de proteínas da família Hsp70 de *E. coli* (gi| **21321902**), *S. cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Oryza sativa* e *Nicotiana tabacum*. Os aminoácidos destacados em cinza estão envolvidos nas pontes salinas e os sublinhados indicam as assinaturas observadas em proteínas Hsp70 citoplasmáticas de eucariotos. Os aminoácidos em itálico e em negrito correspondem as repetições GGMP e ao consenso GP(T/K)(V/I)EE(V/M)D. O motivo de ligação de GrpE, assim como as regiões que o flanqueam são também mostrados. O alinhamento apresenta apenas algumas regiões selecionadas da seqüência das proteínas Hsp70. Os números de acesso no GenBank das proteínas usadas no alinhamento são mostrados na figura 17.

Tabela 19 – Tamanho das seqüências dos cDNAs resultantes dos agrupamentos para os membros da família Hsp70 de *B. emersonii*, número de ESTs seqüenciados para cada gene e número de acesso dos respectivos cDNAs na base de dados do GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

cDNA	Tamanho cDNA (pb)	ESTs (total)	ESTs por biblioteca* NOR	HSR	CDM	CDC	Número de acesso no GenBank
Hsp70-1	2125	51	22	16	5	7	P48720
Hsp70-2	776	9	7	2	-	-	DQ454108
Hsp70-3	2089	28	25	-	1	2	DQ454107
Hsp70-4	716	2	2	-	-	-	DQ454109
Hsp70-5	949	7	3	4	-	-	DQ454110
Hsp70-6	1944	3	3	-	-	-	DQ454111
Hsp70-7	1749	25	6	10	2	7	DQ454112
Hsp70-8	479	6	2	3	1	-	DQ454113
Hsp70-9	2112	15	7	5	-	3	DQ454114
Hsp70-10	1231	6	6	-	-	-	DQ454115

*NOR se refere às bibliotecas de cDNA obtidas durante o ciclo de vida de *B. emersonii* (Ribichich *et al.*, 2005); HSR é a biblioteca de choque térmico; CDM é a biblioteca de $CdCl_2$ 50 μM; CDC é a biblioteca de $CdCl_2$ 100 μM.

Tabela 20 – Porcentagem de identidade entre as proteínas Hsp70 de *B. emersonii* com seqüência de aminoácidos deduzida completa. O alinhamento das seqüências foi realizado utilizando-se o programa Align, disponível no sítio INTERPRO.

Hsp70-1	**Hsp70-3**	**Hsp70-6**	**Hsp70-7**	**Hsp70-9**	
100	59.4	21.4	46.9	46.2	**Hsp70-1**
	100	21.1	45.1	41.7	**Hsp70-3**
		100	25.5	20.5	**Hsp70-6**
			100	39.1	**Hsp70-7**
				100	**Hsp70-9**

Para verificar se a diversidade das Hsp70 putativas de *B. emersonii* estava presente também em outros fungos, realizamos uma busca por proteínas Hsp70 putativas em vários fungos cujo genoma está completamente seqüenciado usando como modelo o ascomiceto *S. cerevisiae*. Este fungo possui 14 proteínas Hsp70 diferentes que pertencem a subfamílias distintas. Proteínas Hsp70 que pertencem à mesma subfamília são codificadas por genes que possuem alta similaridade de seqüências, como descrito para a subfamília Ssa de *S. cerevisiae*, cujos membros possuem de 80% a 97% dos nucleotídeos idênticos (Craig *et al*., 1993).

Usando esta metodologia identificamos 7 proteínas Hsp70 putativas em *Aspergillus nidulans*, 8 em *B. emersonii*, *Neurospora crassa* e *Ustilago maydis*, e 9 em *Magnaporthe grisea* e *S. pombe* (Tabela 21). Considerando que esta abordagem não foi capaz de revelar todas as proteínas Hsp70 putativas de *B. emersonii* observadas através do seqüenciamento de ESTs, os resultados obtidos podem não corresponder ao exato número de genes *hsp70* presentes nos outros fungos analisados. Então, podemos apenas inferir que os fungos analisados possuem pelo menos este número de representantes da família Hsp70.

A maioria das seqüências de fungos analisadas, incluindo as de *B. emersonii*, apresentam alta similaridade com pelo menos um membro das principais categorias das proteínas Hsp70 de *S. cerevisiae* (subfamílias Ssa, Ssb, Ssc e Sse assim como a proteína Kar2). No entanto, a nossa busca não identificou nenhum ortólogo da proteína Kar2 em *U. maydis* nem da subfamília Ssb em *A. nidulans* (Tabela 21).

A família Hsp70 de *B. emersonii* inclui dois representantes putativos da subfamília Ssa (Hsp70-1 e Hsp70-6), dois representantes da subfamília Sse (Hsp70-2 e Hsp70-5), um representante da subfamília Ssc (Hsp70-9), um representante da subfamília Ssb (Hsp70-3) e duas proteínas similares a Kar2 (Hsp70-7 e Hsp70-8). No entanto, é importante ressaltar que a similaridade de seqüência da proteína Hsp70-6 com a subfamília Ssa não é tão alta (46% de similaridade de seqüência) quando comparado com as observadas para as outras seqüências de proteínas Hsp70 completas de *B. emersonii* (Tabela 21).

As proteínas putativas Hsp70-4 e Hsp70-10 não apresentaram similaridade de seqüência com nenhuma proteína de *S. cerevisiae*. O cDNA incompleto da Hsp70-4 codifica um fragmento de 211 aminoácidos, que correspondem à região C-terminal da proteína. Esta região compreende o domínio de ligação ao peptídeo que é o menos conservado entre as diferentes Hsp70. Quando a proteína Hsp70-4 foi comparada contra o banco de dados do NCBI, apresentou similaridade apenas com proteínas Hsp70 de vertebrados.

Tabela 21 – Família Hsp70 de *S. cerevisiae* e seus prováveis ortólogos em outros fungos.

S. cerevisiae	*B. emersonii*	*S. pombe*	*N. crassa*	*U. maydis*	*M. grisea*	*A. nidulans*
Ssa1 (YAL005C)	46 Hsp70-6	90 (SPAC13G7.02c)				
Ssa2 (YLL024C)	83 Hsp70-1	90 (SPCC1739.13)	78 (NCU09602.2)	85 (UM03791.1)	82 (MGG_06958.5)	81 (AN5129.2)
Ssa3 (YBL075C)						
Ssa4 (YER103W)						
Ssb1 (YDL229W)	73 Hsp70-3	79 (SPBC1709.05)		80 (UM04435.1)	90 (MGG_11513.5)	
Ssb2 (YNL209W)			80 (NCU02075.2)	75 (UM04434.1)	86 (MGG_11517.5)	
Ssc1 (YJR045C)	79 Hsp70-9	84 (SPAC664.11)	83 (NCU08693.2)	80 (UM01209.1)	82 (MGG_04191.5)	84 (AN6010.2)
Ssc2 (YLR3669W)		46 (SPAC1F5.06)	55 (NCU09485.2)	50 (UM05188.1)	55 (MGG_04856.5)	53 (AN7721.2)
Ssc3 (YEL030W)						
Sse1 (YPL106C)	63 Hsp70-2*	60 (SPAC110.04c)				
Sse2 (YBR169C)	68 Hsp70-5*		69 (NCU05269.2)	64 (UM05918.1)	69 (MGG_06065.5)	66 (AN1047.2)
Kar2 (YJL034W)	83/67 Hsp70-7*/Hsp70-8*	81 (SPAC22A12.15c)	80 (NCU03982.2)		82 (MGG_02503.5)	80 (AN2062.2)
Lhs1 (YKL073W)		46 (SPAC1F5.06)	50 (NCU09485.2)	51 (UM00904.1)	50 (MGG_06648.5)	49 (AN0847.2)
Ssz1 (YHR064C)		61 (SPAC57A7.12)	63 (NCU00693.2)	46 (UM05357.1)	56 (MGG_02842.5)	64 (AN4616.2)
Sem homólogo	Hsp70-10*		43# (NCU01499.2)		43# (MGG_07156.5)	41# AN2646.2
Sem homólogo	Hsp70-4*					

Os números correspondem à porcentagem de similaridade de seqüência (positivos) obtida através da comparação das seqüências das proteínas da família Hsp70 de S. *cerevisiae* contra as seqüências das proteínas da família Hsp70 de *B. emersonii* e bases de dados de proteínas de fungos, usando o programa BlastP. * Seqüências de proteínas de *B. emersonii* que estão incompletas. # Porcentagem de similaridade obtida através da comparação da proteína Hsp70-10 contra as bases de dados dos fungos mostrados. Entre parênteses são mostrados os números de acesso das proteínas referente a cada base de dados.

Já a proteína Hsp70-10 apresentou similaridade com proteínas Hsp70 de outros fungos que não *S. cerevisiae* (*N. crassa*, *M. grisea* e *A. nidulans* - Tabela 21), mas seus melhores alinhamentos foram observados também com proteínas de vertebrados. A figura 16-B apresenta o alinhamento múltiplo entre as seqüências das proteínas Hsp70-1, Hsp70-3, Hsp70-6, Hsp70-7 e Hsp70-9 de *B. emersonii* e seqüências de proteínas Hsp70 de outros organismos. Tanto a Hsp70-1 quanto a Hsp70-3 exibiram as características estruturais de proteínas Hsp70 citoplasmáticas, i.e., os motivos: VFDA na posição 65, EID na posição 282 e L(V/L/Y/F/I)(D/E)G(I/E/V)D(F/Y) na posição 286 (Figura

16-B) (Gupta & Singh, 1994). O consenso padrão GP(T/K)(V/I)EE(V/M)D na extremidade C-terminal, específico das proteínas Hsp70 citoplasmáticas e a múltipla repetição do tetrapeptídeo degenerado GGMP, que está envolvido na regulação da interação das Hsp70 com suas co-chaperones (Demand *et al*., 1998), foi observado apenas na seqüência da proteína Hsp70-1.

As proteínas Hsp70 foram classificadas por Brehmer e colaboradores (2001) de acordo com diferenças estruturais no domínio de ATPase em três categorias: a) tipo DnaK (que inclui as proteínas Hsp70 de bactérias e Hsp70 eucarióticas de mitocôndria), b) tipo Hsc70 e c) tipo HscA. Usando esta classificação pudemos observar que a proteína Hsp70-9 de *B. emersonii* apresenta as características das proteínas do tipo DnaK, uma vez que possui os quatro aminoácidos responsáveis pelas duas pontes salinas conservadas da proteína DnaK de *E. coli* (Glu 267-Lys 55 e Glu 264-Arg 56); destacados em cinza na figura 16-B, assim como o motivo de ligação de GrpE (T287-G292) e as regiões flanqueadoras (P284-I286, P292-H295). Por outro lado, as proteínas Hsp70-1, Hsp70-3, Hsp70-6 e Hsp70-7 foram classificadas como pertencentes à categoria Hsc70, pois possuem apenas uma das pontes salinas (Glu 267-Lys 55) e não apresentaram o motivo de ligação a GrpE (Figura 16-B). Nenhum representante do tipo HscA foi observado entre as proteínas Hsp70 de *B. emersonii.*

Para confirmar a localização celular predita das proteínas putativas Hsp70-1, Hsp70-3, Hsp70-6, Hsp70-7 e Hsp70-9, uma análise filogenética foi realizada utilizando proteínas Hsp70 de citoplasma, retículo endoplasmático e mitocôndria de fungos, animais e plantas (Figura 17).

Como esperado, as proteínas Hsp70-1 e Hsp70-3 se localizaram no grupo de proteínas citoplasmáticas, Hsp70-7 no grupo de proteínas de retículo endoplasmático e Hsp70-9 com o grupo de proteínas mitocôndriais. Além disso, usamos o programa targetP (Emanuelsson *et al*., 2000 – http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP), que prediz a localização celular de proteínas, e identificamos um precursor putativo de um sinal de endereçamento para a mitocôndria nos 19 primeiros aminoácidos da proteína Hsp70-9 (Figura 16-A). A proteína Hsp70-6 não se localizou em nenhum grupo, pois apresentou a mais diferente composição de aminoácidos. No entanto, esta proteína pertence provavelmente ao grupo de proteínas citoplasmáticas, uma vez que apresentou similaridade com a subfamília de proteínas citoplasmáticas Ssa de *S. cerevisiae*, como mencionado acima.

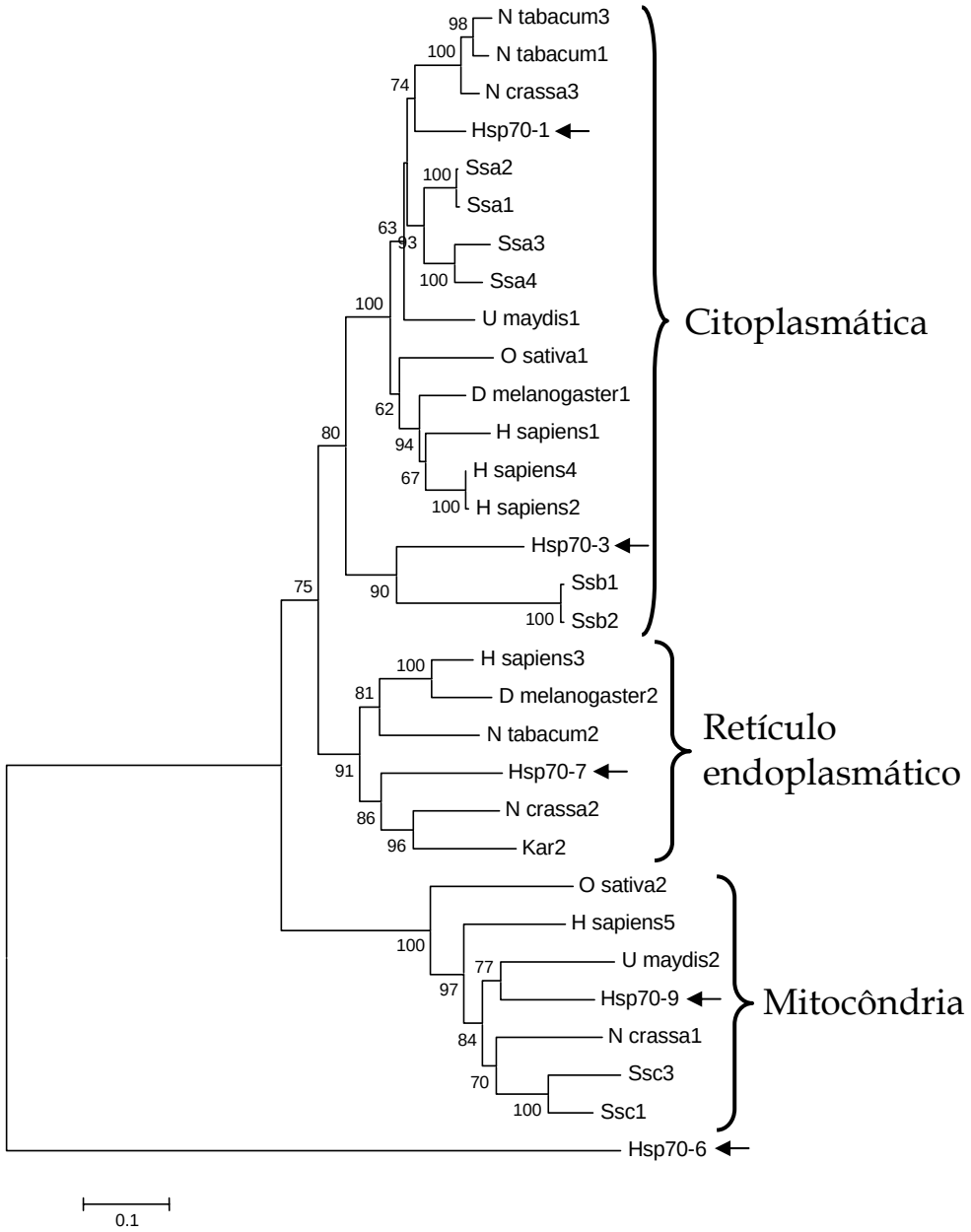


Figura 17 – Análise filogenética de membros da família Hsp70 presentes no citoplasma, mitocôndria e retículo endoplasmático. As setas indicam a posição das proteínas Hsp70 de *B. emersonii*. Os três grupos de localização celular são apresentados. A Hsp70-6 de *B. emersonii* ramificou-se sozinha como um grupo externo. Os números nos nós representam a porcentagem dos valores de *bootstrap* (1000 repetições). A barra de escala representa uma distância filogenética de 0,1 substituição de aminoácidos por local. Os números de acesso no GenBank para as proteínas citadas são: Ssa1 (gi| 349747), Ssa2 (gi| 1360202), Ssa3 (gi| 536120), Ssa4 (gi| 6320950), Ssb1 (gi| 1431385), Ssb2 (gi| 1302215), Ssc1 (gi| 1015701), Ssc3 (gi| 6320805) e Kar2 (gi| 1008157) de *S. cerevisiae*; *N. crassa*1 (gi| 28923321), *N. crassa*2 (gi| 85080590), *N. crassa*3 (gi| 28881112), *U. maydis*1 (gi| 71019415), *U. maydis*2 (gi| 71005380), *H. sapiens*1 (gi| 55961919), *H. sapiens*2 (gi| 62897129), *H. sapiens*3 (gi| 6470150), *H. sapiens*4 (gi| 5729877), *H. sapiens*5 (gi| 21040386), *D. melanogaster*1 (gi| 77403899), *D. melanogaster*2 (gi| 22832111), *O. sativa*1 (gi| 34908140), *O. sativa*2 (gi| 50913271), *N. tabacum*1 (gi| 38325811), *N. tabacum*2 (gi| 19811) e *N. tabacum*3 (gi| 38325813).

Para verificar se os diferentes cDNAs observados através do seqüenciamento de ESTs e das análises bioinformáticas realmente correspondiam a genes *hsp70* distintos, realizamos experimentos de *Southern blot* usando DNA total de *B. emersonii* digerido com várias enzimas de restrição e utilizando como sonda os cDNAs correspondentes a cada gene *hsp70*. Os padrões de hibridização observados diferiram significantemente entre os diferentes genes *hsp70* putativos, indicando que *B. emersonii* possui pelo menos dez representantes distintos da família Hsp70 (Figura 18).

3.2 – Padrão de expressão dos genes *hsp70* de *B. emersonii* durante o desenvolvimento e o choque térmico

Realizamos ensaios de *Northern blot* para investigar se a expressão dos genes *hsp70* de *B. emersonii* é regulada durante o desenvolvimento e se os genes são induzidos pelo tratamento com choque térmico a 38°C durante o ciclo de vida do fungo. Dois experimentos biológicos independentes foram realizados para cada gene *hsp70* e o mesmo padrão de variação nos níveis dos mRNAs foram observados em ambos experimentos em todas as condições testadas. A figura 19 apresenta um experimento representativo para cada gene.

De um modo geral, entre os dez genes *hsp70* de *B. emersonii*, oito apresentaram níveis de mRNA detectáveis tanto durante a germinação quanto durante a esporulação na temperatura fisiológica de 27°C (Figura 19). O transcrito correspondente ao gene *hsp70-4*, no entanto, não foi detectado em nenhuma das condições testadas. Além disso, o transcrito do gene *hsp70-10* foi observado apenas em células de germinação submetidas a choque térmico, e os genes *hsp70-5* e *hsp70-6* apresentaram níveis de mRNA praticamente indetectáveis durante a esporulação. Durante o choque térmico, o transcrito do gene *hsp70-3* não foi significantemente induzido nem em células de germinação nem em células de esporulação. O mRNA do gene *hsp70-6* não foi detectado após o tratamento com choque térmico durante a esporulação e seus níveis até diminuem durante este estresse na germinação. O transcrito do gene *hsp70-10* apresentou uma indução transitória pelo aumento da temperatura após 30 minutos da indução da germinação. Todos os outros genes foram induzidos por choque térmico em diferentes níveis tanto durante a germinação quanto durante a esporulação, sendo os níveis de mRNA mais elevados durante o choque térmico na fase de germinação do que na esporulação (Figura 20).

Quando comparamos os níveis basais de mRNA dos genes *hsp70-1*, *hsp70-2*, *hsp70-3*, *hsp70-7* e *hsp70-9* presentes nas células a temperatura fisiológica, observamos que o gene *hsp70-3* apresenta níveis bem elevados nessas condições, sendo cerca de 3 vezes maior do que qualquer outro gene

aos 0 e 30 minutos após a indução da esporulação e cerca de 2 vezes maior durante a germinação (Figura 21). Nesse experimento foi utilizada a mesma quantidade de sonda marcada para cada gene e as membranas foram expostas pelo mesmo período de tempo para que os autoradiogramas pudessem ser comparados entre si.

Curiosamente, os padrões de expressão observados para os genes *hsp70-7* e *hsp70-8*, que codificam proteínas homólogas a Kar2 de *S. cerevisiae* (Hsp70 localizada no retículo endoplasmático) são bastante similares. Como mostra a figura 19, ambos os genes apresentaram níveis de mRNA mais elevados 120 minutos após a indução da germinação em condições fisiológicas e apresentaram altos níveis de indução quando as células de *B. emersonii* foram submetidas a choque térmico durante este estágio do desenvolvimento (G 30-60HS). Os dois genes apresentaram também indução nos níveis de mRNA durante a esporulação após o choque térmico (S 0-30HS) (Figura 20).

Embora as proteínas putativas codificadas pelos genes *hsp70-2* e *hsp70-5* apresentem alta similaridade com membros da subfamília Sse, os padrões de expressão observados para estes genes durante o choque térmico são diferentes. Enquanto o gene *hsp70-2* apresenta uma indução nos níveis de mRNA durante o choque térmico que permanecem elevados por pelo menos 90 minutos, a indução do gene *hsp70-5* durante o estresse de temperatura é transitória, diminuindo após 30 minutos de tratamento (Figura 20).

O gene *hsp70-9* codifica uma proteína Hsp70 de provável localização mitocondrial, seu transcrito estando presente tanto durante a germinação quanto durante a esporulação em condições fisiológicas normais. Além disso, os níveis de mRNA desse gene são induzidos mais do que 6 vezes em células submetidas a choque térmico na germinação e cerca de 3 vezes durante esse estresse na esporulação (S 0-30HS).

O padrão de expressão do gene *hsp70-1* já havia sido previamente descrito, porém, apenas durante a esporulação (Stefani & Gomes, 1995). Neste trabalho analisamos o seu padrão de expressão tanto durante a germinação quanto durante a esporulação e os níveis mais elevados do mRNA do gene *hsp70-1* foram também obtidos quando as células de *B. emersonii* foram submetidas a choque térmico durante a germinação (Figura 20).

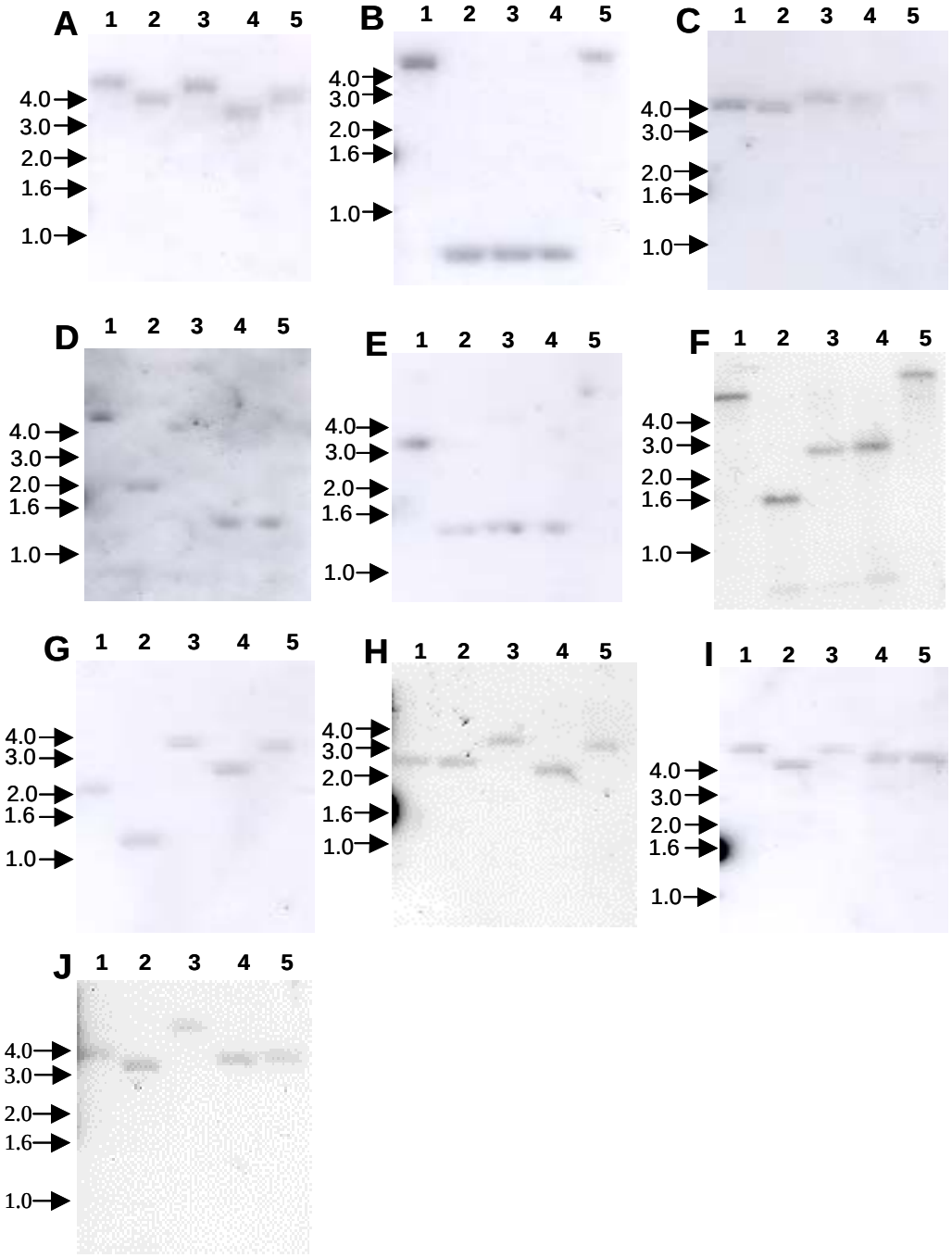
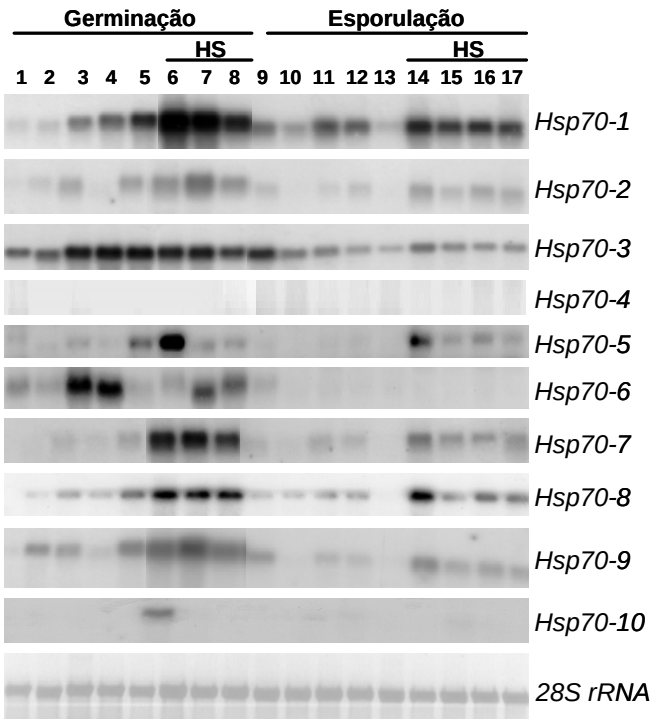


Figura 18 – Análise por *Southern blot* dos genes *hsp70* de *B. emersonii*. O DNA total de *B. emersonii* foi digerido com as enzimas de restrição *Not* I (canaleta 1), *Pst* I/*Not* I (canaleta 2), *Pst* I (canaleta 3), *Bam* HI/*Pst* I (canaleta 4) e *Bam* HI (canaleta 5). As setas correspondem ao tamanho molecular em kb. A, B, C, D, E, F, G, H, I e J correspondem ao *Southern blot* usando como sonda os cDNAs *hsp70-1, hsp70-2, hsp70-3, hsp70-4, hsp70-5, hsp70-6, hsp70-7, hsp70-8, hsp70-9* e *hsp70-10*, respectivamente.

A


Germinação
Esporulação
HS
HS
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17
Hsp70-1
Hsp70-2
Hsp70-3
Hsp70-4
Hsp70-5
Hsp70-6
Hsp70-7
Hsp70-8
Hsp70-9
Hsp70-10
28S rRNA

B

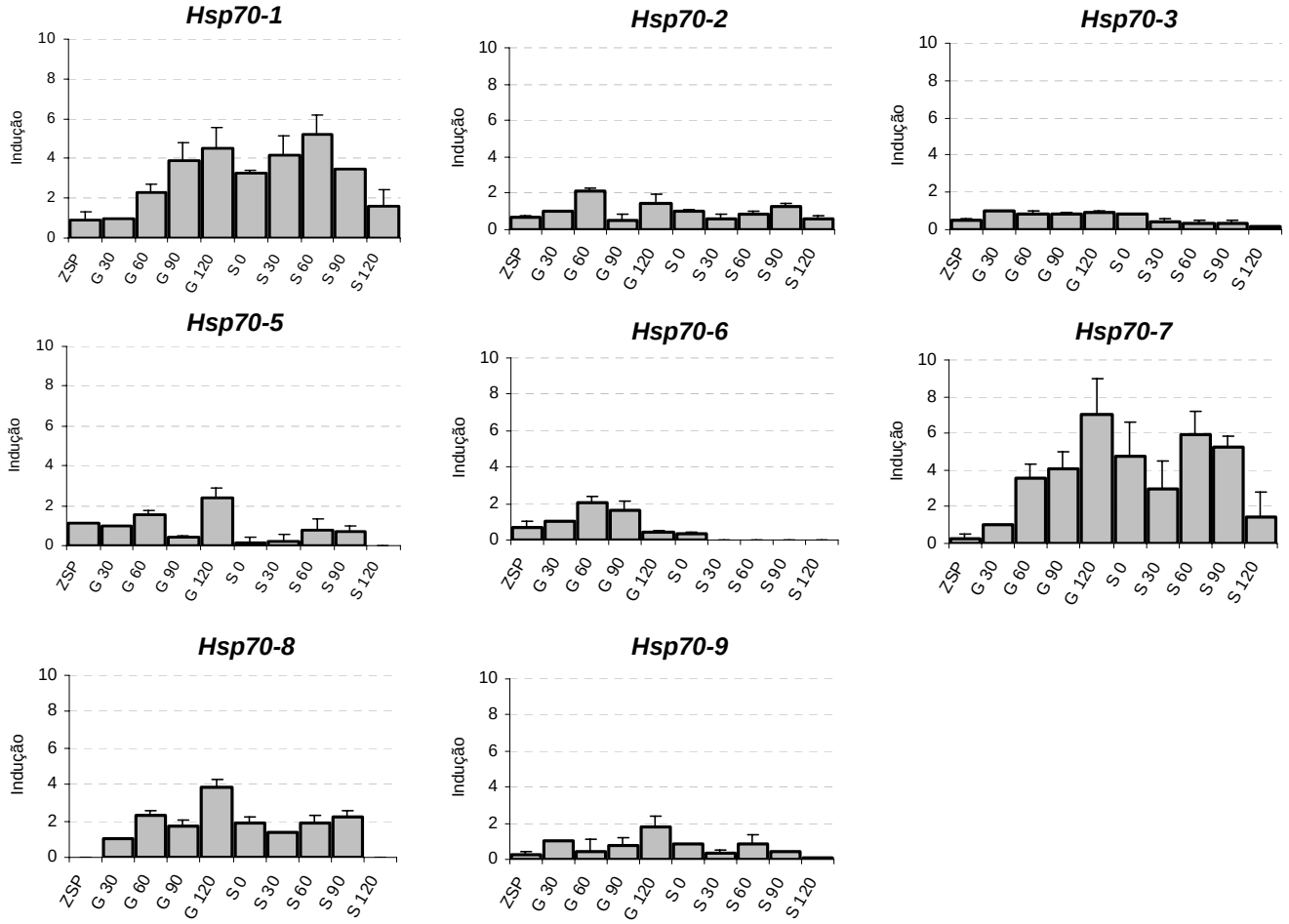

Hsp70-1
Hsp70-2
Hsp70-3
Hsp70-5
Hsp70-6
Hsp70-7
Hsp70-8
Hsp70-9
Indução
0 2 4 6 8 10
ZSP G 30 G 60 G 90 G 120 S 0 S 30 S 60 S 90 S 120

Figura 19 – Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70* de *B. emersonii* durante a germinação e a esporulação em temperatura fisiológica e após o choque térmico (HS). A – Autoradiogramas dos experimentos de *Northern blot* dos genes da família *hsp70* de *B. emersonii*. Canaletas 1-5, RNA de zoósporos (ZSP) e de células aos 30 (G 30), 60 (G 60), 90 (G 90) e 120 min (G 120) após a indução da germinação, respectivamente; canaletas 6-8, RNA de células de 30 min de germinação expostas a choque térmico (38°C) por 30 (G 30-60HS), 60 (G 30-90HS) e 90 min (G 30-120HS), respectivamente; canaletas 9-13, RNA de células aos 0 (S 0), 30 (S 30), 60 (S 60), 90 (S 90) e 120 min (S 120) após a indução da esporulação, respectivamente; canaletas 14-17, RNA de células de 0 min de esporulação expostas a choque térmico (38ºC) por 30 (S 0-30HS), 60 (S 0-60HS), 90 (S 0-90HS) e 120 min (S 0-120HS), respectivamente. Cada autoradiograma corresponde à sonda de cDNA do gene *hsp70* mostrado a direita. O rRNA 28S foi utilizado como controle. B - Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70* de *B. emersonii* durante a germinação e esporulação em temperatura fisiológica determinados pela densitometria dos autoradiogramas apresentados em A. Os dados estão expressos como indução (em vezes) em relação ao tempo de 30 min após a indução da germinação (G 30) de cada autoradiograma (média±SD de dois experimentos biológicos). *$P<0.05$.

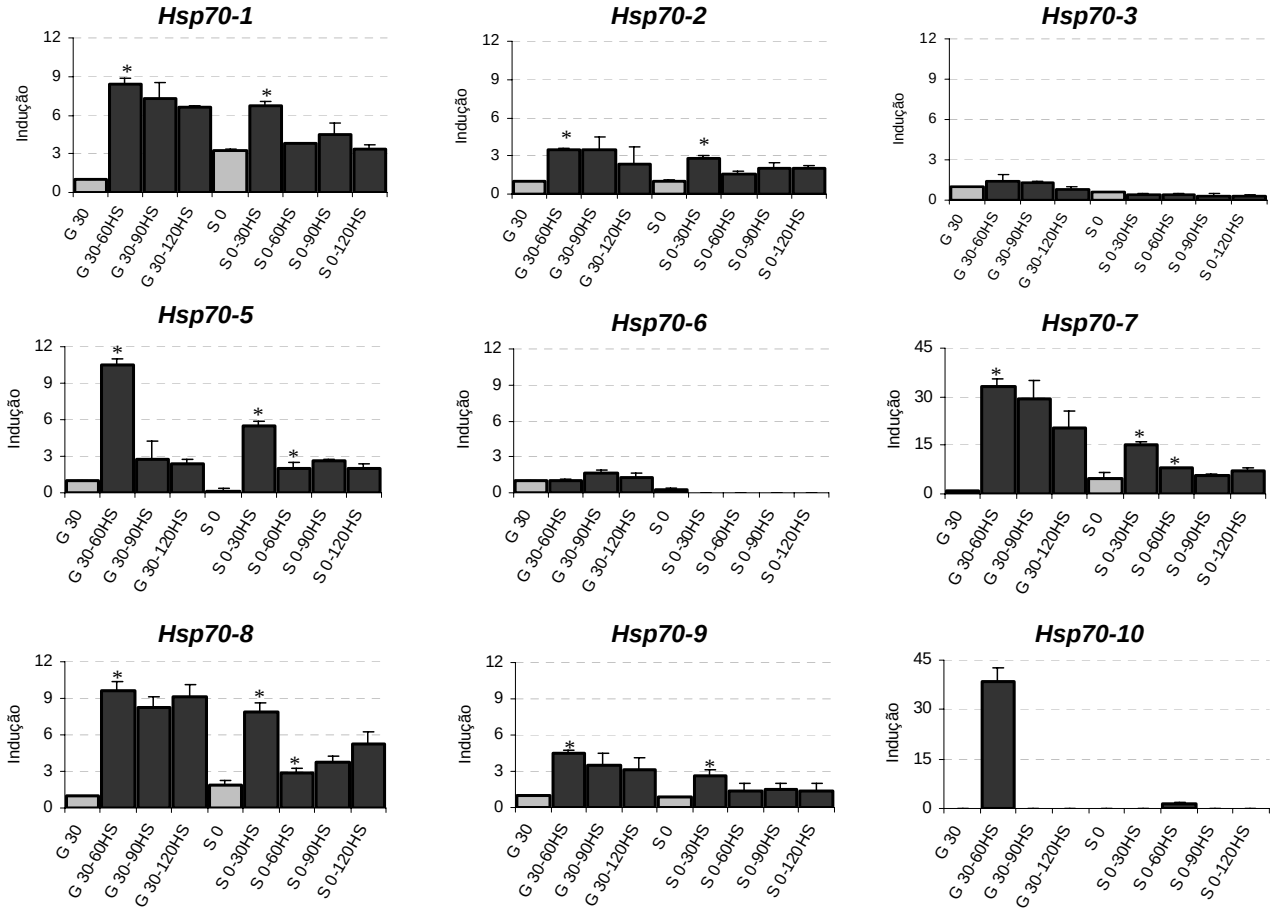


Figura 20 – Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70* de *B. emersonii* no choque térmico (HS) durante a germinação e a esporulação. Os gráficos correspondem à densitometria dos autoradiogramas apresentados na figura 19-A. Os dados estão expressos como indução (em vezes) em relação ao tempo de 30 minutos após a indução da germinação (G 30) de cada autoradiograma (média±SD de dois experimentos biológicos). A descrição da abscissa está mostrada na figura 19. *P<0,05.

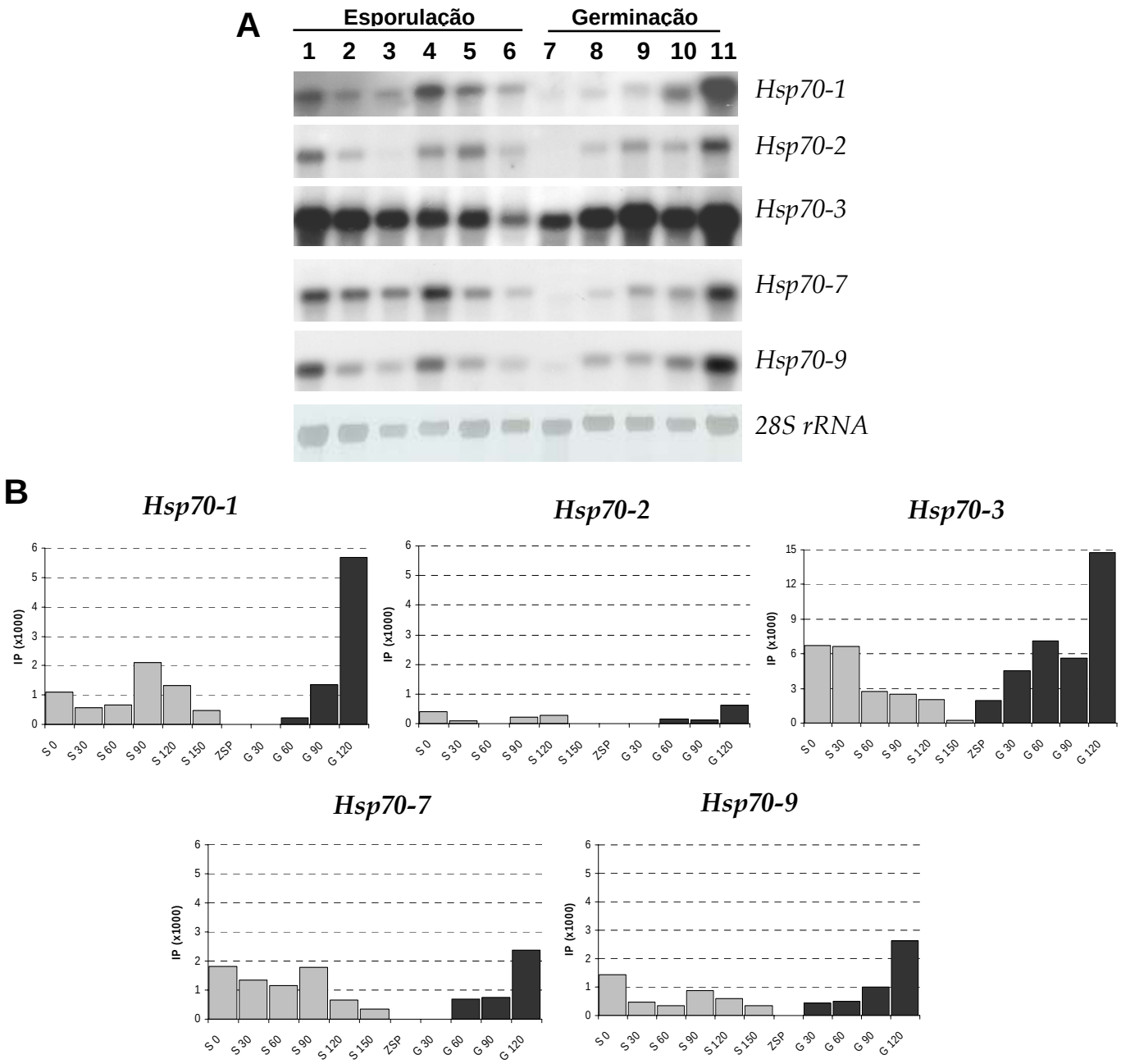


Figura 21 – Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70-1, hsp70-2, hsp70-3, hsp70-7* e *hsp70-9* de *B. emersonii* durante a germinação e esporulação em temperatura fisiológica. A – Autoradiogramas dos experimentos de *Northern blot* dos genes da família *hsp70* de *B. emersonii*. Canaletas 1-6, RNA de células aos 0 (S 0), 30 (S 30), 60 (S 60), 90 (S 90), 120 (S 120) e 150 (S 150) min após a indução da esporulação, respectivamente; canaletas 7-11, RNA de zoósporos (ZSP) e de células aos 30 (G 30), 60 (G 60), 90 (G 90) e 120 min (G 120) após a indução da germinação, respectivamente. Cada autoradiograma corresponde à sonda de cDNA do gene *hsp70* mostrado à direita. O rRNA 28S foi utilizado como controle. B - Níveis relativos dos transcritos dos genes *hsp70* de *B. emersonii* determinados por densitometria dos autoradiogramas apresentados em A. Os dados estão expressos como a intensidade de pixels (IP) obtida para cada ponto analisado.

4 – Caracterização da Hsp17 de *B. emersonii*

4.1 – Identificação e análise da seqüência do cDNA da Hsp17

Dentre os genes observados no programa de seqüenciamento de ESTs de bibliotecas de cDNA expostas a estresses, o gene *hsp17* foi o que apresentou o maior número de ESTs. Foram seqüenciadas no total 167 ESTs, que correspondem a 2,63% de todas as ESTs seqüenciadas a partir das bibliotecas HSR, CDM e CDC (Tabela 6). É interessante observar que a grande maioria destas ESTs foi obtida durante o seqüenciamento da biblioteca HSR (162 ESTs), indicando que a proteína codificada pelo gene *hsp17* é importante na resposta ao estresse térmico em *B. emersonii*. Portanto, resolvemos estudar o padrão de expressão desse gene e a proteína correspondente com o intuito de melhor caracterizar o papel desta proteína no choque térmico em *B. emersonii.*

O cDNA correspondente à proteína Hsp17 apresentou 686 pb, sendo que destes, 45 fazem parte da região 5' não codificadora (5' UTR) e 131 compreendem a região 3' não codificadora (3' UTR) acrescida de cauda de poli A^+ (Figura 22). A proteína Hsp17 putativa de *B. emersonii* possui 169 aminoácidos tendo, portanto, uma massa molecular calculada de aproximadamente 18 kDa. O calculo do ponto isoelétrico (pI) da proteína com o programa Isoeletric do pacote GCG apresentou um pI teórico de 7,3. Para verificar se o gene *hsp17* estava presente em cópia única no genoma de *B. emersonii*, foi realizado um ensaio de *Southern blot* utilizando o DNA genômico do fungo. Como é possível observar na figura 23, o gene *hsp17* apresentou, com a maioria das enzimas de restrição usadas, apenas uma banda no *Southern blot*, indicando que *B. emersonii* possui apenas uma cópia desse gene.

A proteína Hsp17 faz parte das *small* Hsps (sHsps), uma família constituída por Hsps de pequeno peso molecular que possuem um domínio de α-cristalino comum entre elas. Normalmente a região do domínio α-cristalino compreende 100 aminoácidos da porção C-terminal, e é a única parte da proteína que apresenta conservação entre as sHsps, sendo a região N-terminal variável tanto em tamanho quanto em composição de aminoácidos (Haslbeck, 2002) (Figura 24). É interessante notar que os 100 melhores alinhamentos obtidos quando a proteína Hsp17 de *B. emersonii* foi comparada com o banco de dados de proteínas do NCBI foi com sHsps de plantas. Além disso, a análise filogenética desta proteína demonstrou que a Hsp17 de *B. emersonii* se agrupa mais próxima as sHsps de plantas do que de fungos (Figura 25).

Foi possível observar entre todas as ESTs seqüenciadas de *B. emersonii*, três genes codificando proteínas da família sHsp, sendo eles *hsp17*, *hsp16* e *hsp30* (Tabela 6). Porém, nem o gene *hsp16* (8 ESTs) nem o gene *hsp30* (20 ESTs) tiveram um número tão acentuado de ESTs seqüenciadas (bibliotecas de cDNA de estresse) como observado para o gene *hsp17*.

```
    TGCTACGCAACCAACACCACGCAACCAAACCAACCACTACCACCATGTCGATGATTCGCC
  1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 60
                                                M  S  M  I  R  P -

    CCACTGGCTACTCGGGCCTCGAGCCGTTCGGCCTCGAGCGCAACTTCCGCAACATGATGG
 61 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 120
      T  G  Y  S  G  L  E  P  F  G  L  E  R  N  F  R  N  M  M  G -

    GCCAGCTCATGCAGGACTTTTTCGAGCCGGGCACGCGCGGCGGCATGGGGATGGGCTCCT
121 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 180
      Q  L  M  Q  D  F  F  E  P  G  T  R  G  G  M  G  M  G  S  S -

    CGGCGCTCGACTTCCCGTCGGTGCGCGCGGGCGGCGCGGGCGCGCTGTACGCGCCGCGGC
181 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240
      A  L  D  F  P  S  V  R  A  G  G  A  G  A  L  Y  A  P  R  L -

    TCGACATGCGCGAGACGGACAAGGCGTTCGAGGTGAAGGCAGACCTGCCGGGGATCCCGC
241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 300
      D  M  R  E  T  D  K  A  F  E  V  K  A  D  L  P  G  I  P  R -

    GCGAGAACGTCAAGATCGAGGTGCGCGACGGCAACACGCTGGTGCTGTCGGGCGAGACCA
301 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 360
      E  N  V  K  I  E  V  R  D  G  N  T  L  V  L  S  G  E  T  K -
                                                   |
    AGATGGACGCGGAGCGGCGCGAGGGGACGTGGCACGTGCAGGAGCGGTCCATGGGCAAGT
361 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 420
      M  D  A  E  R  R  E  G  T  W  H  V  Q  E  R  S  M  G  K  F -

    TCATGCGCGCCATCCCGCTGCCGCCCACGGCTAACCTCGAGTCGGTCAAGGCCAAGTTCG
421 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 480
      M  R  A  I  P  L  P  P  T  A  N  L  E  S  V  K  A  K  F  D -

    ACGCGGGCGTCCTGTGCATCGAGATCCCCAAGAAGGAGGAGGCGGCCACGTCGCGCAAGA
481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 540
      A  G  V  L  C  I  E  I  P  K  K  E  E  A  A  T  S  R  K  I -

    TCGAGATCCAGTAGGCGTTTTGTGTGGGTCGGGGCCGTGGTGGGCCCGAAAAGTTGAGGA
541 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 600
      E  I  Q  *

    TGTGGTTGTCTCAAAGTCGTCGTGCATGGTCGTGAAAGTGTGAATGTAAAAGCTCGTTTT
601 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 660


    CTTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
661 ---------+---------+------ 686
```

Figura 22 - Seqüência de nucleotídeos do cDNA correspondente à proteína Hsp17. A seqüência de aminoácidos deduzida está mostrada abaixo da seqüência de nucleotídeos. As bases destacadas em cinza correspondem à metionina iniciadora (ATG) e ao códon de parada da tradução (TAG).

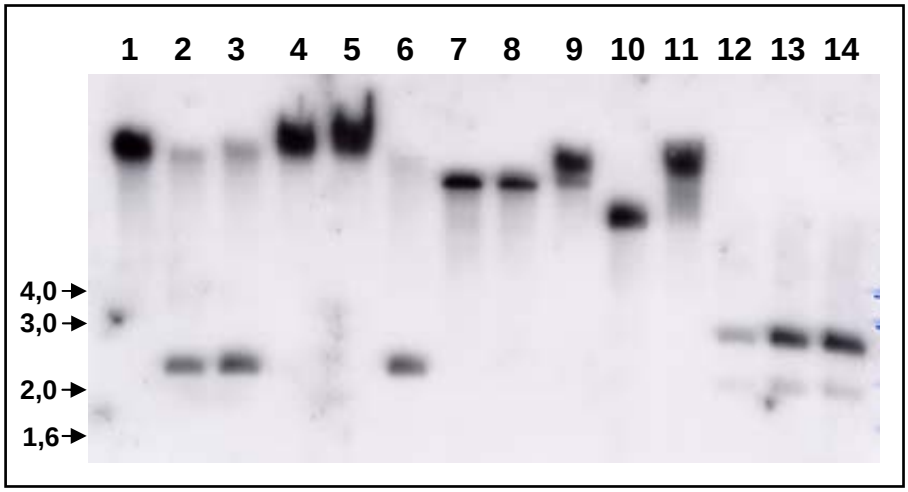


Figura 23 – Análise por *Southern blot* do gene *hsp17* de *B. emersonii*. DNA total de *B. emersonii* foi digerido com as enzimas de restrição *Eco*R I/*Xba* I, *Hind* III/*Xba* I, *Hind* III, *Xba* I, *EcoR* I, *Eco*R I/*Hind* III, *Eco*R I/*Sph* I, *Xba* I/ *Sph* I, *Sph* I, *Eco*R I/*Sac* I, *Sac* I, *Sac* I/*Pst* I, *Pst* I e *Eco*R I/*Pst* I nas canaletas 1-14, respectivamente. As setas correspondem ao tamanho molecular em kb. O ensaio de *Southern blot* foi realizado usando como sonda o cDNA referente ao gene *hsp17*.

4.2 – Análise do perfil de expressão do mRNA correspondente ao gene *hsp17* durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e o choque térmico

Para verificar os níveis de expressão do mRNA da Hsp17 durante o ciclo de vida de *B. emersonii* e durante o choque térmico foi feito *Northern blot* com RNA total de células isoladas de diferentes fases do ciclo de vida de *B. emersonii* cultivadas tanto a temperatura normal de crescimento (27°C) como sob choque térmico (38°C).

O mRNA do gene *hsp17* apresentou-se com baixa expressão durante o ciclo, tanto na fase de esporulação quanto na fase de germinação. No entanto aos 60 e 90 minutos da esporulação percebe-se um leve aumento nos níveis do mRNA que não são encontrados na germinação. Durante o choque térmico ocorre um aumento transiente dos níveis do transcrito do gene *hsp*17, sendo bastante elevados nos primeiros 30 minutos e diminuindo ao longo do tempo, mas permanecendo ainda bastante altos quando comparados com os níveis no mesmo tempo do ciclo a 27ºC (Figura 26). A alta expressão do mRNA concorda com os dados obtidos no seqüenciamento da biblioteca de choque térmico onde a quantidade de cDNAs seqüenciados da Hsp17 foi consideravelmente superior à de outros cDNAs de proteínas de choque térmico.

```
N.tabacum         ----------------------------------------------LGFPG---SNSGE 10
L.esculentum      MSLIP-------RIFGD-RRSSSMFDPFSIDVFDP---------FRELGFPS---TNSGE 40
A.thaliana        MSLIP-------SFFGNNRRSNSIFDPFSLDVWDP---------FKELQFPS---SLSGE 41
C.sativa          MALS---------LFGG-RRSN-VFDPFSLDIWDP---------FEGFSAVANVPPSARE 40
B.emersonii       MSMIRPTGYSGLEPFGLERNFRNMMGQLMQDFFEPGTRGGMGMGSSALDFPS---VRAGG 57
S.pombe           MSLQP--------FFGFPPTVNDLFSDFVS--YSP--------------------RLNNQ 30
```

Domínio α-cristalino

```
TSAFANTRVDWKETPEAHVFKADLPGLKKEEVKVEIEDDRVLQISGERNVEK--EDKNDTWHRVERSSGKFMRRFRLPEN 88
SSAFANTRIDWKETPEAHVFKVDLPGLKKEEVKVEVEEDRVLQISGERNVEK--EDKNDKWHRMERSSGKFMRRFRLPEN 118
TSAITNARVDWKETAEAHVFKADLPGMKKEEVKVEIEDDSVLKISGERHVEK--EEKQDTWHRVERSSGQFSRKFKLPEN 119
TTAFATARIDWKETPEAHIFKADLPGLKKEEVKVEVEDGNVLQISGERSKEH--EEKNDKWHRVERSCGKFLRRFRLPEN 118
AGALYAPRLDMRETDKAFEVKADLPGIPRENVKIEVRDGNTLVLSGETKMDA--ERREGTWHVQERSMGKFMRAIPLPPT 135
IPGELSPSIDVHEGKDTVSVDVELPGVKKEDVQVHYDSG-KLTISGEVVNERKNESTEGNQRWSERRFGSFSRTITIPAK 109
  .   . :* :*  .:  ...:***: :*:*::.  ..  * :***   :   *  :.. :  **  *.* * : :* .
```

Domínio α-cristalino

```
AKMDQVKAAMENGVLTVTVPK--EEVKKPDVKSIDISG 124
AKMDQVKASMENGVLTVTVPK--EEVKKPEVKSIEISG 154
VKMDQVKASMENGVLTVTVPKVEEAKKKAQVKSIDISG 157
AKVEQVKANMENGVLTVIVPK--EEQKKTEVKSIEISG 154
ANLESVKAKFDAGVLCIEIPK---KEEAATSRKIEIQ- 169
IDADRIEANFSNGLLTVTLPK---VEKSQTKKQIAIK- 143
 . : ::* :. *:* : :**     :    :.* *.
```

Figura 24 – Alinhamento múltiplo entre Hsp17 de *B. emersonii* e sHsps de outros organismos. O domínio α-cristalino está destacado. Os números de acesso no GenBank para as proteínas citadas são apresentados na figura 25.

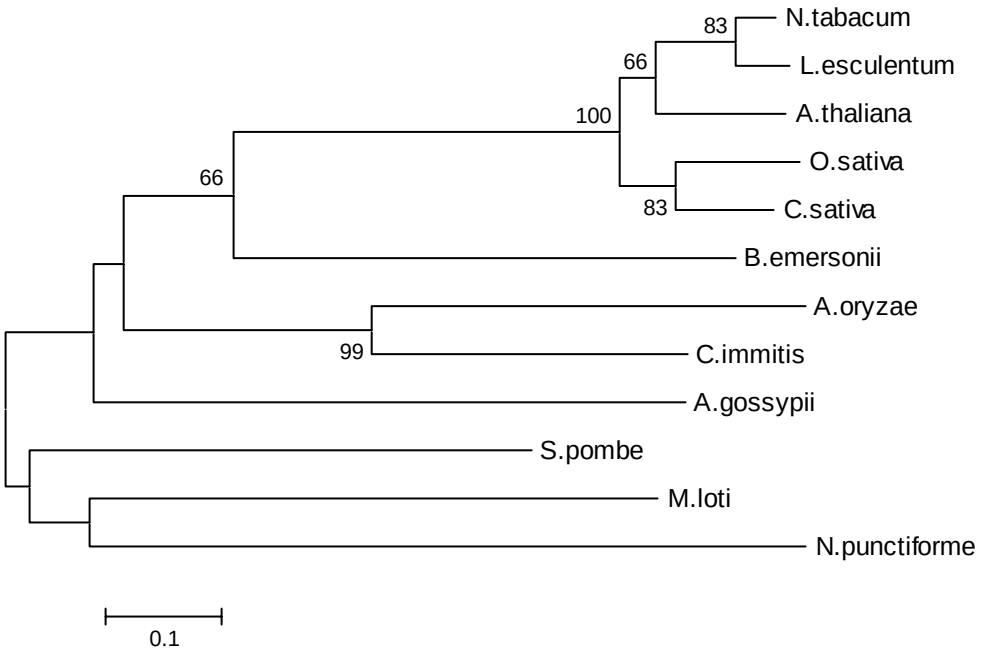


Figura 25 – Análise filogenética da proteína Hsp17 de *B. emersonii* e proteínas sHsp de outros organismos. Os números nos nós representam a porcentagem dos valores de *bootstrap* (1000 repetições). Valores nos nós abaixo de 50 não são mostrados. A barra de escala representa uma distância filogenética de 0,1 substituição de aminoácidos por local. Os números de acesso no GenBank para as proteínas citadas são: *Arabidopsis thaliana* (gi|15222395), *Nicotiana tabacum* (gi|37704443), *Lycopersicum esculentum* (gi|4836469), *Castanea sativa* (gi|46359518) *Oryza sativa* (gi|34902016), *Aspergillus oryzae* (gi|83775765), *Coccidioides immitis* (gi|90306764), *Ashbya gossypii* (gi|44982214), *Schizosaccharomyces pombe* (gi|3298470), *Mesorhizobium loti* (gi|14022823) e *Nostoc punctiforme* (gi|23130701).

4.3 – Níveis relativos da proteína Hsp17 de *B. emersonii* durante o desenvolvimento e o choque térmico

Para analisar os níveis protéicos da Hsp17, seu cDNA foi clonado em vetor de expressão pPROEX e a proteína recombinante expressa em *E. coli*. A proteína Hsp17 recombinante foi purificada e inoculada em coelho, para a produção de anticorpos policlonais. Os anticorpos foram utilizados em ensaios de *Western blot* com proteínas totais extraídas de células de *B. emersonii* durante o desenvolvimento a temperatura fisiológica ou choque térmico a 38°C (Figura 27).

A proteína Hsp17 apresentou o mesmo padrão encontrado na análise do mRNA, com níveis baixos durante a germinação e esporulação de *B. emersonii* em condições fisiológicas. Quando as células foram submetidas a choque térmico, em qualquer um dos estágios de desenvolvimento de *B. emersonii*, a proteína Hsp17 apresentou níveis bem altos, que permaneceram elevados durante todo o período analisado de exposição ao choque térmico. O aumento nos níveis de mRNA da Hsp17 após o tratamento a temperaturas elevadas, refletiram em um aumento na quantidade da proteína Hsp17, indicando que o controle da expressão deste gene é pré-traducional, provavelmente devido a um aumento na transcrição do gene durante o choque térmico.

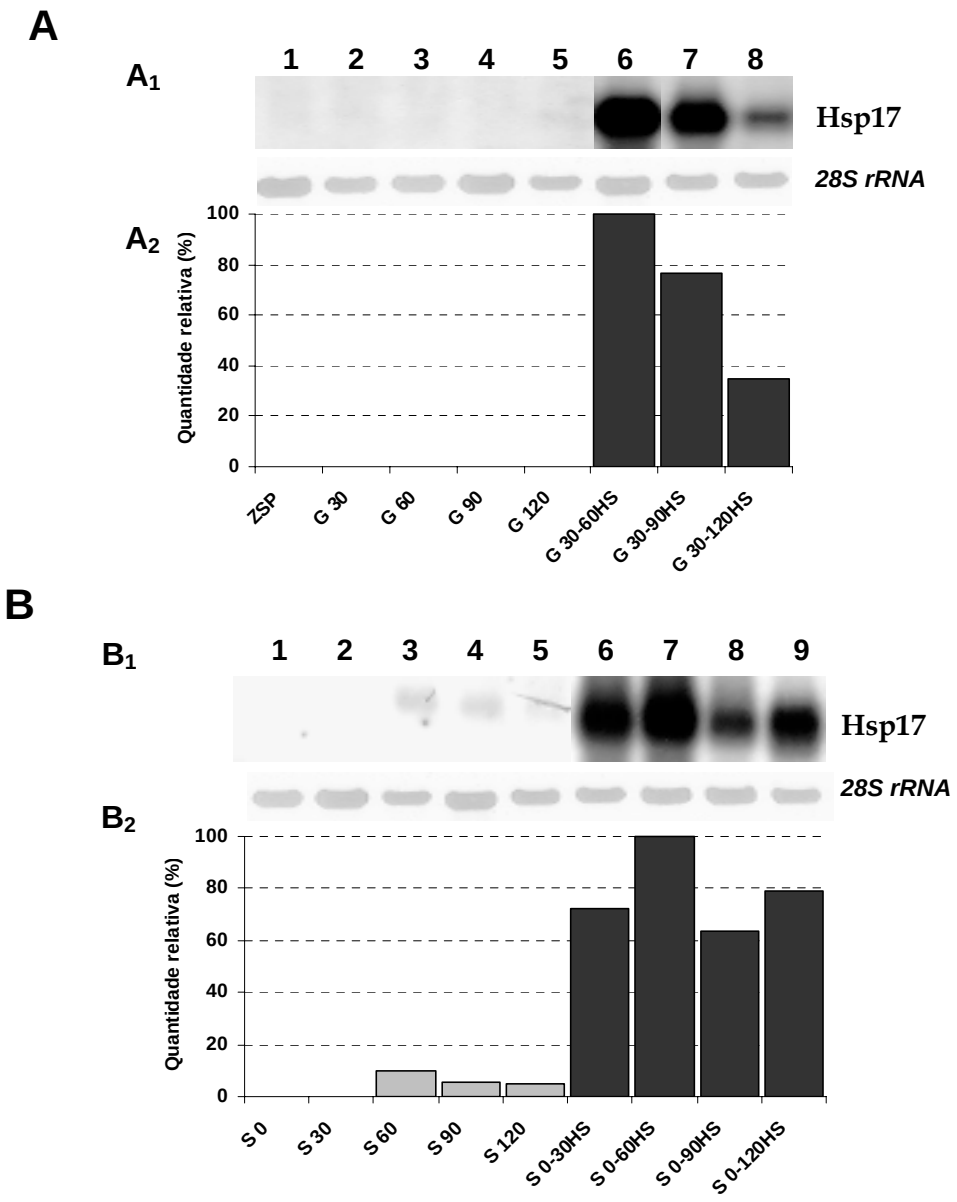


Figura 26 - Análise dos níveis de mRNA do gene *hsp17* durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e durante o choque térmico. Amostras de RNA de células isoladas em diferentes tempos da germinação (A) e esporulação (B) de *B. emersonii* e no choque térmico foram analisadas por *Northern blot*, utilizando o cDNA do gene *hsp17* como sonda. A_1 – Caneletas 1-5, RNA de zoósporos (ZSP) e de células aos 30 (G 30), 60 (G 60), 90 (G 90) e 120 min (G 120) após a indução da germinação, respectivamente; canaletas 6-8, RNA de células de 30 min de germinação submetidas a choque térmico (38°C) por 30 (G 30-60HS), 60 (G 30-90HS) e 90 min (G 30-120HS), respectivamente. B_1 – Canaletas 1-5, RNA de células aos 0 (S 0), 30 (S 30), 60 (S 60), 90 (S 90) e 120 min (S 120) após a indução da esporulação, respectivamente; canaletas 6-9, RNA de células de 0 min de esporulação expostas ao choque térmico (38°C) por 30 (S 0-30HS), 60 (S 0-60HS), 90 (S 0-90HS) e 120 min (S 0-120HS), respectivamente. O rRNA 28S foi utilizado como controle. A_2 e B_2 - Densitometria do autoradiograma mostrado em A_1 e B_1, respectivamente.

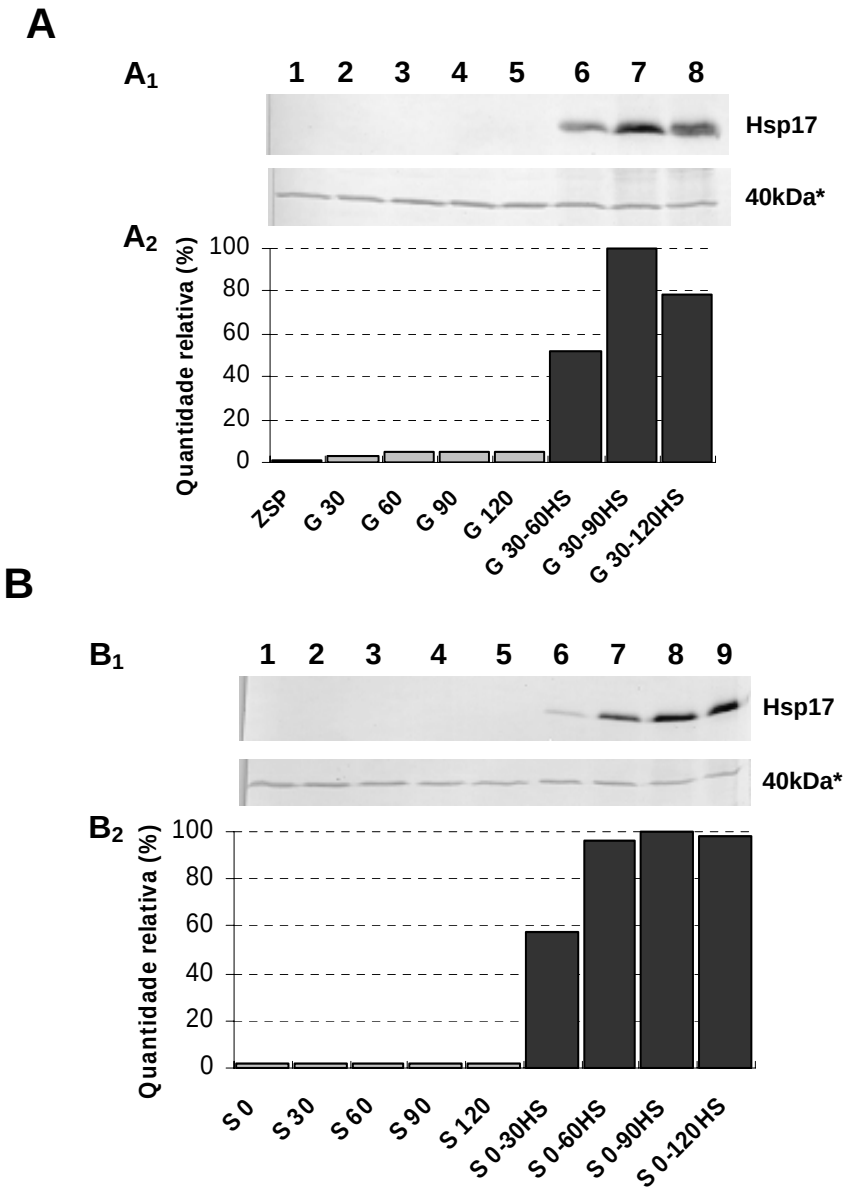


Figura 27 – Análise dos níveis da proteína Hsp17 durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e durante o choque térmico. Amostras de extrato protéico total de células isoladas em diferentes tempos da germinação (A) e esporulação (B) de *B. emersonii* e durante o choque térmico foram analisados por *Western blot*, utilizando anticorpo policlonal anti-Hsp17. A_1 – Caneletas 1-5, extrato protéico total de zoósporos (ZSP) e de células aos 30 (G 30), 60 (G 60), 90 (G 90) e 120 min (G 120) após a indução da germinação, respectivamente; canaletas 6-8, extrato protéico total de células de 30 min de germinação expostas ao choque térmico (38°C) por 30 (G 30-60HS), 60 (G 30-90HS) e 90 min (G 30-120HS), respectivamente. B_1 – Canaletas 1-5, extrato protéico total de células aos 0 (S 0), 30 (S 30), 60 (S 60), 90 (S 90) e 120 min (S 120) após a indução da esporulação, respectivamente; canaletas 6-9, extrato protéico total de células de 0 min de esporulação expostas ao choque térmico (38°C) por 30 (S 0-30HS), 60 (S 0-60HS), 90 (S 0-90HS) e 120 min (S 0-120HS), respectivamente. A_2 e B_2 - Densitometria do *Western blot* mostrado em A_1 e B_1, respectivamente.*Proteína de 40kDa de *B. emersonii* que se apresentou reativa com o soro do coelho pré-imune nos ensaios de *Western blot* e foi usada como controle interno.

5 – Análise de seqüências intrônicas presentes nas ESTs provenientes das bibliotecas de cDNA de estresse

Na análise das bibliotecas de cDNA construídas a partir de RNA obtidos de células submetidas a choque térmico (HSR) e cádmio (CDM e CDC) observamos que algumas ESTs apresentavam possíveis seqüências intrônicas. Estas bibliotecas poderiam apresentar um certo enriquecimento em cDNAs não processados, uma vez que foram obtidos a partir de RNA de células submetidas a diferentes tipos de estresse. Foi observado anteriormente em nosso laboratório que a exposição de células de *B. emersonii* a cádmio ou a temperaturas extremas (42°C) inibia o processamento do mRNA do gene *hsp70-1* (Stefani & Gomes, 1995; Stefani & Gomes, dados não publicados). Com o intuito de determinar quantos cDNAs, dentre os seqüenciados neste trabalho, continham íntrons, uma ampla busca foi feita contra o banco de dados de ESTs de *B. emersonii* (BeEST) (Ribichich *et al*., 2005). Este banco de dados originou-se do seqüenciamento de ESTs obtidas de bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNA extraído de células de *B. emersonii* ao longo de seu crescimento e portanto, teria menos cDNAs com seqüências intrônicas. Para a realização da busca dos íntrons, todos os *unigenes* obtidos do seqüenciamento das bibliotecas HSR, CDM e CDC (BeSEST) foram alinhados contra o banco de dados BeEST utilizando o algoritmo BlastN. Os *unigenes* que apresentavam regiões de total identidade intercaladas por regiões de nenhuma identidade, foram selecionados para posterior análise. Uma busca manual por junções de *splicing* conservadas (5' éxon...GT...íntron...AG...éxon 3') nas regiões que flanqueavam as possíveis seqüências intrônicas e uma busca por seqüências similares às seqüências consenso de sítios de ramificação (PuCTNAC) (Fietto, 2001) presentes dentro do provável íntron foi tambem realizada. Na tabela 22 estão listados os 85 *unigenes* obtidos, mostrando as regiões flanqueadoras e o sítio de ramificação dos íntrons.

Dentre os 85 *unigenes* observados, 19 apresentaram mais de um íntron em sua seqüência, sendo que três *unigenes* apresentaram três íntrons. O tamanho dos íntrons variou desde 53 até 333 nucleotídeos, no entanto, a maioria dos íntrons tiveram seu tamanho variando entre 50 e 90 nucleotídeos, como mostra a figura 28.

Tabela 22 – *Unigenes* de *B. emersonii* que apresentaram seqüências intrônicas putativas, mostrando as possíveis regiões flanqueadoras e de ramificação.

Gene ID	Anotação	5'	Sítio de ramificação	3'	# de ESTs			Tamanho (pb)	Processo biológico (GO)
					CDM	CDC	HSR		
BeSAS691	6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase	G 'gtatg	cctcac	gacag' G	-	5	-	121	amino acid metabolism
BeSAS582	Hypothetical protein	G 'gtacg	tctgac	cgcag' C	-	2	-	202	carbohydrate biosynthesis
BeE90D08B09	Chitinase	A 'gtacg	actgac	tgtag' C	-	1	-	71	carbohydrate metabolism
BeE90D04F01	Septin 2	C 'gtacg	gctgac	cgcag' A	-	1	-	72	cell cycle
BeE60C05G05	Beta tubulin cofactor A	T 'gtgcg	gctcac	cgtag' T	1	-	-	59	chaperonin-mediated tubulin folding
BeE60C12H07	Prenylcysteine carboxylmethyltransferase	T 'gtccg	gctgac	tctag' C	1	-	-	80	C-terminal protein amino acid methylation
BeSAS333	Dynein light chain	G 'gtgcg	actcat	tgtag' A	2	1	-	63	dendrite morphogenesis
BeSAS327 (1)	Thioredoxin II	C 'gtacg	gctaac	accag' G	4	3	-	167	electron transport
BeSAS327 (2)	Thioredoxin II	C 'gtacg	actcac	accag' G	4	3	-	70	electron transport
BeE90D04B07	Thioredoxin domain	G 'gtgcg	gctgac	tatag' C	-	1	-	57	electron transport
BeE60C34B08	Hypothetical protein	G 'gtact	actgac	tgtag' G	1	-	-	78	ER-associated protein catabolism
BeE90D12B01 (1)	Glycolipid transfer protein	G 'gtccg	actgac	tgtag' A	-	1	-	62	glycolipid transport
BeE90D12B01 (2)	Glycolipid transfer protein	G 'gtacg	gctgac	tgtag' C	-	1	-	64	glycolipid transport
BeE60H21C11	Rabl2a protein	A 'gtacg	gctgac	cgtag' C	-	-	1	76	intracellular protein transport
BeSAS509	Ferritin	G 'gtgcg	gctaac	tacag' G	2	2	-	68	iron ion homeostasis
BeSAS590 (1)	Dynein light chain 2	C 'gtacg	gctcac	tgtag' A	-	2	-	77	microtubule-based process
BeSAS590 (2)	Dynein light chain 2	G 'gtacg	actgac	ctgag' C	-	2	-	199	microtubule-based process
BeSAS605	Methyltransferase	C 'gtacg	gctgac	tgtag' C	-	2	-	65	phospholipid metabolism
BeE60C07D01	Hypothetical protein	G 'gtacc	gctaac	catag' G	1	-	-	62	phospholipid metabolism
BeE60C23G07	Tyrosine phosphatase	T 'gtatg	cctcac	cgtag' G	1	-	-	59	protein amino acid dephosphorylation
BeSAS395	Ribosomal protein L28	C 'gtgag	actgac	cctag' T	1	-	2	58	protein biosynthesis
BeSAS407	Hsp70-1	G 'gtacg	gctcac	tctag' A	1	1	-	165	protein folding
BeSAS726	Hsp60	G 'gttcg	actaat	tgtag' C	-	2	-	69	protein folding
BeSAS568	Hsp30	G 'gtacg	actcac	cgtag' A	2	1	-	69	protein folding
BeSAS762	Hsp17	A 'gtacg	actcac	tgcag' A	1	3	-	97	protein folding
BeE90D15G01 (1)	Hsp16	G 'gtgcg	actgac	tgcag' G	-	1	-	64	protein folding
BeE90D15G01 (2)	Hsp16	G 'gtatg	cctaac	ctcag' A	-	1	-	102	protein folding
BeE60H23F12	Cyclophilin D	G 'gtacg	actgac	gacag' G	-	-	1	64	protein folding
BeE60C1408 (1)	Cyclophilin A	G 'gtccg	actcac	tgtag' C	1	-	-	135	protein folding
BeE60C1408 (2)	Cyclophilin A	G 'gtacg	catcac	ggaag' A	1	-	-	252	protein folding
BeE90D07F08 (3)	Cyclophilin A	G 'gtacg	gttgac	tcggg' G	-	1	-	102	protein folding
BeSAS476 (1)	FK506 binding protein	G 'gtggg	actcac	tctag' G	2	-	-	169	protein folding
BeSAS476 (2)	FK506 binding protein	G 'gtgcg	tctgac	tctag' G	2	-	-	78	protein folding
BeSAS21	Prohibitin	G 'gtggg	atcaac	tctag' T	-	2	1	69	protein folding
BeE60C35D10 (1)	Hypothetical protein	G 'gtaca	ctcaac	cgtag' A	1	-	-	61	protein modification
BeE60C35D10 (2)	Hypothetical protein	T 'gtaca	cctgac	tgtag' G	1	-	-	59	protein modification
BeSAS143	Ubiquitin-conjugating enzyme	G 'gtacg	actgac	cgtag' A	-	1	2	72	protein modification
BeE60C10A07	Hypothetical protein	G 'gtgcg	actcac	cgtag' T	1	-	-	67	protein modification

BeSAS589 (1)	26S proteasome regulatory complex	G 'gtacg	cctgac	accag' G	-	2	-	64	proteolysis
BeSAS589 (2)	26S proteasome regulatory complex	C 'gtatg	actgac	tgtag' A	-	2	-	65	proteolysis
BeE60C19E02	ENSANG00000022234	G 'gtacg	tctcac	aacag' T	1	-	-	61	regulation of ranscription
BeSAS714	Glutathione Peroxidase 3	G 'gtgag	gctaac	gtcag' C	2	2	1	333	response to oxidative stress
BeSAS517	GTP cyclohydrolase II	G 'gtgcg	cctcac	accag' A	2	3	-	65	riboflavin biosynthesis
BeE60C09G12	mitochondrial phosphate carrier protein	A 'ctgtt	gttgac	cgtac' C	1	-	-	108	transport
BeE60C15F01	NTF2-related export protein 2	G 'gtacg	actcac	tccag' T	1	-	-	53	transport
BeE60H21G06	Nuclear transport factor 2	C 'gtacg	gcttac	tgtag' C	-	-	1	58	transport
BeSAS199	Hypothetical protein	G 'gtacc	gctgac	tgcag' G	1	1	2	106	ubiquitin-dependent protein catabolism
BeSAS813 (1)	Ubiquitin fusion degradation protein	C 'gtgtg	tcttac	tgtag' T	-	2	-	64	ubiquitin-dependent protein catabolism
BeSAS813 (2)	Ubiquitin fusion degradation protein	G 'gtgcg	gctgac	actag' T	-	2	-	61	ubiquitin-dependent protein catabolism
BeSAS435	Synaptobrevin	G 'gtcgg	gctcac	tgtag' C	2	-	-	155	vesicle-mediated transport
BeSAS548 (1)	Synaptobrevin-like V-snare protein	C 'gtacg	gctgac	cgcag' C	2	-	1	67	vesicle-mediated transport
BeSAS548 (2)	Synaptobrevin-like V-snare protein	G 'gtgcg	gctcac	cacag' A	2	-	1	64	vesicle-mediated transport
BeSAS224	Hypothetical protein	G 'gtacg	ctgaac	cacag' G	-	2	2	63	
BeSAS239	No match	T 'gtccg	actgac	tgtag' C	-	1	2	202	
BeSAS305	No match	G 'gtacg	acatac	tctag' T	-	-	2	63	
BeSAS377 (1)	Hypothetical protein	G 'gtacg	actgac	cacag' A	1	1	-	64	
BeSAS377 (2)	Hypothetical protein	G 'gtacg	actgac	tgtag' T	1	1	-	65	
BeSAS377 (3)	Hypothetical protein	G 'gtacg	gctgat	tgtag' A	1	1	-	62	
BeSAS421	Putative elicitor-responsive gene	G 'gtacg	tctcac	tctag' T	2	-	-	73	
BeSAS428	Putative pirin-like protein	G 'gtacg	gctcac	tctag' A	2	6	-	73	
BeSAS442	Peroxiredoxin	G 'gtacg	gctcac	actag' G	2	-	-	119	
BeSAS468 (1)	No match	C 'gtacg	gctcac	ttcag' A	2	-	-	255	
BeSAS468 (2)	No match	G 'gtgtg	tctgac	tgtag' C	2	-	-	63	
BeSAS492	No match	G 'gtgcg	ccgcat	cccag' G	1	-	1	163	
BeSAS584 (1)	No match	G 'gtatg	gctcac	tctag' C	-	2	-	99	
BeSAS584 (2)	No match	G 'gtacg	gctcac	cacag' A	-	2	-	64	
BeSAS585	Hypothetical protein	G 'gtgcg	gctgac	tgcag' G	2	3	3	66	
BeSAS630	No match	G 'gtacg	gctaac	cgcag' A	1	1	3	93	
BeSAS638 (1)	No match	G 'gtatg	gctcac	cacag' A	1	3	-	65	
BeSAS638 (2)	No match	G 'gtgcg	gctgac	tgtag' C	1	3	-	64	
BeSAS653	Zn-dependent alcohol dehydrogenase	G 'gtacg	gctaac	tgcag' G	-	5	-	66	
BeSAS735	Glutathione S-transferase 2	G 'gtact	actgac	ggtag' C	2	1	-	77	
BeSAS792	Membrane bound C2 domain containing protein	G 'gtgcg	gctgac	cgtag' T	2	1	-	83	
BeSAS802	No match	C 'gtacg	gctcac	ttcag' A	2	2	3	254	
BeSAS814	Glutathione S-transferase 3	G 'gtacg	gctaac	cctag' G	-	2	-	66	
BeE60C10A05 (1)	No match	G 'gtacg	gctcac	cgtag' C	1	-	-	186	
BeE60C10A05 (2)	No match	G 'gtacg	acttac	tctag' T	1	-	-	62	
BeE60C10E09	RNA binding protein	G 'gtacg	gcggac	aacag' G	1	-	-	58	

BeE60C11C05 (1)	Hypothetical protein	G 'gtaca	gttgac	tttag' C	1	-	-	71
BeE60C11C05 (2)	Hypothetical protein	G 'gtacg	tctgac	tctag' A	1	-	-	91
BeE60C11F05	Unamed protein product	G 'gtgcg	actgac	tgtag' G	1	-	-	63
BeE60C24F03	No match	C 'gtacg	cctcac	tgtag' C	1	-	-	68
BeE60C34G12	Hypothetical protein	C 'gtacg	cctgac	tgtag' C	1	-	-	62
BeE60C35G03	Hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1	C 'gtgag	gctgac	cttag' C	1	-	-	62
BeE60C36B06 (1)	Similar to apoAI protein	T 'gtccg	gctgac	cctag' T	1	-	-	93
BeE60C36B06 (2)	Similar to apoAI protein	G 'gttcg	tctgcac	tacag' G	1	-	-	57
BeE60C36B06 (3)	Similar to apoAI protein	G 'gttcg	tctcac	tgtag' G	1	-	-	60
BeE60H17C01	No match	C 'gtacg	gctgat	tgtag' C	-	-	1	58
BeE60H22D09	No match	T 'gtaca	actgac	tgtag' G	-	-	1	77
BeE60H28F12	No match	G 'gtacg	gctcac	cgtag' C	-	-	1	187
BeE60H28H03	No match	G 'gcgcg	gctgac	cggcg' G	-	-	1	170
BeE60H29B06 (1)	SAM-dependent methyltransferases	C 'gtacg	gctgac	gttag' G	-	-	1	60
BeE60H29B06 (2)	SAM-dependent methyltransferases	G 'gtacg	cctgac	tgtag' C	-	-	1	59
BeE60H31A04	No match	G 'gtgcg	tctcac	tctag' A	-	-	1	75
BeE90D02G03	Inositol-1(or 4)-monophosphatase	G 'gtaag	gctgaa	tgtag' A	-	1	-	57
BeE90D04E07	HSPC177]	G 'gtgcg	cctcac	tgtag'A	-	1	-	63
BeE90D05A10	No match	G 'gtacg	acatac	tctag'T	-	1	-	62
BeE90D07H07	No match	G 'gtagg	actcac	ggtag' C	-	1	-	53
BeE90D09D10	Hypothetical protein	G 'gtatg	gctaac	tctag' C	-	1	-	242
BeE90D11G08	C2 contain domain protein	G 'gtgcg	actgac	tttag' T	-	1	-	75
BeE90D12F02	ENSANG00000010717	G 'gtatg	gttgac	tgtag' T	-	1	-	60
BeE90D15D07 (1)	GTP cyclohydrolase I	G 'gtacg	gctcac	cgtag' C	-	1	-	60
BeE90D15D07 (2)	GTP cyclohydrolase I	G 'gtacg	actcac	gacag' A	-	1	-	78
BeE90D16C06	Glutathione S-transferase	T 'gtacg	gctgac	tctag' G	-	1	-	72
BeE90D17F08	No match	G 'gtaag	attcat	accag' A	-	1	-	62

BeSAS representa as ESTs que foram agrupadas em um mesmo *contig* oriundas das bibliotecas de cDNA de estresse (*Stress Assembled Sequence*). O tamanho de cada íntron é mostrado, bem como o processo biológico do Gene Ontology com o qual o *unigene* está relacionado. O número de ESTs seqüenciadas nas bibliotecas CDM ($CdCl_2$ 50μM), CDC ($CdCl_2$ 100μM) e HSR (38°C) para cada *unigene* são apresentados.

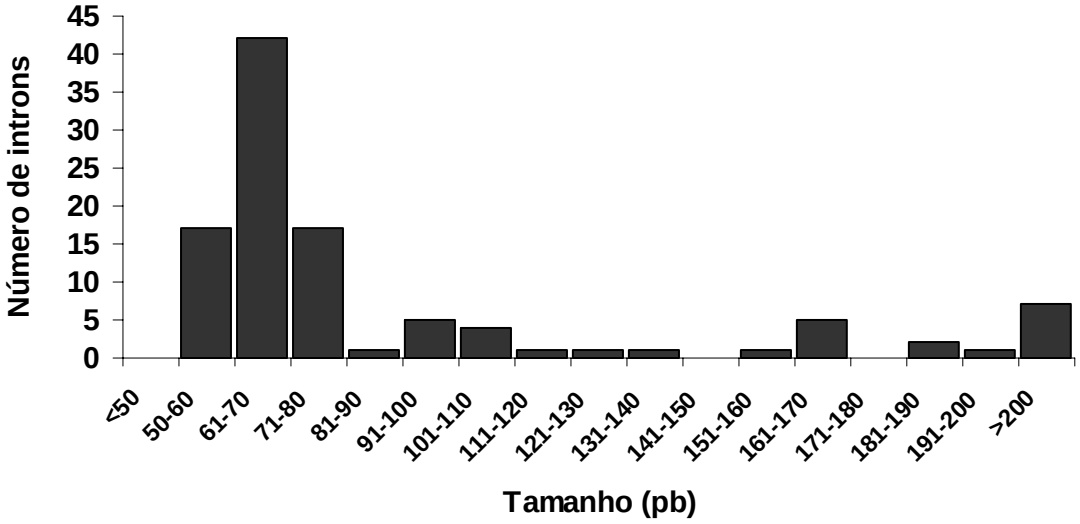


Figura 28 – Distribuição do tamanho dos 105 íntrons dos 85 *unigenes* de *B. emersonii*.

Com o intuito de verificar a conservação de nucleotídeos nos sítios de processamento dos íntrons, submetemos as regiões flanqueadoras bem como as regiões de ramificação ao servidor WebLogo (http://weblogo.berkeley.edu; Crooks *et al*., 2004). As conservações de seqüência são mostradas na figura 29 e o tamanho da letra representando a seqüência é diretamente proporcional ao seu grau de conservação dentro do alinhamento. Como se pode observar, as junções de *splicing* do tipo GT-AG, que são as comumente encontradas em eucariotos (Burset *et al*., 2001), foram observadas na maioria dos íntrons. Os sítios de ramificação também seguiram o consenso observado para outros íntrons descritos em *B. emersonii* (Fietto, 2001).

É necessário salientar que íntrons em seqüências de ESTs obtidas de bibliotecas de cDNA que não foram submetidas a nenhum estresse também foram observados, mas não entraram nesta análise. Entretanto, nas bibliotecas sem estresse o número de íntrons detectados foi bem menor do que o verificado para as bibliotecas de choque térmico e cádmio (HSR, CDM e CDC), indicando que possivelmente estas últimas bibliotecas estejam realmente enriquecidas em cDNAs não processados, ou seja, com íntrons.

Dentre os genes que apresentaram ESTs com seqüências intrônicas encontra-se o gene *hsp70-1* de *B. emersonii*. Esse gene já havia sido previamente caracterizado e apresenta um íntron de 165 pb na região 5′ (Stefani & Gomes, 1995). Quando comparamos a seqüência nucleotídica do cDNA do gene *hsp70-1*, obtida a partir do alinhamento das ESTs que apresentaram íntrons, com a

seqüência do gene *hsp70-1* caracterizado previamente, verificamos que as duas seqüências são idênticas, tanto na região intrônica quanto na região codificadora. Estes dados validam nossa análise, sugerindo que as seqüências intrônicas putativas observadas correspondem provavelmente a mRNAs não processados.

Para verificar se o cádmio realmente interfere no correto processamento dos íntrons realizamos ensaios de *Northern blot* utilizando como sonda o cDNA do gene *gpx3-1* de *B. emersonii,* um dos que apresentaram ESTs com seqüências intrônicas. Além disso, esse gene foi o que apresentou o maior íntron dentre todos analisados (333 pb), o que facilitaria a distinção entre o mRNA processado e o não processado nos ensaios de *Northern blot* (Figura 30). Usamos o gene *gpx3-2* como controle, pois esse gene não apresentou ESTs com seqüências intrônicas e faz parte da mesma família de *gpx3-1*. Realizamos uma comparação de aminoácidos entre as duas proteínas e observa-se que 69% são similares, sendo 61% dos aminoácidos idênticos (Figura 31).

No ensaio de *Northern blot* do gene *gpx3-1* foi possível observar que os níveis do mRNA aumentavam quando as células foram submetidas ao choque térmico e ao estresse por cádmio tanto na concentração de $CdCl_2$ 50μM quanto na de $CdCl_2$ 100μM (Figura 32). É possível visualizar dois mRNAs de tamanhos distintos no *Northern blot* apenas quando as células foram tratadas com $CdCl_2$. Estas evidências sugerem que o mRNA de maior tamanho ocorra devido à inibição do *splicing* nessas condições. Detectamos níveis mais altos do mRNA de maior tamanho em células tratadas com $CdCl_2$ 100μM do que em células tratadas com $CdCl_2$ 50μM, provavelmente devido a uma maior inibição do *splicing* no primeiro caso. Estes dados indicam que a inibição do processamento do íntron do mRNA correspondente ao gene *gpx3-1* é dependente da concentração de $CdCl_2$ presente no meio. Ao contrário de *gpx3-1*, o gene *gpx3-2* não apresentou dois mRNAs de tamanhos diferentes quando as células foram tratadas com cádmio, como esperado.

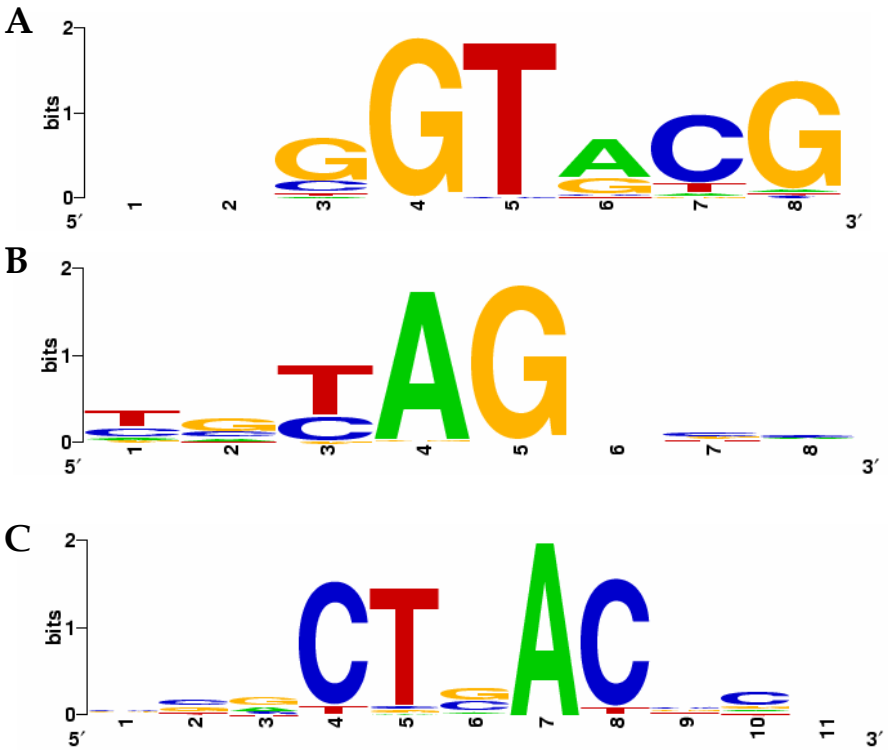


Figura 29 – Conservação de seqüência nos íntrons de *B. emersonii*. As seqüências consenso para junções 5′ exon-íntron (A), 3′ íntron-exon (B) e sítio de ramificação putativo (C) foram calculados com base em 105 íntrons usando o servidor WebLogo. As seqüências dos íntrons começam na posição 4 em (A) e terminam na posição 5 em (B).

```
     TGTATGCAACGGATCCCTACGAACCAACAACAACCACAAGgtgagcgagcacccgcaccggctgcccccaactcgacctg
   1 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 80

     cgcggcctgacctccctcccctcctctccctcactctcgatcctcgacgacgcgcggcaccgacttgcagcaacttcatg
  81 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 160

     cccgcctccacgctcctcgagaagctcgactggcgccacgtcgccgtcggcgtgctcgtcgcgctgctctcggcccacct
 161 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 240

     cttcccctcccccaactcggccccgcgcgtcgtctaccccatccgccaccccgctaccaccaccactacctcccccaccg
 241 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 320

     ccaccaagccgcgtgcgctaaccgacccgcccgtgcccgccgcgacctcgtcagCCACCATGACCACGTCCCCCTTCTAC
 321 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 400
                                                                 M  T  T  S  P  F  Y

     GCCCTGACGGCGCTCGACGCGCGCAAGAACGAGGTCAAGTTCTCCGACTTCCAGGGCAAGGTGGTCCTGATCGTCAACGT
 401 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 480
     A  L  T  A  L  D  A  R  K  N  E  V  K  F  S  D  F  Q  G  K  V  V  L  I  V  N  V

     GGCCTCCAAGTGCGGCTTCACCCCGCAGTACGACGGCCTCGAGGCCCTCAACAAGAAGTACAAGGACCAAGGCCTGCAGG
 481 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 560
      A  S  K  C  G  F  T  P  Q  Y  D  G  L  E  A  L  N  K  K  Y  K  D  Q  G  L  Q  V

     TGATCGGGTTCCCGTGCAACCAGTTCGGCGGCCAGGAGCCCGGCACCGAGGAGGAGATCGTCACCACGTGCCGCCTCAAC
 561 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 640
       I  G  F  P  C  N  Q  F  G  G  Q  E  P  G  T  E  E  E  I  V  T  T  C  R  L  N

     TACGGCGTCAGCTTCCCCGTCATGGCCAAGGTCGACGTCAACGGCGAGAACGAGCACCCCGTCTACAAGTACCTCAAGTC
 641 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 720
     Y  G  V  S  F  P  V  M  A  K  V  D  V  N  G  E  N  E  H  P  V  Y  K  Y  L  K  S

     GCAGAAGAGTAGCATGTTTTTGAAATCGGTGAAGTGGAACTTTGAGAAGTTCCTGGTCGACCGCGACGGCAACGTCGTCA
 721 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 800
      Q  K  S  S  M  F  L  K  S  V  K  W  N  F  E  K  F  L  V  D  R  D  G  N  V  V  N

     ACCGCTACACGTCGCTCACCAAGCCCGAGGACATTGCCGGCGACATCGAGAAGTACCTCGCCAAGCCCGCCACGTCGGCG
 801 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 880
       R  Y  T  S  L  T  K  P  E  D  I  A  G  D  I  E  K  Y  L  A  K  P  A  T  S  A

     TAAGGTCGTGGTGGCCGCGGCCGAGTCGAGTGACGCGACGCGCGAGTTAGTGATCGCGCGCCCCGCGCGAGTCCGAGTGT
 881 ---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+---------+ 960

     GACGTTTGATCCTGTATACATCCCCCTTCTACTTCTCC
 961 ---------+---------+---------+-------- 998
```

Figura 30 - Seqüência de nucleotídeos do cDNA correspondente à proteína Gpx3-1. A seqüência de aminoácidos deduzida está mostrada abaixo da seqüência de nucleotídeos. As bases sublinhadas correspondem à metionina iniciadora (ATG) e ao códon de parada da tradução (TAG). As bases destacadas em cinza correspondem às junções de *splicing* (5′GT – AG 3′) e ao sítio de ramificação (5′ GCTAAC 3′). As bases representadas em letra minúscula correspondem ao íntron putativo.

```
Gpx3-1   1 MTTSPFYALTALDARKNEVKFSDFQGKVVLIVNVASKCGFTPQYDGLEAL 50
           |  . ||.||| ||:| |  |.  .|||||||||||||:| || ||| |
Gpx3-2   1 MSMADFYSLTATDAKKGEFSFASLKGKVVLIVNVASKCGYTKQYSGLEQL 50
                    .         .         .         .         .
        51 NKKYKDQGLQVIGFPCNQFGGQEPGTEEEIVTTCRLNYGVSFPVMAKVDV 100
            | :  |||:::|||||||||||||||| ||.  | |||||.|||:|||:|
        51 YKDHHAQGLEIVGFPCNQFGGQEPGTEAEILQFCSLNYGVTFPVLAKVEV 100
                   .         .         .         .         .
       101 NGENEHPVYKYLKSQKSSMFLKSVKWNFEKFLVDRDGNVVNRYTSLTKPE 150
           ||  ||||||:||   ..    |: |||||||||| | || |: |   ||
       101 NGAGEHPVYKFLKGH.TTPATPSISWNFEKFLVDRSGKVVARFPSSVTPE 149
                    .
       151 DIAGDIEKYLAKPATSA 167
              :  :||  |
       150 QLVKEIEPLLK...... 160
```

Figura 31 – Comparação das seqüências de aminoácidos deduzidas de Gpx3-1 e Gpx3-2. A comparação foi feita utilizando o programa Align do INTERPRO. Similaridade entre as proteínas é de 69% e identidade de 61%.

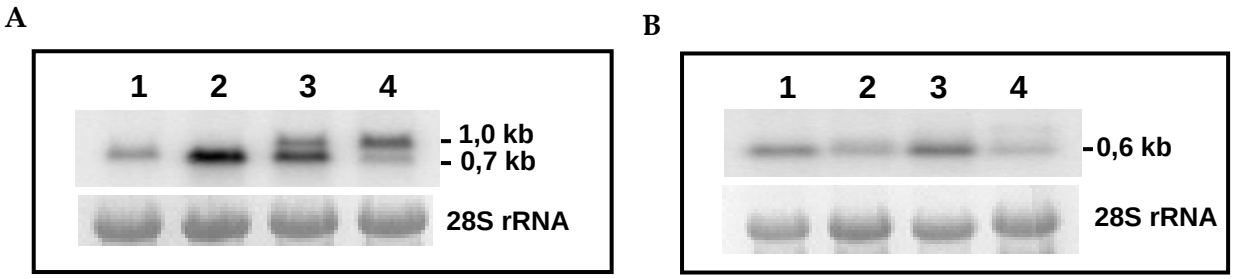


Figura 32– Análise dos níveis do mRNA dos genes *gpx3-1* e *gpx3-2* em células de esporulação de *B. emersonii,* após o choque térmico ou após a exposição ao cádmio. A - Análise dos níveis do mRNA do gene *gpx3-1* utilizando como sonda o cDNA da proteína Gpx3-1. Canaletas: 1 - Amostra de RNA total de células isoladas aos 60 min da esporulação de *B. emersonii*. 2 – RNA de células submetidas ao choque térmico (38°C) dos 30min aos 60 min da esporulação. 3 - RNA de células submetidas ao tratamento com cádmio ($CdCl_2$ 50μM) dos 30 min aos 60 min da esporulação. 4 - RNA de células submetidas ao tratamento com cádmio ($CdCl_2$ 100μM) dos 30 min aos 60 min da esporulação. B - Análise dos níveis do mRNA do gene *gpx3-2* utilizando como sonda o cDNA da proteína Gpx3-2. Amostras 1, 2, 3 e 4 iguais às do item A. O rRNA 28S foi utilizado como controle.

V – DISCUSSÃO

1 – Bibliotecas de cDNA de estresse

Os organismos vivos possuem a propriedade notável de adaptação a mudanças fisiológicas ou a condições adversas. Os organismos unicelulares, em particular devem lutar contra flutuações de nutrientes, pH, temperatura e osmolaridade do meio, assim como exposição a uma gama de compostos ambientais potencialmente tóxicos. Para alcançar esta adaptação celular é necessária a reorganização da expressão gênica para o programa de crescimento requerido em cada ambiente. A reprogramação da expressão gênica pode ser desvendada usando tecnologias de larga escala como seqüenciamento de ESTs ou microarranjos de DNA, dentre outros, que fornecem informações valiosas sobre o padrão de expressão gênica das células em determinadas condições. A caracterização da expressão gênica disparada por mudanças ambientais fornece importantes informações de quando e como cada gene é expresso, além de uma ampla visão da resposta fisiológica das células a mudanças no seu entorno.

O seqüenciamento em larga escala de ESTs tem historicamente fornecido dados importantes para a descoberta de genes (Schmitt *et al.,* 1999; Ewing & Green, 2000; Takasuga *et al.,* 2001; Nugent *et al.,* 2004; Ribichich *et al.,* 2005; Ribichich *et al.,* 2006; Semova *et al.,* 2006), para a análise da expressão de genes estágio ou tecido-específicos (Audic & Claverie, 1997; Bonaldo *et al.,* 1996; Claverie, 1999; Megy *et al.,* 2002; Goldman *et al.,* 2003), além de estudos de processamento alternativo de íntrons (Wolfsberg & Landsman, 1997; Gupta *et al.,* 2002). A informação proveniente do seqüenciamento das ESTs tem oferecido, desta forma, a possibilidade de analisar o espectro de genes que estão sendo expressos em determinada condição, tempo, tecido ou estágio de desenvolvimento de organismos sem o genoma seqüenciado, e também tem permitido a elaboração de mapas das regiões expressas em genomas parcial ou totalmente caracterizados, apresentado-se como alternativa importante à informação proveniente da predição das regiões transcritas (McCombie *et al.,* 1992; Polymeropoulos *et al.,* 1993; Collet & Joseph, 1994; Schuler *et al.,* 1996; Rounsley *et al.,* 1996; Scharfe *et al.,* 1999; Sims *et al.,* 2004). A posterior análise destas seqüências também tem fornecido informações adicionais do ponto de vista funcional, evolutivo e estrutural (Torto *et al.,* 2003; Gard *et al.,* 2004; Philippe *et al.,* 2004; Bagga *et al.,* 2004).

O presente estudo gerou 6350 ESTs que após agrupamento revelaram 2326 *unigenes* putativos, sendo que 1198 genes (51%) deles não haviam sido descritos previamente em *B. emersonii*. Estes novos *unigenes* representam assim, uma valiosa contribuição deste trabalho para o projeto total de seqüenciamento de ESTs de *B. emersonii*.

Quando todas estas 6350 ESTs seqüenciadas neste trabalho foram agrupadas com as cerca de 17000 ESTs de *B. emersonii* previamente seqüenciadas (Ribichich *et al.,* 2005), observou-se 6071 *unigenes* putativos diferentes neste fungo. Em fungos que tiveram seus genomas completamente seqüenciados, o número de genes preditos varia de 4950 em *Schizosaccharomyces pombe* a 12074 em *Aspergilus oryzae* (Tabela 23). Infelizmente, o tamanho do genoma de *B. emersonii* ainda não é conhecido e nenhum quitridiomiceto teve seu genoma completamente seqüenciado. No entanto, sabe-se que os quitridios *Pyromyces sp.* e *Batrachochytridium dendrobatis*, possuem genomas com tamanho de cerca de 30 e 40 Mb, respectivamente. Considerando que *B. emersonii* tenha aproximadamente este tamanho de genoma e tenha um número de genes semelhante ao de *Aspergillus oryzae*, o fungo com o maior número de genes já seqüenciado (12074), os 6071 *unigenes* descritos em *B. emersonii* corresponderiam, no mínimo, à metade de todos os genes neste fungo.

Tabela 23 – Fungos com genoma completamente seqüenciado.

Organismo	**Tamanho (Mb)**	**Número de genes**	**Referência**
Schizosaccharomyces pombe	13,8	4.950	Wood *et al.,* 2002
Saccharomyces cerevisiae	12	5.885	Goffeau *et al.,* 1996
Cryptococcus neoformans	20	6.500	Loftus *et al.,* 2005
Ustilago maydis	20	6.522	Austin *et al.,* 2004
Aspergillus fumigatus	28	9.009	Nierman *et al.,* 2005
Aspergillus nidulans	30	9.396	Galagan *et al.,* 2005
Neurospora crassa	39	10.082	Galagan *et al.,* 2003
Magnaporthe grisea	38	11.109	Dean *et al.,* 2005
Aspergillus oryzae	36	12.074	Machida *et al.,* 2005

Do total de 2326 *unigenes* diferentes obtidos das bibliotecas de estresse HSR, CDM e CDC, 1282 (59%) apresentaram similaridade com alguma seqüência do banco de dados do Swiss Prot e foram anotados em pelo menos uma das categorias do GO. Este número é bastante similar ao obtido quando fizemos a comparação de seqüências usando o banco de dados do GenBank (1369). Uma porcentagem semelhante de genes não identificados foi descrita para outros fungos, como *N. crassa* (41%), *U. maydis* (41%) e *P. brasiliensis* (52%) (Zhu *et al.,* 2001; Nugent *et al.,* 2004; Felipe *et al.,* 2003). Segundo a classificação do GO, 1113 *unigenes* foram classificados na categoria de função molecular, 999 em processo biológico e 650 em componente celular.

A maior parte dos *unigenes* foi classificada nos seguintes processos biológicos: metabolismo de proteínas (34%), metabolismo de ácidos nucléicos (16%), e organização celular e biogênese (10%). Como esperado, a subcategoria enovelamento de proteínas foi responsável por 19% de todas as proteínas presentes na categoria de metabolismo de proteínas e a subcategoria proteólise por 11%.

Entre as ESTs mais seqüenciadas da biblioteca de choque térmico (HSR) encontram-se aquelas que codificam as proteínas Hsp17, Hsp90, Hsp10, Hsp30, Ciclofilina A e Peptidil-prolil-cis-trans-isomerase D, que são proteínas conhecidamente necessárias para a resposta ao estresse térmico nos organismos vivos. C*ontigs* codificando proteínas ribossômicas, que estão relacionados com a síntese de proteínas, também estão presentes entre os mais abundantes na biblioteca HSR assim como nas bibliotecas de estresse por cádmio (CDM e CDC). Cerca de 64% dos *contigs* mais abundantes na biblioteca CDM codificam proteínas ribossômicas, enquanto 32% codificam proteínas deste grupo na biblioteca CDC. Um grande número de ESTs correspondendo a genes envolvidos na síntese de proteínas foi também observado em bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNA de células do início da esporulação de *B. emersonii* (Ribichich *et al.,* 2005). Portanto, este aumento de ESTs codificando proteínas ribossômicas parece ser uma característica do estágio de esporulação.

Na biblioteca CDC observou-se entre os *contigs* mais abundantes genes codificando proteínas com propriedades antioxidantes como Glutationa S-transferases e uma Oxidoredutase dependente de NADH. *Contigs* codificando proteínas relacionadas com apoptose como as Metacaspases e a Pirina, foram observados tanto na biblioteca CDM quanto na CDC. Estes genes, codificando proteínas com propriedades antioxidantes e relacionadas com apoptose foram também induzidos nos ensaios de microarranjos de DNA de células submetidas a cádmio e serão discutidos adiante. Dois *contigs* encontram-se entre os mais abundantes nas três bibliotecas de estresse e codificam a Poliubiquitina, uma proteína relacionada com a degradação protéica, e uma proteína de resposta universal a estresses (USP). O gene da proteína USP também foi classificado como induzido tanto por choque térmico quanto por cádmio nos experimentos de microarranjos de DNA.

2 – Chaperones moleculares

O enovelamento de proteínas *in vivo* requer o envolvimento de uma família de proteínas chamadas chaperones moleculares (Walter & Buchner, 2002), que são encontradas em todos os organismos vivos estudados. Algumas destas proteínas são essenciais para a viabilidade da célula

(Feder & Hofmann, 1999). Neste contexto, Riezman (2004) propôs que durante condições de estresse térmico o acumulo de proteínas desnaturadas ou agregadas é responsável pela perda de viabilidade da célula, reforçando a importância das chaperones moleculares nestes eventos. Além da sua participação no enovelamento de proteínas, as chaperones moleculares desempenham outros papéis importantes na célula como: transporte de proteínas através de membranas, montagem e desmontagem de complexos protéicos multi-estruturados, vias de sinalização celular, participação na degradação de proteínas mal enoveladas ou agregadas, e na ativação de enzimas e receptores (Parsell & Lindquist, 1993).

O projeto total de ESTs de *B. emersonii* permitiu a identificação de 78 *unigenes* codificando chaperones moleculares, que correspondem a 1,3% de todos os *unigenes* observados neste fungo. No entanto, a porcentagem de todas as ESTs seqüenciadas que correspondem a estes *unigenes* é de 4,2% (982), uma média de 3 ESTs seqüenciadas para cada *unigene*. Interessantemente, se compararmos o número de ESTs seqüenciadas nas bibliotecas de cDNA de estresse com o número de ESTs seqüenciadas das bibliotecas de cDNA das células sem estresse, observa-se que no primeiro caso 8,5% (540) das ESTs correspondiam a genes de chaperones enquanto que no segundo caso esta porcentagem foi de apenas 2,6% (442). Esses dados indicam que como esperado, houve um enriquecimento de ESTs de chaperones moleculares e de proteínas associadas nas bibliotecas de estresse.

Foram observados genes codificando chaperones moleculares de todas as famílias conhecidas, como as Hsps de baixo peso molecular (sHsps), que incluem o gene *hsp17*, além dos genes codificando as proteínas Hsp16, Hsp20 e Hsp30. A família das Hsp40, juntamente com a família das PPIases e Ciclofilinas foram a que apresentaram o número mais diverso de membros, 17 e 15, respectivamente. Em *S. cerevisiae*, 16 proteínas Hsp40 distintas foram identificadas de acordo com sua similaridade com a proteína DnaJ de *E. coli* (Yan & Craig, 1999). As proteínas Hsp40 atuam como parte da maquinaria da chaperone Hsp70, uma vez que o domínio J é o responsável pela estimulação da atividade de ATPase das proteínas Hsp70. Acredita-se, que a família Hsp40 é a maior de todas as famílias de chaperones e as proteínas que a compõem têm evoluído para funções diversificadas e variadas localizações celulares. Estas funções especializadas é que confeririam a sua especificidade como chaperone molecular (Cheetham & Caplan, 1998). Além do gene *hsp70-1*, que havia sido caracterizado anteriormente em *B. emersonii* (Stefani & Gomes, 1995), foram identificados nove outros genes codificando proteínas da família das Hsp70. Os dez genes da família Hsp70 de *B. emersonii* foram selecionados para uma melhor caracterização durante este trabalho e os resultados obtidos serão discutidos no item V-4.

Genes codificando as proteínas Hsp60 e Hsp10 também foram observados. As proteínas Hsp60 e Hsp10 são, respectivamente, os homólogos mitocôndriais das proteínas GroEL e GroES de *E. coli*. A Hsp60 é composta por 14 monômeros que constituem dois anéis com sete monômeros cada, de forma que as proteínas não-nativas podem ser isoladas em uma cavidade central onde elas são enoveladas. A liberação da proteína desta cavidade é catalisada pela co-chaperone Hsp10 em uma reação dependente de ATP (Bukau & Horwich, 1998). Os cDNAs codificando as proteínas Hsp60 e Hsp10 de *B. emersonii* haviam sido previamente caracterizados, sendo que ensaios de *Northern blot* mostraram que os respectivos mRNAs estão presentes durante todo o ciclo de vida do fungo e são altamente induzidos durante o choque térmico, tanto na esporulação com na germinação (Pugliese, 2002).

O complexo eucariótico citoplasmático homólogo à Hsp60/10 é a chaperonina TriC (TCP-1 *ring complexes*), também chamada de CCT (c*ytosolic chaperonin containing* TCP-1). Esta chaperonina em eucariotos é normalmente composta por oito subunidades diferentes (*alpha, beta, delta, gamma, epsilon, eta, theta* e *zeta*), porém homólogas entre si (Frydman *et al.,* 1992). Genes codificando proteínas correspondentes a todas estas subunidades da chaperone CCT foram observados entre as chaperones moleculares de *B. emersonii*. Assim como a Hsp60, CCT possui uma estrutura de dois anéis oligoméricos com uma grande cavidade central na qual as proteínas substrato se ligam. Esta chaperonina pode auxiliar no enovelamento de proteínas como a actina, que não pode ser enovelada por qualquer outro sistema de chaperones (Tian *et al.*, 1995).

O gene correspondente à proteína Hsp90 citoplasmática foi um dos que apresentou o maior número de ESTs seqüenciadas e também havia sido previamente caracterizado em *B. emersonii* (Pugliese *et al.,* 2006). Experimentos de *Northern blot* evidenciaram que o gene *hsp90* é expresso durante todo o ciclo de vida de *B. emersonii* e é altamente induzido por choque térmico em todos os estágios do seu desenvolvimento (Pugliese *et al.,* 2006). Além do gene que codifica a Hsp90 citoplasmática, observamos pelo seqüenciamento de ESTs outro gene codificando uma Hsp90, porém de retículo endoplasmático. As proteínas Hsp90 auxiliam o enovelamento de um seleto grupo de proteínas, principalmente as relacionadas com a transmissão de sinal. As proteínas classicamente enoveladas por Hsp90 são os receptores de hormônios esteróides e as proteínas quinases (Young *et al.,* 2001). As proteínas Hsp90 são diméricas e altamente dependentes de várias co-chaperones para desempenharem suas funções. As co-chaperones conhecidas que interagem com Hsp90 incluem: Sti1, Sba1, Aha1, Cdc37, Sse1, Cns1 e as PPIases (Young *et al.,* 2001). *Em B. emersonii* observou-se genes codificando algumas co-chaperones putativas como a Aha1 e Cdc37, além de várias proteínas da família das PPIases.

3 – Microarranjos de DNA

3.1 – Análise do fenótipo de células de *B. emersonii* submetidas a choque térmico ou cádmio.

O fenótipo de *B. emersonii* em resposta ao choque térmico ou o estresse por cádmio foi analisado utilizando-se microscopia ótica. Dados anteriores indicavam que a exposição das células de *B. emersonii* ao choque térmico a 38°C durante a esporulação levava a um atraso na finalização deste estágio de desenvolvimento. Entretanto, células do estágio de germinação quando submetidas ao estresse térmico pareciam não ser afetadas e eram capazes de formar o tubo germinativo no tempo adequado (Bonato *et al.*, 1987). Em nossas análises observamos que células submetidas a choque térmico durante a germinação, embora não apresentem nenhum fenótipo detectável durante o crescimento, sofrem um atraso significativo na finalização da esporulação. Enquanto em células controle o número de esporângios vazios observados após 210 min da indução esporulação foi de 82%, nas células tratadas esta porcentagem foi cerca de 30%. O choque térmico na esporulação também foi capaz de atrasar este estágio de desenvolvimento de *B. emersonii*, pois todos os esporângios expostos à alta temperatura encontravam-se cheios 210 min após a indução da esporulação.

Já o estresse por cádmio causou um efeito mais severo que o estresse por choque térmico. As células de germinação de *B. emersonii* tratadas com cádmio apresentaram um tamanho bem menor do que as células controle após 6h de crescimento, mas foram capazes de crescer após a retirada do cádmio do meio, indicando que as células sofreram com a presença deste metal pesado, mas se mantiveram viáveis. As células de esporulação expostas a cádmio também apresentaram um atraso na esporulação, que foi bem mais acentuado se comparado com células de esporulação, submetidas a choque térmico. A exposição de fungos a metais pesados é freqüentemente acompanhada da inibição de crescimento e de mudanças morfológicas (Baldrian, 2003), assim como observado no presente estudo em *B. emersonii*.

3.2 - Análise da resposta de *B. emersonii* ao choque térmico

A expressão gênica do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* em resposta a estresses ambientais como o choque térmico e a presença de metais pesados como o cádmio, foi também analisada neste trabalho utilizando microrranjos de DNA. Para estas análises lâminas contendo 3773 cDNAs distintos de *B. emersonii*, que correspondem a 62% do transcriptoma parcial do fungo já determinado, foram utilizadas. Embora estas lâminas não contemplem todos os genes já observados em *B. emersonii*, ainda assim é uma ferramenta poderosa para estudos da expressão

gênica, como revelou a análise dos genes diferencialmente expressos durante o estágio de germinação deste fungo, realizada recentemente (Salem-Izacc, 2006).

Utilizando ensaios de microarranjos de DNA, observamos que 3,3% (122) dos genes presentes na lâmina foram induzidos em resposta ao choque térmico em *B. emersonii*, nas condições analisadas. Destes, 34 genes foram induzidos em resposta a choque térmico tanto durante a esporulação quanto na germinação do fungo.

Vários genes codificando Hsps foram classificados como induzidos pelo choque térmico nos experimentos de microarranjos. Estes genes correspondem às proteínas Hsp17, Hsp10, Hsp90, Hsp20, Hsp100, Hsp60, Hsp70-2, Hsp70-8, Hsp70-10, Ciclofilina A, FK506-*binding protein*, Prefoldina e Psi1, além de várias PPIases. Sabe-se que uma parte importante da resposta celular ao choque térmico é constituída por genes codificando Hsps ou proteínas de estresse, uma vez que a sua expressão é induzida por altas temperaturas e várias outras condições de estresse. Os genes de choque térmico são comumente induzidos após a exposição das células a condições estressantes e potencialmente danosas e fornecem ao organismo um aumento temporário da tolerância ao estresse (Lindquist, 1986; Feder & Hofmann, 1999).

Em conseqüência do aumento de temperatura, muitas proteínas perdem sua estrutura nativa e não são mais capazes de desempenhar suas funções dentro da célula. Algumas proteínas desenoveladas permanecem em um estado passível de re-enovelamento pelas chaperones moleculares. Já outras proteínas desnaturadas não podem ser re-enoveladas e, portanto, são direcionadas para a proteólise. Como esperado, genes codificando proteínas relacionadas com a proteólise foram induzidos por choque térmico. Dentre eles encontra-se o gene codificando Der1, uma proteína que participa da transferência de proteínas desenoveladas do retículo endoplasmático para o citoplasma, onde elas são posteriormente destruídas pelo complexo do proteassomo de uma maneira dependente de ubiquitina (Knop *et al.,* 1996). Outro gene envolvido com a proteólise é o que codifica a proteína Arginina-tRNA transferase, que catalisa a ligação pós-traducional de arginina à extremidade N-terminal de outras proteínas. Em eucariotos, este processo faz parte da via N-terminal de degradação de proteínas e atua adicionando um aminoácido desestabilizador ao N-terminal dos aminoácidos aspartato ou glutamato de certas proteínas, direcionando-as para a proteólise que também é dependente de ubiquitina (Kwon *et al.,* 1999).

A adição pós-traducional de ubiquitina às proteínas (ubiquitinação) altera a função, localização e o trânsito destas proteínas ou as direciona para a degradação pelo complexo proteassomo 26S (Sun & Chen, 2004; Burger & Seth, 2004). A ubiquitinação é um processo dependente de ATP que envolve a ação de pelo menos três enzimas diferentes: uma *ubiquitin-*

activating enzyme (E1), uma *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2,), e uma *ubiquitin ligase* (E3), que funcionam em cascata (Passmore & Barford, 2004). Dois genes parálogos codificando uma *ubiquitin-activating enzyme* (E1) foram induzidos pelo choque térmico em *B. emersonii*. Como mencionado acima, esta enzima é responsável pela ativação da ubiquitina, o primeiro passo da via de ubiquitinação de proteínas. Estudos recentes mostraram que o simples aumento da atividade de degradação dependente de ubiquitina e do proteassomo pode substituir as funções essenciais desempenhadas pelas proteínas de choque térmico durante o estresse térmico. Estes resultados sugerem que o acúmulo de proteínas desnaturadas ou agregadas é a razão para a perda de viabilidade devido ao estresse térmico (Friant *et al.*, 2003).

A proteína Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) é uma das enzimas do metabolismo de carboidratos que teve seu gene induzido por choque térmico em *B. emersonii*. GAPDH é uma enzima que desempenha um importante papel na glicólise e na gliconeogênese. Interessantemente, a GAPDH apresenta também diversas outras funções não-glicolíticas e o seu papel na célula depende da sua localização subcelular. Por exemplo, a translocação da GAPDH para o núcleo age como um mecanismo de sinalização para a morte celular programada (Berry & Boulton, 2000). O acúmulo da GAPDH dentro do núcleo está envolvido na indução de apoptose, onde a GAPDH funciona como um ativador da transcrição, e sua presença está associada com a síntese de proteínas pró-apoptóticas, inclusive a própria GAPDH (Berry & Boulton, 2000). A proteína GAPDH ainda está envolvida na modulação do citoesqueleto, a atividade de fosfotransferase/quinase, a regulação de mRNA, a exportação de tRNA, a replicação e o reparo de DNA e a endocitose (Sirover, 1999). Como a GAPDH possui várias funções dentro da célula, é difícil sugerir o possível papel que esta proteína estaria desempenhando em resposta ao estresse térmico.

Genes que codificam proteínas com propriedades antioxidantes também foram induzidos por choque térmico tanto na germinação quanto na esporulação. Eles codificam as proteínas Glutationa-S transferase 1, 2 e 3, e as proteínas Tiorredoxina peroxidase e Peroxirredoxina. Em *S. pombe*, estes genes fazem parte da resposta geral a estresses ambientais (*core environmental stress response*) e apresentam-se induzidos em pelo menos quatro tipos diferentes de estresse (Chen *et al.*, 2003). Quatro GSTs diferentes são também induzidas em resposta ao choque térmico em *D. melanogaster* (Sorensen *et al.*, 2005).

3.3 - Análise da resposta de *B. emersonii* ao estresse por cádmio

Em relação à exposição a cádmio, observamos nos ensaios de microarranjos de DNA que 5,1% (191) dos genes presentes na lâmina foram induzidos em resposta a este estresse em *B. emersonii*. Estes genes codificam principalmente proteínas com propriedades antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, proteínas relacionadas com o transporte celular e proteínas relacionadas com o enovelamento de proteínas e proteólise.

Dentro da categoria metabolismo de aminoácidos destacam-se os genes codificando proteínas transportadoras de aminoácidos, incluindo um transportador de metionina de alta afinidade. É interessante notar que os genes que codificam transportadores de aminoácidos foram principalmente induzidos na fase de esporulação e em resposta ao tratamento com a concentração mais elevada de cádmio (200 μM). Genes codificando transportadores de aminoácidos foram também induzidos em *S. cerevisiae* e *S. pombe* em resposta ao cádmio, porém em numero bem menor do que o observado em *B. emersonii* (Fauchon *et al.,* 2002; Chen *et al.,* 2003).

Genes codificando proteínas envolvidas com a síntese de metionina também foram induzidos por cádmio. Estes genes correspondem às proteínas N5-metiltetraidropteroil-triglutamate-homocisteina metiltransferase e S-adenosilmetionina sintetase, que são as enzimas responsáveis respectivamente pela conversão de L-Homocisteína em L-metionina e deste último composto em S-adenosilmetionina. O metabólito S-adenosilmetionina é comumente convertido através de outras reações enzimáticas em cisteína, um dos aminoácidos necessários para a síntese de Glutationa (γ-Glu-Cys-Gly), uma das principais moléculas responsáveis pelo seqüestro de metais dentro das células (Lee *et al.,* 2006). Outro aminoácido necessário para a síntese de glutationa é o glutamato, e o gene codificando a proteína Carbamoil-fosfato sintase, que está envolvida na síntese deste aminoácido, foi também induzido pelo estresse por cádmio. Genes codificando proteínas envolvidas na síntese de aminoácidos sulfurosos e glutationa são comumente induzidos por este tipo de estresse em fungos (Vido *et al.,* 2001; Fauchon *et al.,* 2002; Chen *et al.,* 2003). Em *S. pombe*, estes genes são induzidos especificamente em resposta ao estresse por cádmio (Chen *et al.,* 2003). Em *B. emersonii*, nenhum dos genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos sulfurosos e glutationa foram induzidos em resposta ao choque térmico, sugerindo que assim como em *S. pombe*, eles fazem parte da resposta específica ao estresse por cádmio. Além dos genes codificando proteínas da via de síntese de aminoácidos sulfurosos, observamos o gene codificando uma Glutationa redutase induzido por cádmio nos experimentos de microarranjos de DNA. Esta proteína deve estar envolvida na reciclagem de glutationa, tornando-a disponível para as reações antioxidantes necessárias na célula.

O gene *cys* codificando uma Cistinosina, que também está envolvida no metabolismo de aminoácidos, foi um dos que apresentaram a maior indução entre os genes observados. Interessantemente, este gene foi induzido por cádmio apenas na germinação. Cistinosina é uma proteína transmembrana de lisossomo envolvida com a exportação de L-cistina para o citoplasma. Em células humanas que sofreram mutação no gene *cys*, os níveis de glutationa diminuem significativamente e outras vias de síntese de cisteína são requeridas, indicando que a exportação de cistina lisossomal é uma fonte natural de cisteína celular (Chol *et al.,* 2004). Desta forma, em resposta a cádmio haveria um aumento do transporte de cistina para o citoplasma que provavelmente seria direcionado para a síntese de metaloproteínas, como a proteína rica em resíduos de císteína SCRP, também induzida por cádmio em *B. emersonii*, além de glutationa.

Nesta análise de microarranjos de DNA, observamos também genes codificando uma proteína transportadora de zinco e proteínas de transporte do tipo ABC induzidos em resposta ao cádmio. Em *S. cerevisiae*, o cádmio é transportado para dentro da célula através de um transportador promíscuo de zinco (Zrt1) (Gomes *et al.,* 2002). Uma vez dentro da célula o cádmio se complexa com glutationa, e é transportado para vacúolos por uma proteína transportadora do tipo ABC (Ycf1) (Li *et al.,* 1997). A compartimentalização nos vacúolos parece ser o mais importante mecanismo de resistência a cádmio tanto em *S. cerevisiae* quanto em *S. pombe*, *Candida glabrata* e plantas (Mendoza-Cozatl *et al.,* 2005). Considerando os genes aqui observados como induzidos pelo estresse por cádmio, o modelo de destoxificação do cádmio proposto para outros fungos parece ser o mais provável de estar ocorrendo também em *B. emersonii*.

Assim como em outros organismos, a indução de genes codificando Hsps em resposta ao estresse por cádmio foi também observada em *B. emersonii*. Os genes *hsp* induzidos por cádmio codificam as proteínas Hsp100, Hsp90, Hsp60, Hsp70-3, Hsp70-2, Hsp10, Psi1 e uma das subunidades da chaperonina CCT. Em *S. cerevisiae* e *S. pombe*, genes de choque térmico também fazem parte dos genes comuns de resposta a estresses ambientais (Vido *et al.*, 2001; Causton *et al.,* 2001; Gasch *et al.,* 2000). O aumento nos níveis de mRNA dos genes *hsp90*, *hsp60* e *hsp10* em resposta ao tratamento com cádmio em *B. emersonii* já haviam sido anteriormente verificados através de ensaios de *Northern blot* (Pugliese, 2002). Em resposta a este estresse na fase de germinação os níveis dos mRNAs dos genes *hsp90*, *hsp60* e *hsp10* aumentam cerca de 20, 2,5 e 7 vezes, respectivamente (Pugliese, 2002).

Tem sido proposto que a toxicidade do cádmio depende da sua habilidade em formar complexos com o sistema antioxidante de defesa da célula, causando desta forma estresse oxidativo. Interessantemente, 9% dos genes induzidos em resposta a cádmio na esporulação fazem

parte da categoria de proteínas com propriedades antioxidantes. Na germinação esta porcentagem é ainda maior, alcançando 17% de todos os genes induzidos. Dentre os genes com propriedades antioxidantes induzidos em *B. emersonii* em resposta a cádmio destacam-se 6 genes codificando Glutationa S-transferases (GST) distintas, sendo que três destes genes (*gst* 1, 2 e 3) são também induzidos em resposta ao estresse por choque térmico. Genes codificando Glutationa S-transferases foram induzidos pelo estresse com cádmio também em *S. cerevisiae* e *S. pombe* (Vido *et al.,* 2001; Fauchon *et al.,* 2002; Bae & Chen, 2004). Porém, em nenhum destes organismos foi observada a indução de tantos genes diferentes de Glutationa S-transferases, que são enzimas detoxificadoras presentes em todos os organismos aeróbicos. Em *S. cerevisiae*, o complexo glutationa-cádmio parece ser o responsável pela regulação da entrada de cádmio na célula e acredita-se que Glutationa S-transferases são as proteínas responsáveis pela formação deste complexo (Gomes *et al.,* 2002; Adamis *et al.,* 2004). A ausência de uma das Glutationa S-transferases de *S. cerevisiae* leva a baixas concentrações deste complexo no citoplasma, resultando em uma maior absorção do metal (Adamis *et al.,* 2004). Vários outros genes codificando proteínas com propriedades antioxidantes como as oxidorredutases Glutationa peroxidase, Peroxirredoxina, Tiorredoxina peroxidase, Tioredoxina, NADPH oxidase, NADH dependente-flavina oxidoredutase e Quinona oxidoredutase também foram induzidos pelo estresse com cádmio.

Outro gene que foi bastante induzido pelo estresse com cádmio foi o que codifica uma Pirina, uma proteína altamente conservada desde bactérias até mamíferos que está envolvida em uma variedade de processos biológicos. A Pirina foi descrita em mamíferos como um cofator de transcrição e está relacionada com apoptose (Dechend *et al.,* 1999). Em plantas, esta proteína parece estar relacionada também com apoptose, pois em tomate (*Lycopersicon esculentum*) os níveis do mRNA da Pirina apresentam-se consideravelmente aumentados em células induzidas à morte celular programada (Orzaez *et al.,* 2001). Entretanto, esta não parece ser sua única função em plantas, uma vez que foi observado que a Pirina também regula a germinação de sementes e os estágios iniciais do desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana* (Lapik & Kaufman, 2003). Em procariotos (*Synechocystis sp.*), foi verificado que o operon *pirAB* é induzido sob condições de estresse, tais como altas concentrações de NaCl, etanol e sorbitol (Hihara *et al.,* 2004). Embora genes codificando a Pirina existam em fungos, até o momento não há nenhuma descrição do possível papel desta proteína nestes organismos. Como o cádmio é um indutor de apoptose em plantas e mamíferos, o fato de este gene ser altamente induzido em resposta a cádmio, sugere que a Pirina tenha sua função relacionada com apoptose em *B. emersonii*.

Outra evidência de que o cádmio estaria induzindo a apoptose em *B. emersonii,* foi a indução de seis diferentes genes codificando Metacaspases ou proteínas com domínio de caspase. Em humanos, o cádmio é capaz de induzir apoptose através da modulação da atividade de caspases, da via ROS (espécies reativas de oxigênio) e outras proteínas de sinalização intracelular (Shimoda *et al.,* 2001; McAleer & Tuan, 2001; Beyersmann & Hechtenberg, 1997). Caspases são cisteíno-proteases essenciais para apoptose e estão divididas em duas famílias: as Metacaspases, que são encontradas em plantas, fungos e protozoa, e as Paracaspases, que são observadas em metazoa e *Dictyostelium* (Uren *et al.,* 2000). Embora o cádmio não seja um metal de transição e por isso não se acredita que ele seja capaz de interferir diretamente no metabolismo do oxigênio celular, ele pode indiretamente contribuir para o estresse oxidativo devido à depleção de glutationa e de enzimas protetoras (Schutzendubel & Polle, 2002). Desta forma, o cádmio poderia propiciar em *B. emersonii* a formação de ROS, e conseqüentemente induzir apoptose. Em levedura, apoptose pode ser induzida pela depleção de glutationa ou por doses baixas de H_2O_2, indicando que assim como em metazoa, espécies reativas de oxigênio (ROS) são os reguladores de apoptose neste organismo (Madeo *et al.,* 1999).

De posse dos dados gerados pelos ensaios de microarranjos podemos sugerir, de uma maneira geral, o mecanismo da resposta de *B. emersonii* ao estresse por cádmio. Assim como em outros fungos, o cádmio extracelular seria transportado para dentro da célula por um transportador de metais (no caso um transportador de zinco, que é da mesma família que cádmio). Uma vez internalizado, o cádmio seria quelado por glutationa ou metaloproteínas e seria direcionado para o vacúolo por um transportador do tipo ABC. Para aumentar a síntese de glutationa, bem como de metaloproteínas, *B. emersonii* induziria os genes relacionados com a síntese dos aminoácidos cisteína e glutamato. O cádmio então promoveria a depleção das moléculas antioxidantes responsáveis pela manutenção do estado redox da célula (glutationa e metaloproteínas), aumentando as ROS e induzindo apoptose.

Ao todo 30 genes foram induzidos tanto pelo tratamento com cádmio como pelo choque térmico em *B. emersonii*. Estes genes possivelmente fazem parte da resposta central de *B. emersonii* a estresses ambientais. Os genes induzidos em resposta a ambos os estresses em *B. emersonii* codificam proteínas de choque térmico, como Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 e Hsp10, além de proteínas com propriedades antioxidantes como Glutationa S-transferases, Peroxirredoxinas e Tiorredoxina peroxidases. Proteínas de choque térmico, bem como proteínas com propriedades antioxidantes são comumente induzidas em resposta a variados tipos de estresses e fazem parte da resposta central a estresses ambientais (Gasch *et al.,* 2000; Causton *et al.,* 2001; Chen *et al.,* 2003). Um

outro gene interessante que foi induzido tanto pelo estresse com cádmio quanto pelo choque térmico foi o que codifica uma proteína de resposta universal a estresses (USP). A proteína USP é induzida em resposta a uma variedade de estresses, porém não possui ainda sua função caracterizada (Nystrom & Neidhardt, 1994).

Cerca de 30% dos genes induzidos tanto por choque térmico quanto por cádmio em *B. emersonii* não têm uma função putativa identificada (categoria *unknown*). Desta forma, esta análise permitiu uma caracterização inicial destes genes, uma vez que eles foram induzidos em ambos estresses e devem ter sua função relacionada com a resposta a choque térmico e a cádmio.

Os dados obtidos nos microarranjos de DNA foram validados por experimentos de RT-PCR quantitativo e em 100% dos casos houve uma coincidência qualitativa entre os dados dos microarranjos e os dados de RT-PCR em tempo real, indicando que as conclusões obtidas são confiáveis.

4 – Proteínas da família Hsp70 de *Blastocladiella emersonii*

Proteínas Hsp70 atuam em vários processos celulares, incluindo enovelamento de proteínas, associação e dissociação de oligômeros, translocação de proteínas através de membranas e regulação da resposta ao choque térmico. Para ser capaz de desempenhar todas estas funções, os genomas eucarióticos codificam múltiplas proteínas Hsp70 (Gething & Sambrook, 1992; Mager & Ferreira, 1993). A presença de múltiplos membros da família Hsp70 tem sido descrita em organismos fúngicos como os ascomicetos *S. cerevisiae*, *N. crassa* e *S. pombe* (Craig *et al.,* 1993; Rensing *et al.,* 1998; Chung *et al.,* 1998). No entanto, pouca informação sobre genes *hsp70* em fungos primitivos está disponível. Particularmente, no quitridiomiceto *B. emersonii*, apenas um gene codificando uma proteína Hsp70 havia sido descrito anteriormente (Stefani & Gomes, 1995).

Durante este trabalho, seqüenciamos várias ESTs de *B. emersonii* codificando 10 diferentes proteínas Hsp70 putativas. Destes cDNAs, cinco contêm a seqüência deduzida de aminoácidos completa das proteínas, enquanto o restante representa seqüências parciais, codificando ou a região N-terminal ou a região C-terminal da proteína. Como esperado, um destes cDNAs corresponde ao gene *hsp70* previamente caracterizado por Stefani & Gomes (1995), que foi denominado *hsp70-1*.

A análise da seqüência de aminoácidos da família Hsp70 de *B. emersonii* sugere que este fungo possui pelo menos três representantes citoplasmáticos da família Hsp70 (Hsp70-1, Hsp70-3 e Hsp70-6), dois de retículo endoplasmático (Hsp70-7 e Hsp70-8) e um de mitocôndria (Hsp70-9). Análises filogenéticas indicam que eventos moleculares e celulares ancestrais deram origem à pelo menos quatro grupos monofiléticos de proteínas Hsp70 eucarióticas. Cada grupo evolutivamente

similar da Hsp70 compartilha uma localização intracelular comum e supostamente são homólogos funcionais, como as proteínas Hsp70 dos compartimentos celulares citados acima e de cloroplastos (Boorstein *et al.*, 1994).

As seqüências deduzidas de aminoácidos das proteínas Hsp70-1 e Hsp70-3 apresentaram as assinaturas de proteínas Hsp70 citoplasmáticas de eucariotos, e alta similaridade de seqüência com as subfamílias Ssa e Ssb de *S. cerevisiae*, respectivamente. Estas observações, em conjunto com a análise filogenética indicam que estas chaperones desempenham seu papel no compartimento citoplasmático da célula. A proteína Hsp70-6 também apresenta similaridade com a subfamília citoplasmática Ssa. Apesar da mesma localização putativa das proteínas Hsp70-1, Hsp70-3 e Hsp70-6, e sua similaridade de seqüência, estas proteínas podem desempenhar diferentes funções dentro da célula. O estudo da subfamília Ssa mostra uma sobreposição funcional entre seus membros, no entanto também existem evidências que estas proteínas não são funcionalmente idênticas (Craig *et al.*, 1993). É como se cada proteína Ssa fosse otimizada para uma atividade específica na célula, e que os outros membros possuem a habilidade parcial de substituir uma a outra. Esta idéia é consistente com a observação de que Ssa3 e Ssa4 podem manter a viabilidade de uma cepa Δ*ssa1*Δ*ssa2*, mas não são capazes de suprimir completamente o fenótipo de sensibilidade à temperatura, mesmo quando superexpressas (Craig *et al.*, 1993).

Além disso, a presença ou não das repetições GGMP e do motivo EEVD, encontrados apenas na proteína Hsp70-1, pode explicar porque proteínas Hsp70 similares podem desempenhar diferentes funções. Estas assinaturas são encontradas em algumas Hsp70 citoplasmáticas de eucariotos na extremidade C-terminal, enquanto outros membros da família Hsp70 não possuem tais elementos estruturais. Desta forma, parece que a extremidade C-terminal de uma chaperone possui a capacidade de se ligar a diferentes cofatores, e é um domínio variável que pode determinar a especificidade funcional de proteínas Hsp70 individuais (Demand *et al.*, 1998).

O gene *hsp70-3* mostrou ser o membro da família *hsp70* de *B. emersonii* mais altamente expresso em condições fisiológicas normais. Este gene apresentou altos níveis de mRNA durante a germinação e o início da esporulação, mas não apresentou indução quando as células de *B. emersonii* foram submetidas a choque térmico. As proteínas da subfamília Ssb, com a qual a proteína Hsp70-3 apresentou a mais alta similaridade, estão entre as proteínas celulares mais abundantes de *S. cerevisiae* e parecem desempenhar seu papel na síntese protéica, pois foi observado que até 73% do conteúdo celular de Ssb está associado com os ribossomos (Craig *et al.*, 1993). O gene *hsp70-1*, que parece pertencer à subfamília Ssa, não é altamente expresso em *B. emersonii* em condições fisiológicas, no entanto nossos dados sugerem que este gene apresenta os

níveis mais altos de mRNA durante o estresse térmico. No choque térmico, os níveis de seu transcrito aumentam cerca de três vezes em células de germinação e cerca de duas vezes em células de esporulação. As proteínas Ssa em *S. cerevisiae* atuam na translocação de proteínas para organelas e na regulação da resposta ao choque térmico, e exceto pelo gene *ssa2*, todos os outros genes *ssa* são altamente induzidos por choque térmico (Craig *et al.,* 1993).

A seqüência deduzida da proteína Hsp70-6 foi a mais divergente entre todas as proteínas Hsp70 putativas de *B. emersonii.* Em relação aos níveis do seu mRNA, observou-se quantidade significativa apenas durante a esporulação em condições fisiológicas. Interessantemente, o gene *hsp70-6* não apresentou indução por choque térmico e seu homólogo em *S. cerevisiae*, também apresenta o mesmo comportamento (Werner-Washburne *et al.,* 1989).

Embora tenhamos observado apenas cDNAs incompletos para os genes *hsp70-2* e *hsp70-5*, ambas as seqüências deduzidas de aminoácidos apresentaram similaridade com a subfamília Sse de *S. cerevisiae*. Esta subfamília é composta por dois membros que apresentam similaridade com a proteína Hsp110, um membro citoplasmático divergente da família Hsp70. A proteína Hsp110 é significativamente maior do que outras Hsp70 e *in vivo* funciona através de um mecanismo diferente do observado para outras Hsp70 (Shaner *et al.,* 2004). No entanto, estudos recentes sugerem que a Hsp110 atua em conjunto com as proteínas Hsp70 Ssa ou Ssb formando complexos heterodiméricos, e esta cooperação é necessária para as funções celulares destas Hsp70 (Shaner *et al.*, 2005).

Uma das proteínas Hsp70 mais extensivamente estudadas é a proteína de retículo endoplasmático BiP (Steel *et al.,* 2004). Proteínas homólogas a BiP têm sido observadas em todos os organismos eucariotos analisados até o momento e inclui a proteína Kar2 de levedura (Craven *et al.,* 1997). Dois cDNAs (*hsp70-7* e *hsp70-8*) codificando diferentes proteínas Hsp70 que se localizam possivelmente no retículo endoplasmático foram observados em *B. emersonii*. Ambas apresentaram similaridade com a mesma proteína de levedura, Kar2. A seqüência da proteína deduzida Hsp70-7 apresentou-se quase completa e foi usada na construção da árvore filogenética. Ela se agrupou junto com o grupo de Hsp70 de retículo endoplasmático, como esperado. Além de Kar2, *S. cerevisiae* possui outra proteína Hsp70 que se localiza no retículo endoplasmático, que é denominada Lhs. No entanto, Lhs pertence a mais divergente subfamília da Hsp70 e possui baixa similaridade de seqüência com a proteína Kar2 (Craven *et al.,* 1997). Evidências sugerem que Kar2 e Lhs atuam conjuntamente no correto processamento do substrato através da coordenação da ligação e liberação de diferentes regiões do mesmo polipeptídeo desenovelado (Steel *et al.,* 2004). Embora *B. emersonii* possivelmente possua duas proteínas Hsp70 localizadas no retículo

endoplasmático, que poderiam estar atuando conjuntamente neste compartimento celular, nenhuma delas apresenta similaridade significativa com a proteína Lhs.

Os genes *hsp70-7* e *hsp70-8* apresentaram um padrão de expressão similar durante o desenvolvimento de *B. emersonii*, com os níveis de mRNA mais elevados aos 120 min da germinação. Tanto o gene *bip* de *N. crassa* quanto o gene *kar2* de *S. cerevisiae* são induzidos por choque térmico, assim como os genes *hsp70-7* e *hsp70-8* de *B. emersonii* (Rensing *et al.,* 1998; Craig *et al.,* 1993). Além disso, Rose e colaboradores (1989) observaram que o gene *bip* é induzido após o acúmulo de proteínas desnaturadas e mal enoveladas dentro do retículo endoplasmático, que é a condição esperada após a exposição a temperaturas elevadas.

A proteína deduzida codificada pelo gene *hsp70-10* não apresentou similaridade com nenhum outro membro da família Hsp70 de *S. cerevisiae*, mas apresentou similaridade significativa com proteínas Hsp70 de outros fungos. No entanto, seus melhores alinhamentos contra o banco de dados do NCBI foram com proteínas Hsp70-12 de vertebrados. A proteína Hsp70-4 putativa também apresentou similaridade com a proteína Hsp70-12 de vertebrados, porém, não se observou similaridade com proteínas de fungos neste caso. A proteína Hsp70-12A de humanos é encontrada em lesões da aorta e parece conter um domínio de ATPase atípico, sendo mais similar à Hsp70 de eucariotos primitivos e de procariotos do que a Hsp70 de outros mamíferos (Han *et al.,* 2003). Acredita-se que esta proteína é um membro distante da família Hsp70 de mamíferos, o que pode explicar a alta similaridade de seqüência das proteínas Hsp70-10 e Hsp70-4 com esta proteína de humanos. O gene *hsp70-10* apresentou os níveis mais baixos observados durante o desenvolvimento de *B. emersonii* e mostrou indução apenas nos primeiros 30 min de tratamento com choque térmico durante a germinação, alcançando níveis indetectáveis após esse período. Já o gene *hsp70-4* não apresentou níveis detectáveis de mRNA em qualquer uma das condições analisadas, indicando que seu nível de expressão é muito baixo.

Proteínas Hsp70 mitocôndriais (mtHsp70) são necessárias para o transporte de proteínas através da membrana mitocondrial e atuam interagindo diretamente com as proteínas a serem transportadas (Craig *et al.,* 1993). Em nossas análises identificamos apenas o gene *hsp70-9* codificando uma possível Hsp70 mitocôndrial, que é homóloga à proteína Ssc1 de *S. cerevisiae*. Três mtHsp70 foram descritas em *S. cerevisiae*: Ssc1, Ssc3 e Ssz1. No entanto, Ssc1 é a mais abundante e a mais importante dentro da mitocôndria, pois a deleção do gene *ssc1* é letal para a célula (Craig *et al.,* 1987). O mRNA do gene *hsp70-9* foi detectado durante a esporulação e a germinação, o que é consistente com uma importante função na mitocôndria, sendo que seu nível mais alto em temperatura fisiológica foi observado durante a germinação. Após o tratamento com choque

térmico, o gene *hsp70-9* foi induzido cerca de seis vezes durante a germinação e três vezes durante a esporulação. Em *S. cerevisiae*, o gene *ssc1* também apresenta uma alta indução durante o choque térmico (Craig *et al.,* 1993).

Nossos resultados mostraram que o padrão de expressão dos genes *hsp70* de *B. emersonii* varia dependendo do estágio de desenvolvimento do fungo. Além disso, foi previamente descrito que a resposta ao choque térmico é regulada durante o desenvolvimento deste fungo (Bonato *et al.,* 1987). No geral, parece que processos de diferenciação em fungos, como a formação de esporos e germinação, podem alterar fortemente a expressão constitutiva ou a indutibilidade de genes de estresse (Rensing *et al.,* 1998). Os ciclos de desenvolvimento em fungos são freqüentemente controlados por fatores de estresse (carência de nutrientes, luz, temperatura, umidade) que alteram os sinais intracelulares. De fato, a expressão de genes de choque térmico pode ser influenciada diretamente ou indiretamente por mudanças nos níveis de mensageiros secundários, como o cAMP (Rensing *et al.,* 1998). Em *S. cerevisiae*, a expressão de vários genes de estresse parece ser regulada pelos níveis de cAMP, como por exemplo o gene *ssa3* da família das Hsp70 (Rensing *et al.,* 1998).

Interessantemente, observamos que os níveis de mRNA dos genes *hsp70* são maiores durante a germinação do que durante a esporulação em condições fisiológicas. Como previamente mostrado, as células de *B. emersonii* apresentam uma maior diversidade de transcritos no estágio de esporulação do que durante a germinação (Ribichich *et al.,* 2005). Esta observação está de acordo com a alta taxa de mudança nos mRNAs durante o estágio de esporulação (Johnson & Lovett, 1984; Silva *et al.,* 1987a). Além disso, células da germinação apresentam um número maior de transcritos que são altamente abundantes, e que correspondem em parte a mRNAs relacionados com a síntese de proteínas (Ribichich *et al.,* 2005). Desta forma, os níveis elevados de mRNAs de genes *hsp70* durante a germinação, podem estar correlacionados com o correto enovelamento de uma grande quantidade de proteínas que estão sendo sintetizadas durante este estágio.

5 – Caracterização da Hsp17

As proteínas de choque térmico de pequeno peso molecular (*small* HSP) representam uma família de proteínas de estresse presente em vários organismos, desde bactérias até mamíferos. Estas proteínas são agrupadas com base em seu baixo peso molecular (entre 15 e 40 kDa) e em regiões de similaridade de seqüência principalmente na região C-terminal das proteínas (domínio α-cristalino). Em comparação as outras famílias de Hsp, a similaridade total entre as sHsps é consideravelmente menor. O número de sHsps nos organismos varia bastante, sendo as plantas os organismos que possuem o maior número observado, cerca de 30 sHsps diferentes (Haslbeck,

2002). As proteínas sHsps funcionam ligando-se a proteínas inativadas pela desnaturação térmica e mantendo-as em um estado solúvel e competente para o enovelamento. As proteínas desenoveladas são liberadas das sHsps após o término do estresse, provavelmente pela ação de chaperones dependentes de ATP, como a Hsp70 e a Hsp90, e são posteriormente re-enoveladas por estas mesmas chaperones (Sun & MacRae, 2005).

Dentre os genes observados no programa de seqüenciamento de ESTs das bibliotecas de estresse, o gene *hsp17*, que codifica uma sHsp, foi o que apresentou a maior abundância de ESTs. Foram seqüenciadas no total 167 ESTs, que correspondem a 2,63% de todas as ESTs seqüenciadas neste trabalho. A grande maioria destas ESTs foi obtida durante o seqüenciamento de clones da biblioteca HSR, indicando que a proteína codificada pelo gene *hsp17* é importante na resposta ao estresse térmico em *B. emersonii*. A abundância de sHsps varia consideravelmente dependendo do tipo celular e organismo estudado e, sob condições de estresse, as sHsps podem compreender mais do que 1% de todas as proteínas celulares (Niwa *et al.,* 2000).

O cDNA correspondente à proteína Hsp17 apresentou 686 pb, sendo que destes, 45 fazem parte da região 5′ UTR e 131 compreendem a região 3′ UTR. A proteína Hsp17 putativa de *B. emersonii* possui 169 aminoácidos, uma massa molecular calculada de aproximadamente 18 kDa e um pI teórico de 7,3. Através de ensaios de *Southern blot* utilizando o DNA genômico do fungo verificamos que o gene *hsp17* está presente em cópia única no genoma de *B. emersonii.* No entanto, outros genes codificando proteínas da família sHsp foram observados em *B. emersoni*, como os genes *hsp16*, *hsp20* e *hsp30*.

Com o intuito de verificar os níveis de expressão do mRNA da Hsp17, durante o ciclo de vida de *B. emersonii* e durante o choque térmico, ensaios de *Northern blot* foram realizados. O mRNA do gene *hsp17* apresentou baixos níveis de expressão durante o ciclo, tanto na fase de esporulação quanto na fase de germinação. No entanto, aos 60 e 90 minutos da esporulação percebe-se um aumento nos níveis do mRNA que não são observados na germinação. Durante o choque térmico ocorre um aumento transiente dos níveis do transcrito do gene *hsp*17, sendo bastante elevado nos primeiros 30 minutos e decaindo ao longo do tempo, mas permanecendo ainda muito alto quando comparados com os níveis no mesmo tempo do ciclo a 27ºC. Em resumo, os níveis do mRNA da proteína Hsp17 apresentaram-se quase indetectáveis durante o ciclo de vida de *B. emersonii*, indicando que nestas condições a proteína Hsp17 não deve ser necessária. Porém, em células submetidas ao choque térmico ocorre um grande aumento nos níveis do mRNA da Hsp17, sugerindo que esta proteína é muito importante para a resposta ao choque térmico em *B. emersonii*. Sob condições fisiológicas, a abundância de sHsps varia de acordo com o tipo celular e o

organismo estudado. Em humanos, os níveis de sHsps em diferentes tipos celulares variam desde praticamente ausente a 1% da proteína total da célula, como no caso da Hsp20 de músculo, coração e células de diafragma (Niwa *et al.*, 2000; Sugiyama *et al.*, 2000). Estudos da expressão de sHsps sob condições de choque térmico e outras condições de estresse têm mostrado que este grupo de Hsps está entre as proteínas de choque térmico cuja síntese mais aumenta durante o estresse (Haslbeck, 2002), assim como foi observado em *B. emersonii*. Em *S. cerevisiae*, a proteína Hsp26 está ausente em células vegetativas não estressadas e é fortemente induzida pelo choque térmico, pela entrada na fase estacionária, ausência de nitrogênio e choque salino (Carmelo & Sa-Correia, 1997).

A análise filogenética da seqüência de aminoácidos da proteína Hsp17 de *B. emersonii* indicou que esta proteína apresenta mais similaridade de seqüência com proteínas citoplasmáticas da família sHsp de plantas. Além disso, quando a proteína Hsp17 de *B. emersonii* foi alinhada com proteínas presentes no banco de dados do GenBank, os primeiros alinhamentos foram apenas com sHsps de plantas. As sHsps de plantas são codificadas por genes nucleares e são divididas em seis classes: três classes de sHsps são localizadas no citoplasma ou no núcleo e as outras três nos plastídeos, retículo endoplasmático e mitocôndria. A família sHsp de plantas é caracterizada por uma abundância e diversidade de sHsps não usuais e por uma alta indução de seus membros em condições de estresse (Sun *et al.*, 2002).

A proteína Hsp17 apresentou o mesmo padrão de acúmulo encontrado na análise do seu mRNA, com níveis baixos durante a germinação e a esporulação de *B. emersonii* em condições fisiológicas. No entanto, quando as células foram submetidas a choque térmico, em qualquer um dos estágios de desenvolvimento do fungo, a proteína Hsp17 apresentou níveis bem altos, que permaneceram elevados durante todo o período analisado de exposição à alta temperatura. Bonato e colaboradores (1987) já haviam verificado, pelo uso de géis bidimensionais, a alta síntese de uma proteína de aproximadamente 17 kDa, quando as células de *B. emersonii* eram submetidas ao choque térmico, tanto na germinação quanto na esporulação. O aumento nos níveis de mRNA da Hsp17 após o tratamento a temperaturas elevadas, reflete em um aumento na quantidade da proteína Hsp17, indicando que o controle da expressão deste gene é transcricional.

6 – Análise de seqüências intrônicas presentes nas ESTs provenientes das bibliotecas de cDNA de estresse.

A observação de que a exposição de células de levedura a altas temperaturas como 41°C provocava a inibição de mais de 70% no processamento do íntron no mRNA da actina, parecia explicar porque os primeiros genes codificando proteínas de choque térmico, caracterizados em

eucariotos, não apresentavam íntrons (Yost & Lindquist, 1991). Entretanto, logo depois começaram a ser caracterizados genes de Hsps contendo íntrons, como o gene da Hsp70 de *B. emersonii,* que na temperatura letal de 42°C apresentou inibição parcial do processamento do seu íntron, sendo que 30% dos mRNAs encontravam-se na forma não processada nesta condição (Stefani & Gomes, 1995). A inibição parcial do processamento do íntron do gene *hsp70-1* em *Blastocladiella*, indicava que a maquinaria de *splicing* do fungo parecia ser bastante resistente à exposição a altas temperaturas. Mais tarde observou-se também a inibição do processamento do íntron do gene *hsp70-1* em células tratadas com cádmio (Stefani & Gomes, dados não publicados). Portanto, em condições de estresse parece ocorrer alteração no funcionamento da maquinaria de retirada dos íntrons, promovendo uma menor eficiência no processamento das seqüências intrônicas presentes nos RNAs.

De acordo com estas observações, verificamos um enriquecimento de ESTs com seqüências intrônicas putativas entre as ESTs provenientes das bibliotecas originadas a partir de RNA de células de *B. emersonii* submetidas a estresses. Interessantemente, uma das ESTs que apresentou seqüência intrônica correspondeu ao gene *hsp70-1,* e o tamanho do íntron, bem como as seqüências de nucleotídeos nas junções de *splicing* eram exatamente iguais às descritas por Stefani & Gomes (1995), validando o nosso método de busca por íntrons. Em 39% dos casos (33 genes) em que foram seqüenciadas ESTs não processadas das bibliotecas HSR, CDM e CDC, também foram seqüenciadas ESTs provenientes destas bibliotecas que correspondiam ao mesmo mRNA, porém corretamente processado, o que facilitou a confirmação das extremidades dos íntrons.

Os genes de fungos são comumente interrompidos por poucos íntrons, quando se compara com os genes de metazoa. A densidade de íntrons em fungos varia de cinco a seis íntrons por gene em basidiomicetos como *Cryptococcus neoformans* (Loftus *et al.,* 2005), de um a dois íntrons por gene em média para os ascomicetos seqüenciados recentemente (por exemplo, *Neurospora* e *Magnaporthe*) (Galagan *et al.,* 2003; Borkovich *et al.,* 2004; Dean *et al.,* 2005) e menos do que 300 íntrons no total do genoma da levedura *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.,* 1996). Íntrons são tipicamente pequenos em fungos, possuindo em média entre 80 a 150 pb na maioria dos ascomicetos. O basidiomiceto *C. neoformans* é uma exceção, possuindo uma média de tamanho de íntrons de 68 pb, com vários íntrons menores do que 35 pb. Em *B. emersonii*, a maioria dos íntrons encontrados tiveram seu tamanho variando entre 50 e 80 pb, sendo que o menor íntron observado foi de 53 pb e o maior de 333 pb. Além disso, cerca de 22% dos genes analisados apresentaram dois ou três íntrons, uma média de íntrons/gene mais próxima à dos fungos ascomicetos.

Na maioria dos casos, as seqüências dos íntrons seguiram a seqüência canônica das junções de *splicing* (5′ GT – AG 3′) e a seqüência consenso do sítio de ramificação, descrito para *B. emersonii*

(PuCTNAC) (Fietto, 2001). É interessante notar que para a maioria dos genes de choque térmico, incluindo o *hsp70-1*, foram seqüenciadas ESTs com íntrons apenas nas bibliotecas de cDNA de células de *B. emersonii* submetidas ao tratamento com cádmio, indicando que durante a reposta ao choque térmico a 38°C ocorre um controle maior do correto processamento dos íntrons nestes genes, como anteriormente verificado para o gene *hsp70-1* (Stefani & Gomes, 1995).

Todos os genes de *B. emersonii* que haviam sido caracterizados anteriormente apresentaram íntrons. Estes genes codificam as proteínas Hsp70-1 (1 íntron), Hsp90 (1 íntron), Calmodulina (3 íntrons), a subunidade catalítica C (3 íntrons) e a regulatória R (2 íntrons) da proteína quinase A, as ATPases do tipo P: BePAT1 (1 íntron) e BePAT2 (2 íntrons), e as subunidades da peptidase processadora mitocondrial: βMPP (1 íntron) e αMPP (1 íntron). O tamanho destes íntrons varia de 59 pb a 407 pb (Stefani & Gomes, 1995; Pugliese *et al.*, 2006; Simão & Gomes, 2001; Marques & Gomes, 1992; Oliveira *et al.*, 1994; Rocha & Gomes, 1998; Rocha & Gomes, 1999; Souza & Gomes, 1998; Fietto *et al.*, 2002).

Em milho (*Zea mays*), o gene *bz2* codifica uma Glutationa S-transferase altamente induzida por metais pesados como o cádmio. O tratamento com cádmio de sementes de milho resulta em um aumento de 20 vezes no mensageiro de *bz2*, e interessantemente, um aumento de 50 vezes no transcrito não processado (Marrs & Walbot, 1997). Em *B. emersonii,* sequenciamos ESTs de vários genes que foram induzidos por estresse nas análises de microarranjos de DNA que possuíam seqüências intrônicas. Entre eles encontram-se ESTs codificando a proteína Pirina, as Glutationa S-transferases 1 e 2, a Peroxirredoxina, a Glutationa peroxidase 3, uma *Putative elicitor responsive protein*, uma metiltransferase dependente de SAM, além das proteínas de choque térmico Hsp60, Hsp17 e Hsp30.

Uma análise mais detalhada foi feita para o RNA mensageiro do gene *gpx3* após tratamento com cádmio e choque térmico, utilizando ensaios de *Northern blot*. Observou-se que após o tratamento das células com cádmio ocorreu um aumento dos níveis do mRNA do transcrito não processado (1,0 kb) em relação ao transcrito processado (0,7 kb). Além disso, a inibição do processamento do íntron pareceu ser dependente da concentração de cádmio utilizada, pois em células tratadas com 100 μM $CdCl_2$ observou-se um aumento maior dos níveis do mensageiro não processado e uma diminuição dos níveis do transcrito processado, enquanto esta proporção foi invertida quando as células foram tratadas com uma concentração mais baixa de cádmio (50 μM $CdCl_2$).

Em conclusão, mostramos que bibliotecas de estresse são importantes não somente na identificação de genes induzidos por exposição a diferentes condições ambientais, mas também podem ser úteis na identificação da presença de íntrons nesses genes.

VI – CONCLUSÕES

- Foram seqüenciadas 6350 ESTs do fungo *B. emersonii*, originadas de bibliotecas de cDNA de estresse, que representam 2326 *unigenes* putativos, dos quais 1282 foram classificados segundo o GO em processos biológicos, funções moleculares e compartimentos celulares. Cerca de 51% dos *unigenes* seqüenciados neste trabalho não haviam ainda sido descritos anteriormente neste fungo e representam uma valiosa contribuição para o projeto total de seqüenciamento de ESTs de *B. emersonii*.
- Neste trabalho identificamos 78 *unigenes* codificando chaperones moleculares e proteínas relacionadas em *B. emersonii*. Estes *unigenes* codificam proteínas de todas as famílias de chaperones conhecidas (Hsp100, Hsp90, Hsp60, Hsp10, Hsp70, sHsp, Ciclofilina, PPIase).
- Mostramos que o choque térmico assim como o tratamento com cádmio atrasa a germinação e a esporulação de *B. emersonii*. No estresse por cádmio, entretanto, as células de *B. emersonii* demoram mais para se recuperar e voltar a crescer ou esporular, indicando que o cádmio, nas concentrações utilizadas, é um estresse mais severo para este fungo do que o choque térmico.
- Na análise de microarranjos de DNA de células submetidas a choque térmico, observamos dentre os genes induzidos um grande número de genes que codificam proteínas relacionadas com o enovelamento de proteínas e com a proteólise, conforme esperado, bem como genes que codificam proteínas com propriedades antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de nucleotídeos e no metabolismo de carboidratos.
- Os genes induzidos por cádmio nos microarranjos de DNA codificam principalmente proteínas com propriedades antioxidantes, proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos, proteínas relacionadas com o transporte celular e proteínas envolvidas no enovelamento de proteínas e proteólise. Dentre as proteínas com propriedades antioxidantes destacam-se seis genes codificando diferentes Glutationa S-transferases, e na categoria de enovelamento de proteínas e proteólise seis genes codificando diferentes Metacaspases.
- A indução de genes codificando proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas durante os estresses analisados permitiu uma caracterização inicial do possível papel destes genes no fungo.
- Este trabalho oferece importantes informações sobre a família Hsp70 de *B. emersonii*, que possui pelo menos dez genes parálogos desta família, sendo nove deles expressos em pelo menos um dos estágios do desenvolvimento do fungo. Além disso, sete genes *hsp70* de *B. emersonii* apresentam uma indução significativa após a exposição a altas temperaturas, sugerindo que estes genes

desempenham um papel importante durante o desenvolvimento e em resposta ao choque térmico neste fungo.

- O gene *hsp17* é pouco expresso durante o ciclo de vida de *B. emersonii*, porém, é altamente induzido por choque térmico em qualquer estágio do desenvolvimento do fungo. O aumento nos níveis do mRNA da Hsp17 após o choque térmico, é acompanhado por um aumento na quantidade da proteína Hsp17, indicando que o controle da expressão deste gene ocorre em nível transcricional.

- O estresse por cádmio e por choque térmico prejudicou o processamento dos íntrons em *B. emersonii*, permitindo a observação de várias seqüências intrônicas entre as ESTs seqüenciadas das bibliotecas de estresse. As seqüências de nucleotídeos das junções de *splicing* bem como do sítio de ramificação dos íntrons seguiram, com grande conservação, o consenso proposto para essas regiões.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamis, P.D., Gomes, D.S., Pinto, M.L., Panek, A.D., Eleutherio, E.C. 2004. The role of glutathione transferases in cadmium stress. *Toxicol Lett*. **154**(1-2):81-8.

Adams, M.D., Kelley, J.M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeropoulos, M.H., Xiao, H., Merril, C.R., Wu, A., Olde, B., Moreno, R.F., *et al*. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. **252**(5013):1651-6.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*. **25**(17):3389-402.

Amin, J., Goldberg, A.L., Voelmy, R. 1988. Key features of heat shock regulatory elements. *J. Mol. Biol*. **215**:403-410.

Ashburner, M. The gene ontology consortium. 2000. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. **25**:25-29.

Audic, S., Claverie, J.M. 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*. **7**(10):986-95.

Austin, R., Provart, N.J., Sacadura, N.T., Nugent, K.G., Babu, M., Saville, B.J. 2004. A comparative genomic analysis of ESTs from *Ustilago maydis*. *Funct Integr Genomics*. **4**(4):207-18.

Aviv, H. and Leder, P. 1972. Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69**: 14-1412.

Bae, W., Chen, X. 2004. Proteomic study for the cellular responses to Cd^{2+} in *Schizosaccharomyces pombe* through amino acid-coded mass tagging and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. **3**(6):596-607.

Bagga, S., Hu, G., Screen, S. E., St Leger, R. J. 2004. Reconstructing the diversification of subtilisins in the pathogenic fungus *Metarhizium anisopliae. Gene*. **324**: 159-69.

Baldrian, P. 2003. Interactions of heavy metals with white rot fungi. *Enzyme Microb. Tech*. **32**:78-91.

Becker, J., Craig, E.A. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur. J. Biochem*. **219**:11-23.

Beckman, R.P., Mizzen, L.A., Welch, W.J. 1990. Interaction of Hsp70 with newly synthetized proteins: Implications for protein folding and assembly. *Science.* **248**:850-4.

Berk, A.J., Sharp, P.A. 1977. Sizing and maping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digest hybrids. *Cell* **12**:721-732.

Berry, M.D., Boulton, A.A. 2000. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis. *J Neurosci Res*. **15**:150-4.

Bevan, M., Bancroft, I., Bent, E., Love, K., Goodman, H., Dean, C., Bergkamp, R., Dirkse, W., Van Staveren, M., Stiekema, W., Drost, L., Ridley, P., Hudson, S.A., Patel, K., Murphy, G., Piffanelli, P., Wedler, H., Wedler, E., Wambutt, R., Weitzenegger, T., Pohl, T. M., Terryn, N., Gielen, J., Villarroel, R., Chalwatzis, N., et al. 1998. Análisis of 1.9 Mb of contiguos sequense from chromosome 4 of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* (London) **391**(6666): 485-488.

Beyersmann, D., Hechtenberg, S. 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. **144**(2):247-61.

Bonaldo, M.F., Lennon, G., Soares, M.B. 1996. Normalization and subtraction: two approaches to facilitate gene discovery. *Genome Res*. **6**(9):791-806.

Bonato, M.C.M., Silva, A.M., Gomes, S.L., Maia, J.C.C. and Juliani, M.H. 1987. Differential expression of the heat-shock proteins are spontaneous synthesis of Hsp70 during life cicle of *Blastocladiella emersonii. Eur. J. Biochem.* **163**:211-220.

Bonato, M.C.M., Silva, A.M., Maia, J.C.C. and Juliani, M.H. 1984. Phosphorylation of ribosomal protein S6 in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eur J Biochem.* **144**(3): 597-606.

Boorstein, W.R., Ziegelhoffer, T., Craig, E.A. 1994. Molecular evolution of the HSP70 multigene family. *J. Mol. Evol*. **38:**1-17.

Borkovich, K.A., Alex, L.A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G.E., Read, N.D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Paietta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F.E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J.E., Dunlap, J.C., Loros, J.J., *et al*. 2004. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol Mol Biol Rev*. **68**(1):1-108.

Brehmer, D., Rudiger, S., Gassler, C.S., Klostermeier, D., Packschies, L., Reinstein, J., Mayer, M.P., Bukau, B. 2001. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange. *Nat Struct Biol*. **8**:427-32.

Brennan, R.J., Schiestl, R.H. 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res*. **356**:171-178.

Brentani, H., Caballero, O.L., Camargo, A.A., da Silva, A.M., da Silva, W.A. Jr., Dias Neto, E., Grivet, M., Gruber, A., Guimaraes, P.E., Hide, W., Iseli, C., Jongeneel, C.V., Kelso, J., Nagai, M.A., Ojopi, E.P., Osorio, E.C., Reis, E.M., Riggins, G.J., Simpson, A.J., *et al.* 2003. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**(23):13418-23.

Brentani, R.R., Carraro, D.M., Verjovski-Almeida, S., Reis, E.M., Neves, E.J., de Souza, S.J., Carvalho, A.F., Brentani, H., Reis, L.F. 2005. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol*. **54**(2):95-105.

Bukau, B., Horwich, A.L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*. **92**(3):351-66.

Burger, A.M., Seth, A.K. 2004. The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications. *Eur J Cancer*. **40**(15):2217-29.

Burset, M., Seledtsov, I.A., Solovyev, V.V. 2001. SpliceDB: database of canonical and non-canonical mammalian splice sites. *Nucleic Acids Res*. 29(1):255-9.

Camargo, A.A., Samaia, H.P., Dias-Neto, E., Simao, D.F., Migotto, I.A., Briones, M.R., Costa, F.F., Nagai, M.A., Verjovski-Almeida, S., Zago, M.A., Andrade, L.E., Carrer, H., El-Dorry, H.F., Espreafico, E.M., Habr-Gama, A., Giannella-Neto, D., Goldman, G.H., Gruber, A., Hackel, C., Kimura, E.T., Maciel, R.M., Marie, S.K., Martins, E.A., Nobrega, M.P., *et al*. 2001. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definition of the human transcriptome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **98**(21):12103-8.

Cantino, E.C. 1965. Intracellular distribution of 14-c during sporogenesis in *Blastocladiella emersonii*. Effect of light on hemoprotein. *Arch Mikrobiol*. **28**;51:42-59.

Cantino, E.C. 1951. Metabolism and morphogenesis in a new *Blastocladiella*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **17:**325-362.

Carmelo, V., Sa-Correia, I. 1997. HySP26 gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiol Lett*. **149**(1):85-8.

Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., Lee, T.I., True, H.L., Lander, E.S., Young, R.A. 2001. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. **12**(2):323-37.

Cavalieri, D., De Filippo, C. 2005. Bioinformatic methods for integrating whole-genome expression results into cellular networks. *Drug Discov Today*. **10**(10):727-34.

Cheetham, M.E., Caplan, A.J. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*. **3**(1):28-36.

Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., Bahler, J. 2003. Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell*. **14**(1):214-29.

Chol, M., Nevo, N., Cherqui, S., Antignac, C., Rustin, P. 2004. Glutathione precursors replenish decreased glutathione pool in cystinotic cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. **5**:231-5.

Chung, K.S., Hoe, K.L., Kim, K.W., Yoo, H.S. 1998. Isolation of a novel heat shock protein 70-like gene, pss1^{+} of *Schizosaccharomyces pombe* homologous to hsp110/SSE subfamily. *Gene*. **210**(1):143-50.

Claverie, J.M. 1999. Computational methods for the identification of differential and coordinated gene expression. *Hum Mol Genet*. **8**(10):1821-32.

Cobbett, C.S. 2000. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*. **123**(3):825-32.

Collet, C., Joseph, R. 1994. The identification of nuclear and mitochondrial genes by sequencing randomly chosen clones from a marsupial mammary gland cDNA library. *Biochem Genet*. **32**(5-6): 181-90.

Coutinho, E. C., Corrêa, L. C. 1999. The induction of sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* is dependent on extracellular calcium. *FEMS Microbiol. Lett*. **179**: 353-359.

Craig, E.A., Baxter, B., Becker, J., Halladay, J., Ziegelhoffer, T., 1994 In: Morimoto, R., Tissieres, A., Georgopoulos, C. (Eds.) Heat Shock Proteins: Structure, Function and Regulation. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. pp 31-52.

Craig, E.A., Gambill, B.D., Nelson, R.J. 1993. Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol Rev*. **57**:402-14.

Craig, E.A., Kramer, J., Kosic-Smithers, J., 1987. SSC1, a member of the 70-kDa heat shock protein multigene family of *Saccharomyces cerevisiae*, is essential for growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **84**:4156-60.

Craven, R.A., Tyson, J.R., Stirling, C.J., 1997. A novel subfamily of Hsp70s in the endoplasmic reticulum. *Trends in Cell Biology*. **7**:277-282.

Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., Brenner S.E. 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res*. 14(6):1188-90.

de Jong, W.W., Leunissan, J.A.M., Voorter, C.E.M. 1993. Evolution of de α-cristallin/small heat shock protein family. *Mol. Biol. Evol*. **10**:103-126.

Dean, R.A., Talbot, N.J., Ebbole, D.J., Farman, M.L., Mitchell, T.K., Orbach, M.J., Thon, M., Kulkarni, R., Xu, J.R., Pan, H., Read, N.D., Lee, Y.H., Carbone, I., Brown, D., Oh, Y.Y., Donofrio, N., Jeong, J.S., Soanes, D.M., Djonovic, S., Kolomiets, E., Rehmeyer, C., Li, W., Harding, M., Kim, S., Lebrun, M.H., *et al*. 2005. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*. **434**(7036):980-6.

Dechend, R., Hirano, F., Lehmann, K., Heissmeyer, V., Ansieau, S., Wulczyn, F.G., Scheidereit, C., Leutz, A. 1999. The Bcl-3 oncoprotein acts as a bridging factor between NF-kappaB/Rel and nuclear co-regulators. *Oncogene***. 18**:3316-23.

Delaunay, A., Pflieger, D., Barrault, M.B., Vinh, J., Toledano, M.B. 2002. A Thiol peroxidase is an H_2O_2 receptor and redox-transducer in gene activation. *Cell*. **111**:471-481.

Demand, J., Luders, J., Hohfeld, J., 1998. The carboxy-terminal domain of Hsc70 provides binding sites for a distinct set of chaperone cofactors. *Mol. Cell Biol.* **18**:2023-8.

DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*. **278**(5338):680-6.

Ehrnsperger, M., Graber, S., Gaestel, M., Buchner, J. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J* **15**:221-9.

Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., von Heijne, G. 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol*. **21**:1005-16.

Ewing, B., Green, P. 2000. Analysis of expressed sequence tags indicates 35,000 human genes. *Nat Genet*. **25**(2):232-4.

Ewing, B., Green, P. 1998. Base-calling of automatic sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Res*. **8**: 186-194.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., Green, P. 1998. Base-calling of automatic sequencer traces using phred. I. Accuracy assesment. *Genome Res*. **8**: 175-185.

Fauchon, M., Lagniel, G., Aude, J.C., Lombardia, L., Soularue, P., Petat, C., Marguerie, G., Sentenac, A., Werner, M., Labarre, J. 2002. Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand. *Mol. Cell* **9**:713-23.

Feder, M.E., Hofmann, G.E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol*. **61**:243-82.

Fei, Z., Tang, X., Alba, R.M., White, J.A., Ronning, C.M., Martin, G.B., Tanksley, S.D., Giovannoni, J.J. 2004. Comprehensive EST analysis of tomato and comparative genomics of fruit ripening. *Plant J*. **40**(1):47-59.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B. 1984. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem*. **132**:6-13.

Felipe, M.S., Andrade, R.V., Petrofeza, S.S., Maranhão, A.Q., Torres, F.A., Albuquerque, P., Arraes, F.B., Arruda, M., Azevedo, M.O., Baptista, A.J., Bataus, L.A., Borges, C.L., Campos, E.G., Cruz, M.R., Daher, B.S., Dantas, A., Ferreira, M.A., Ghil, G.V., Jesuíno, R.S., Kyaw, C.M., Leitão, L., Martins, C.R., Moraes, L.M., Neves, E.O., Nicola, A.M., Alves, E.S., Parente, J.A., *et al*. 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast*. **20**(3):263-71.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.

Fietto, L. 2001. Caracterização e expressão de dois genes codificando ATPases do tipo P em *Blastocladiella emersonii*. Tese de Doutorado.

Fietto, L.G., Pugliese, L., Gomes, S.L. 2002. Characterization and expression of two genes encoding isoforms of a putative Na, K-ATPase in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta*. **7**:59-69.

Friant, S., Meier, K.D., Riezman, H. 2003. Increased ubiquitin-dependent degradation can replace the essential requirement for heat shock protein induction. *EMBO J*. **22**(15):3783-91.

Frydman, J., Hartl, F.U. 1994. Molecular chaperone functions of Hsp70 and Hsp60 in protein folding. *In*: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, R.I Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgeopoulos, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp 251-283.

Frydman, J., Nimmesgern, E., Erdjument-Bromage, H., Wall, J.S., Tempst, P., Hartl, F.U. 1992. Function in protein folding of TRiC, a cytosolic ring complex containing TCP-1 and structurally related subunits. *EMBO J*. **11**(13):4767-78.

Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J. Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., *et al*. 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*. **438**(7071):1105-15.

Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L.J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C.B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M.A., Werner-Washburne, M., *et al*. 2003. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature*. **422**(6934):859-68.

Galas, D.J., Schmits, A. 1978. DNAse footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specifity. *Nucleic. Acid Res*. **5**:3157-3170.

Gard, D. L., Becker, B. E., Josh Romney, S. 2004. MAPping the eukaryotic tree of life: structure, function, and evolution of the MAP215/Dis1 family of microtubule-associated proteins. *Int Rev Cytol*. **239**: 179-272.

Gardner, M.M., Revzin, A. 1981. A gel electrophoresis gel method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic. Acid Res*. **9**:3047-3060.

Gasch, A.P. Spellman, P.T.; Kao, C.M.; Carmel-Harel, O.; Eisen, M. B.; Storz, G.; Botstein, D. Brown, P.O. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cell* **11:**421-4257**.**

Georg, R.C., Gomes, S.L. 2006. Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Gene*. *In press*.

Gething, M.J., Sambrook, J., 1992. Protein folding in the cell. *Nature*. **355**:33-45.

Glover, J.R., Lindquist, S. 1998. Hsp104, Hsp70 and Hsp40: a novel chaperone system that rescue previously aggregated proteins. *Cell* **94**:73-82.

Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J. M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M. B., Labarre, J. 1998. The H_2O_2 stimulation in *Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem.* **274**:22480-22489**.**

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel. J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G. 1996. Life with 6000 genes. *Science.* 274:546, 563-7.

Goldman, G.H., dos Reis Marques, E., Duarte Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Quiapin, A.C., Vitorelli, P.M., Savoldi, M., Semighini, C.P., de Oliveira, R.C., Nunes, L.R., Travassos, L.R., Puccia, R., Batista, W.L., Ferreira, L.E., Moreira, J.C., Bogossian, A.P., Tekaia, F., Nobrega, M.P., Nobrega, F.G., Goldman, M.H. 2003. Expressed sequence tag analysis of the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* yeast phase: identification of putative homologues of *Candida albicans* virulence and pathogenicity genes. *Eukaryot Cell*. **2**(1):34-48.

Gomes, D.S., Fragoso, L.C., Riger, C.J., Panek, A.D., Eleutherio, E.C. 2002. Regulation of cadmium uptake by *Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta*. **1573**(1):21-5.

Gomes, S. L., Mennucci, L., Maia, J. C. C. 1980. Calcium efflux during germination of *Blastocladiella emersonii*. *Develop. Biol*. **77**: 157-166.

Gomes, S. L., Mennucci, L., Maia, J. C. C. 1978. Adenylate cyclase activity and cyclic AMP metabolism during cytodifferentiation of Blastocladiella emersonii. *Biochim. Biophys. Acta* **541**: 190-198.

Goodman, L. A., Kruskal, W. H. 1954. Measures of association for cross classifications. *J. Am. Stat. Assoc*. **49**: 732-764.

Green, P. 1996. PHRAP documentation. University of Washington, Seattle, USA. http://bozeman.mbt.washington.edu/phrap.docs/phrap.html.

Gupta, R. S, Singh, B., 1994. Phylogenetic analysis of 70 kDa heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr. Biol.* **4**:1104-14.

Gupta, S., Zink, D., Korn, B., Vingron, M., Haas, S. A. 2004. Genome wide identification and classification of alternative splicing based on EST data. *Bioinformatics*. **20**(16):2579-85.

Hafker T, Techel D, Steier G, Rensing L. 1998. Differential expression of glucose-regulated (grp78) and heat-shock-inducible (hsp70) genes during asexual development of *Neurospora crassa*. *Microbiology* **144**:37-43.

Haley, D.A., Bova, M.P., Huang, Q.L., Mchaourab, H.S., Stewart, P.L. 2000. Small heat-shock protein structures reveal a continuum from symmetric to variable assemblies. *J Mol Biol* **298**(2):261-72.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M. 1984. Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*. **2**(8411):1095.

Han, Z., Truong, Q.A., Park, S., Breslow, J.L., 2003. Two Hsp70 family members expressed in atherosclerotic lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. **100**:1256-61.

Hartl, F.U., Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*. **295**(5561):1852-8.

Haslbeck M, Walke S, Stromer T, Ehrnsperger M, White HE, Chen S, Saibil HR, Buchner J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J* **18**(23):6744-51.

Heikkila, J. J. 1993 Heat shock gene expression and development. *Dev. Genet*. **14**:1-5 (part I) and 87-91 (Part II).

Helmbrecht, K., Rensing, L. 1999. Different constitutive heat shock protein 70 expression during proliferation and differentiation of rat C6 glioma cells. *Neurochem Res*. **24**:1293-9.

Hemmingsen, S.M., Woolford, C., van der Vies, S.M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C. P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. 1988. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric proteins assembly. *Nature* **333**:330-334.

Hightower, L., Nover, L. (Eds) 1991. Results and Problems in Cell Differentiation: Heat shock and Development. Springer Verlag, Heidelberg.

Hightower, L.E. 1991. Heat shock, stress proteins, chaperones and proteotoxity. *Cell* **66**:191-7.

Hihara, Y., Muramatsu, M., Nakamura, K., Sonoike, K. 2004. A cyanobacterial gene encoding an ortholog of Pirin is induced under stress conditions. *FEBS Lett*. **574**:101-5.

Hillier, L.D., Lennon, G., Becker, M., Bonaldo, M.F., Chiapelli, B., Chissoe, S., Dietrich, N., DuBuque, T., Favello, A., Gish, W., Hawkins, M., Hultman, M., Kucaba, T., Lacy, M., Le, M., Le, N., Mardis, E., Moore, B., Morris, M., Parsons, J., Prange, C., Rifkin, L., Rohlfing, T., Schellenberg, K., Marra, M., *et al*. 1996. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. *Genome Res*. **6**(9):807-28.

Hirschi, K.D., Korenkov. V.D., Wilganowski, N.L., Wagner, G.J. 2000. Expression of arabidopsis CAX2 in tobacco. Altered metal accumulation and increased manganese tolerance. *Plant Physiol*. **124**(1):125-33.

Hoskins, J.R., Singh, S.K., Maurizi, M.R., Wickner, S. 2000. Protein binding and unfolding by the chaperone ClpA and degradation by the protease ClpAP. *Proc Natl Acad Sci* **97:**8892-8897.

Huang, X., Madan, A. 1999. CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Res*. 9(9):868-77.

Hubbard, S.J., Grafham, D.V., Beattie, K.J., Overton, I.M., McLaren, S.R., Croning, M.D., Boardman, P.E., Bonfield, J.K., Burnside. J., Davies, R.M., Farrell, E.R., Francis, M.D., Griffiths-Jones, S., Humphray, S.J., Hyland, C., Scott, C.E., Tang, H., Taylor, R.G., Tickle, C., Brown, W.R., Birney, E., Rogers, J., Wilson, S.A. 2005. Transcriptome analysis for the chicken based on 19,626 finished cDNA sequences and 485,337 expressed sequence tags. *Genome Res*. **15**(1):174-83.

Ingebretsen, O. C. Sanner, T. 1976. Variation in levels of enzymes related to energy metabolism in alternative developmental pathways of *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol*. **126**(3): 1075-1081.

Inoue, Y., Matsuda, T., Sugiyama, S., Izawa, S., Kimura, A. 1999. Genetic analysis of glutathione peroxidase in oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Chem*. **271**:27002-27009.

Jakupovic, M., Heintz, M., Reichmann, P., Mendgen, K., Hahn, M. 2006. Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. *Fungal Genet Biol*. **43**(1):8-19.

Johnson, S. A., Lovett, J. S. 1984. Gene expression during development of *Blastocladiella emersonii*. *Exp. Mycol.* 8:132-145.

Kellis, M., Birren, B.W., Lander, E.S. 2004. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. **428**:617-24.

Kessel, M., Maurizini, M.R., Kim B., Kocsis, E., Trus, B.L., Singh, S.K., Steven, A.C. 1995. Homology in structural organization between E. coli ClpAP protease and the eukaryotic 26 S proteasome. *J Mol Biol*. **250**(5):587-94.

Kim, S.K., Lund, J., Kiraly, M., Duke, K., Jiang, M., Stuart, J.M., Eizinger, A., Wylie, B.N., Davidson, G.S. 2001. A gene expression map for *Caenorhabditis elegans*. *Science*. **293**(5537):2087-92.

Kim, S., Willison, K.R., Horwich, A.L. 1994. Cystosolic chaperonin subunits have a conserved ATPase domain but diverged polypeptide-binding domains. *Trends Biochem Sci* **19**:543-8.

Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., Wolf, D.H. 1996. Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *EMBO J.* **15**(4):753-63.

Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*. **5**:150-63.

Kwon, Y.T., Kashina, A.S., Varshavsky, A. 1999. Alternative splicing results in differential expression, activity, and localization of the two forms of arginyl-tRNA-protein transferase, a component of the N-end rule pathway. *Mol Cell Biol*. **19**(1):182-93.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 676-685.

Lapik, Y.R., Kaufman, L.S. 2003. The *Arabidopsis* cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha-subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Plant Cell.* **15**(7):1578-90.

Lee, G.J., Vierling, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122(1):189-98.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J., Toledano, M.B. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*. **274**(23):16040-6.

Lee, S.U., Yoo, D., Son, J., Cho, K. 2006. Proteomic evaluation of cadmium toxicity on the midge *Chironomus riparius* Meigen larvae. *Proteomics*. **6**:945-957.

Li, L., Brunk, B.P., Kissinger, J.C., Pape, D., Tang, K., Cole, R.H., Martin, J., Wylie, T., Dante, M., Fogarty, S.J., Howe, D.K., Liberator, P., Diaz, C., Anderson, J., White, M., Jerome, M.E., Johnson, E.A., Radke, J.A., Stoeckert, C.J. Jr., Waterston, R.H., Clifton, S.W., Roos, D.S., Sibley,

L.D. 2003. Gene discovery in the apicomplexa as revealed by EST sequencing and assembly of a comparative gene database. *Genome Res*. **13**(3):443-54.

Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele, D.J., Rea, P.A. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in Saccharomyces cerevisiae: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato) cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:42-7.

Lindquist, S., Craig E.A. 1988. The heat shock proteins. *Ann Rev. Genet*. **22**:631-77.

Lindquist, S. 1986. The heat shock response. *Ann. Rev. Biochem*. **55**:1151-91.

Liu, X.F., Culotta, V.C. 1994. The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in BSD2, a novel metal homeostasis gene. *Mol Cell Biol*. **14**(11):7037-45.

Livak, K. J., Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-deltadeltaCT Method. *Methods*. **25**: 402-408.

Loftus, B.J., Fung, E., Roncaglia, P., Rowley, D., Amedeo, P., Bruno, D., Vamathevan, J., Miranda, M., Anderson, I.J., Fraser, J.A., Allen, J.E., Bosdet, I.E., Brent, M.R., Chiu, R., Doering, T.L., Donlin, M.J., D'Souza, C.A., Fox, D.S., Grinberg, V., Fu, J., Fukushima, M., Haas, B.J., Huang, J.C., Janbon, G., *et al.* 2005. The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Science*. **307**(5713):1321-4.

Lovett, J.S. 1975. Growth and differentiation of the water mold *Blastocladiella emersonii*: Cytodifferentiation and the role of ribonucleic acid and protein synthesis. *Bacteriol. Rev*. **39**:345-404.

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D.W., Galagan, J.E., Nierman, W.C., Yu, J., Archer, D.B., Bennett, J.W., Bhatnagar, D., *et al*. 2005. Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*. **438**(7071):1157-61.

Madeo, F., Frohlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist, S.J., Wolf, D.H., Frohlich, K.U. 1999. Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. **145**(4):757-67.

Maia, J. C., Camargo, E. P. 1974. cAMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ*. **3**: 147-155.

Mager, W.M., Ferreira, P.M., 1993. Stress response of yeast. *Biochem. J*. **290**:1-13.

Mandel, M., Higa, A. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* **53**: 159.

Marques, M. do V., Gomes, S.L. 1992. Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*. *J Biol Chem*. **25** (24):17201-7.

Marrs, K.A., Walbot, V. 1997. Expression and RNA splicing of the maize glutathione S-transferase Bronze2 gene is regulated by cadmium and other stresses. *Plant Physiol*. **113**(1):93-102.

McAleer, M.F., Tuan, R.S. 2001. Metallothionein protects against severe oxidative stress-induced apoptosis of human trophoblastic cells. *In Vitr Mol Toxicol*. **14**(3):219-31.

McCombie, W. R., Adams, M. D., Kelley, J. M., FitzGerald, M. G., Utterback, T. R., Khan, M., Dubnick, M., Kerlavage, A. R., Venter, J. C., Fields, C. 1992. *Caenorhabditis elegans* expressed sequence tags identify gene families and potential disease gene homologues. *Nat Genet*. **1**(2):124-31.

McKnight, S.L., Kingsbury, R. 1982. Transcriptional control signals of an eukaryotic protein-encoding gene. *Science* **217**:316-324.

Megy, K., Audic S., Claverie, J.M. 2002. Heart specific genes revealed by EST sampling. *Genome Biol.* **16**;3(9).

Meinnel, T., Serero, A., Giglione, C. 2006. Impact of the N-terminal amino acid on targeted protein degradation. *Biol Chem*. **387**(7):839-51.

Mendoza-Cozatl, D., Loza-Tavera, H., Hernandez-Navarro, A., Moreno-Sanchez, R. 2005. Sulfur assimilation and glutathione metabolism under cadmium stress in yeast, protists and plants. *FEMS Microbiol Rev*. **29**(4):653-71.

Mewes H.W., Albermann K., Bahr M., Frishman D., Gleissner A., Hani J., Heumann K., Kleine K., Maierl A., Oliver S.G., Pfeiffer F., Zollner A. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* (London) **387** (6632) Suppl.: 7-65.

Morimoto, R.I. 1998. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev*. **12**(24):3788-96.

Morimoto, R.I., Tissieres, A., Georgeopoulos, C.P. 1994. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. *In*: The biology of heat shock proteins and molecular chaperones, R.I Morimoto, A. Tissieres, and C. Georgeopoulos, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp 1-30.

Morimoto, R.I., Sarge, K.D., Abravaya K., 1992. Transcriptional regulation of heat shock shock genes. *J. Biol. Chem*. **267**:21987-21990.

Mukai, H., Kuno, T., Tanaka, H., Hirata, D., Miyakawa, T., Tanaka, C. 1993. Isolation and characterization of SSE1 and SSE2, new members of the yeast HSP70 multigene family. *Gene.* **132**:57-66.

Narberhaus, F. 2000. Alpha-crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol Mol Biol Rev*. **66**(1):64-93.

Nelson, M.A., Kang, S., Braun, E.L., Crawford, M.E., Dolan, P.L., Leonard, P.M., Mitchell, J., Armijo, A.M., Bean, L., Blueyes, E., Cushing, T., Errett, A., Fleharty, M., Gorman, M., Judson, K., Miller, R., Ortega, J., Pavlova, I., Perea, J., Todisco, S., Trujillo, R., Valentine, J., Wells, A., Werner-Washburne, M., Natvig, D.O., *et al*. 1997. Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol*. **21**(3):348-63.

Nierman, W.C., Pain, A., Anderson, M.J., Wortman, J.R., Kim, H.S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D.B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P.S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T.V., Fischer, R., Fosker, N., *et al*. 2005. Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*. **438**(7071):1151-6.

Niwa, M., Kozawa, O., Matsuno,H., Kato, K., Uematsu, T. 2000. Small molecular weight heat shock-related protein, HSP20, exhibits an anti-platelet activity by inhibiting receptor-mediated calcium influx. *Life Sci*. **66**(1):PL7-12.

Nugent, K.G., Choffe, K., Saville, B.J. 2004. Gene expression during *Ustilago maydis* diploid filamentous growth: EST library creation and analyses. *Fungal Genet Biol*. **41**(3):349-60.

Nunes, L.R., Costa de Oliveira, R., Leite, D.B., da Silva, V.S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M.E., Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Goldman, M.H., Puccia, R., Travassos, L.R., Batista, W.L., Nóbrega, M.P., Nóbrega, F.G., Yang, D.Y., de Braganca Pereira, C.A., Goldman, G.H. 2005. Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell*. **4**(12):2115-28.

Nystrom, T., Neidhardt, F.C. 1994. Expression and role of the universal stress protein, UspA, of Escherichia coli during growth arrest. *Mol Microbiol*. **11**(3):537-44.

Oh, H.J., Chen, X., Subjeck, J.R. 1997. Hsp110 protects heat-denatured proteins and confers cellular thermoresistance. *J Biol Chem*. **272**:31636-40.

Oh, H.J., Easton, D., Murawski, M., Kaneko, Y., Subjeck, J.R. 1999. The chaperoning activity of hsp110. Identification of functional domains by use of targeted deletions. *J Biol Chem*. **274**:15712-8.

Oliveira, J.C., Borges, A.C., Marques, M. do V., Gomes, S.L. 1994. Cloning and characterization of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eur J Biochem*. **15**(1-2):555-62.

Ortiz, D.F., Ruscitti, T., McCue KF., Ow, D.W. 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem*. **270**(9):4721-8.

Orzaez, D., de Jong, A.J., Woltering, E.J. 2001. A tomato homologue of the human protein PIRIN is induced during programmed cell death. *Plant Mol Biol*. **46**:459-68.

Ota, T., Suzuki, Y., Nishikawa, T., Otsuki, T., Sugiyama, T., Irie, R., Wakamatsu, A., Hayashi, K., Sato, H., Nagai, K., Kimura, K., Makita, H., Sekine, M., Obayashi, M., Nishi, T., Shibahara, T., Tanaka, T., Ishii, S., Yamamoto, J., Saito, K., Kawai, Y., Isono, Y., Nakamura, Y., Nagahari, K., Murakami, K., Yasuda, T., Iwayanagi, T., Wagatsuma, M., *et al*. 2004. Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nat Genet*. **36**(1):40-5.

Paquola, A.C.M., Nishyiama Jr, M. Y., Reis E.M., Silva A.M., Verjovski-Almeida, S. 2003. ESTWeb: web-based bioinformatics services for EST sequencing projects. *Bioinformatics*. 19(12):1587-8.

Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A., Lindquist S. 1994. Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature.* **372**:475-478.

Parsell, D.A., Lindquist, S. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet*. **27**:437-96.

Passmore, L.A., Barford, D. 2004. Getting into position: the catalytic mechanisms of protein ubiquitylation. *Biochem J.* **379**:513-25.

Pelham, H.R.B. 1986. Speculations on the functions of the major heat shock and glucose –regulated proteins. *Cell* **46**:959-961.

Philippe, H., Snell, E. A., Bapteste, E., Lopez, P., Holland, P. W., Casane, D. 2004. Phylogenomics of eukaryotes: impact of missing data on large alignments. *Mol Biol Evol*. **21**(9):1740-52.

Plesofsky-Vig, N. 1996. The heat shock proteins and the stress response. In: The Mycota III, Biochemistry and Molecular Biology (Brambl, R. and Marzluff, G.A. Eds.), pp 171-190. Springer Verlag, Berlin.

Plesofsky-Vig, N., Vig, J., Brambl, R. 1992. Phylogeny of the alpha-crystallin-related heat-shock proteins *J Mol Evol.* **35**(6):537-45.

Polymeropoulos, M. H., Xiao, H., Sikela, J. M., Adams, M., Venter, J. C., Merril, C. R. 1993 Chromosomal distribution of 320 genes from a brain cDNA library. *Nat Genet*. **4**(4):381-6.

Pugliese, L., Georg, R.C., Fietto, L.G., Gomes, S.L. 2006. Expression of the heat shock gene *hsp90* is developmentally regulated in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. Em preparação.

Pugliese, L. 2003. Estudo da expressão dos genes de choque térmico *hsp90*, *hsp60* e *hsp10* do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. Tese de doutorado.

Pulido, M.D., Parrish, A.R. 2003. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res*. **533**:227-41.

Quackenbush, J. Computational analysis of microarray data. (2001) *Nature Reviews Genetics* **2**:418-427.

Rassow, J., Ahsen, O., Bömer, U., Pfanner, N. 1997. Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends in Cell Biol*. **7**:129-133.

Rensing, L., Monnerjahn, C., Meyer, U., 1998. Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **15:**159-66.

Rensink, W., Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V., Buell, C.R. 2005. Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome*. **48**(4):598-605.

Ribichich, K.F., Georg, R.C., Gomes, S.L. 2006. Comparative EST analysis provides insights into the basal aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *BMC Genomics*. **12**;7:177.

Ribichich, K.F., Salem-Izacc, S. M., Georg, R.G., Vêncio, R.Z.N., Navarro, L.D., Gomes, S.L. 2005. Gene Discovery and Expression Profile Analysis Through Sequencing of Expressed Sequence Tags from Different Developmental Stages of the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot. Cell* **4**: 455-464.

Riezman, H. 2004. Why do cells require heat shock proteins to survive heat stress? *Cell Cycle*. **3**(1):61-3.

Riley M. 1993. Functions of the gene-products of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev*. **57**: 862-952.

Rocha, C.R. and Gomes, S.L. 1999. Characterization and submitochondrial localization of the alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol*. **181**(14): 4257-65.

Rocha, C.R., Gomes, S.L. 1998. Isolation, characterization and expression of the gene encoding the beta subunit of the mitochondrial processing peptidase from *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol*. **180**(15):3967-72.

Rocha, C.R., Gomes, S.L. 1999. Characterization and submitochondrial localization of the alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol*. **181**(14):4257-65.

Rose, M.D., Misra, L.M., Vogel, J.P., 1989. KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*. **57**:1211-21.

Rounsley, S. D., Glodek, A., Sutton, G., Adams, M. D., Somerville, C. R., Venter, J. C., Kerlavage, A. R. 1996. The construction of *Arabidopsis* expressed sequence tag assemblies. A new resource to facilitate gene identification. *Plant Physiol*. **112**(3): 1177-83.

Rudd, S. 2003. Expressed sequence tags: alternative or complement to whole genome sequences? *Trends Plant Sci*. **8**(7):321-9.

Salem-Izacc, S.M. 2006. Análise da expressão gênica global durante a germinação do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. Tese de doutorado.

Saltsman, K.A, Prentice, H.L., Kingston, R.E. 1999. Mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* heat shock factor that differentially affect responses to heat and cadmium stress. *Mol. Gen. Genet.* **261**:161-9.

Sambrook, J., Fritch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Segunda edição, Cold Spring Harbor Laboratory press.

Sanchez, Y., Lindquist, S. 1990. HSP104 required for induced thermotolerance. *Science*. **248**(4959):1112-5.

Sanchez, Y., Parsell, D.A., Taulien, J., Vogel, L., Craig, E.A., Lindquist, S. 1993. Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *J. Bacteriol*. **175**:6484-6491.

Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K.A., Lindquist, S. 1992. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J*. **11**:2357-64.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **74**(12): 5463-7.

Scharfe, C., Zaccaria, P., Hoertnagel, K., Jaksch, M., Klopstock, T., Lill, R., Prokisch, H., Gerbitz, K. D., Mewes, H. W., Meitinger, T. 1999. MITOP: database for mitochondria-related proteins, genes and diseases. *Nucleic Acids Res*. **27**(1):153-5.

Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. **270**(5235):467-70.

Schuler, G. D., Boguski, M. S., Stewart, E. A., Stein, L. D., Gyapay, G., Rice, K., White, R. E., Rodriguez-Tome, P., Aggarwal, A., Bajorek, E. , *et al.* 1996. A gene map of the human genome. *Science*. **274**(5287): 540-6.

Schutzendubel, A., Polle, A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. *J Exp Bot*. **53**(372):1351-65.

Schmitt, A.O., Specht, T., Beckmann, G., Dahl, E., Pilarsky, C.P., Hinzmann, B., Rosenthal, A. 1999. Exhaustive mining of EST libraries for genes differentially expressed in normal and tumour tissues. *Nucleic Acids Res*. **27**(21):4251-60.

Semova, N., Storms, R., John, T., Gaudet, P., Ulycznyj, P., Min, X.J., Sun, J., Butler, G., Tsang, A. 2006. Generation, annotation, and analysis of an extensive *Aspergillus niger* EST collection. *BMC Microbiol*. **2**;6:7.

Shaner, L., Wegele, H., Buchner, J., Morano, K.A., 2005. The yeast Hsp110 Sse1 functionally interacts with the Hsp70 chaperones Ssa and Ssb. *J. Biol. Chem*. **280**:41262-9.

Shaner, L., Trott, A., Goeckeler, J.L., Brodsky, J.L., Morano, K.A., 2004. The function of the yeast molecular chaperone Sse1 is mechanistically distinct from the closely related hsp70 family. *J. Biol. Chem*. **279**:21992-2001.

Sharov, A. A., Piao, Y., Matoba, R., Dudekula, D. B., Qian, Y., VanBuren, V., Falco, G., Martin, P.R., Stagg, C.A., Bassey, U. C., *et al.* 2003. Transcriptome analysis of mouse stem cells and early embryos. PLoS Biol. **1**(3):E74.

Shimoda,R., Nagamine, T., Takagi, H., Mori, M., Waalkes, M.P. 2001. Induction of apoptosis in cells by cadmium: quantitative negative correlation between basal or induced metallothionein concentration and apoptotic rate. *Toxicol Sci.* **64**(2):208-15.

Shiraishi, E., Inouhe, M., Joho, M., Tohoyama, H. 2000. The cadmium-resistant gene, CAD2, which is a mutated putative copper-transporter gene (PCA1), controls the intracellular cadmium-level in the yeast *S. cerevisiae*. *Curr Genet*. **37**(2):79-86.

Shyy, T.T., Subjeck, J.R., Heinaman, R., Anderson, G. 1986. 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.

Silva, A.M., Maia, J.C.C., Juliani, M.H. 1987a. Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in *Blastocladiella emersonii. Bacteriol.* **169**:2069-2078.

Silva, A.M., Juliani, M.H., Costa, J.J., Bonato, M.C.M. 1987b. Acquisition of thermotolerance during development of *Blastocladiella emersonii Biochem. Biophys. Res. Commun.***144:**491-498.

Silva, A.M., Maia, J.C.C., Juliani, M.H. 1986. Developmental changes in translatable RNA species and protein synthesis during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii. Cell Differ*. **18**:263-274.

Silverman, P.M., Epstein, P.M. 1975. Cyclic nucleotide metabolism coupled to cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **72**(2):442-6.

Simão, R.C., Gomes, S.L. 2001. Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol*. **183**(7):2280-8.

Sims, A. H., Gent, M. E., Robson, G. D., Dunn-Coleman, N. S., Oliver, S. G. 2004. Combining transcriptome data with genomic and cDNA sequence alignments to make confident functional assignments for *Aspergillus nidulans* genes. *Mycol Res*. **108**(8): 853-7.

Sirover, M.A. 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. **13**(2):159-84.

Soll, D. R., Sonnerborn, D. R. 1972. Zoospore germination in the water mold, *Blastocladielia emersonii*. IV. Ion control over cell differentiation. *J. Cell Sci*. **10**: 315-333.

Soll, D. R., Sonneborn, D. R. 1969. Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. II. Influence of cellular and environmental variables on germination. *Develop. Biol*. **20**: 218-235.

Sorensen, J.G., Nielsen, M.M., Kruhoffer, M., Justesen, J., Loeschcke, V. 2005. Full genome gene expression analysis of the heat stress response in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperones*. **10**(4):312-28.

Souza, F.S., Gomes, S.L. 1998. A P-type ATPase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* similar to animal Na,K-ATPases. *Biochim Biophys Acta*. **2**(2):183-7.

Steel, G.J., Fullerton, D.M., Tyson, J.R., Stirling C.J., 2004. Coordinated activation of Hsp70 chaperones. *Science*. **303**:98-101.

Stefani, R.M.P., Gomes, S.L. 1995. A unique intron containing hsp70 gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii. Gene* **152**:19-26.

Stekel, D. J., Git, Y., Falciani, F. 2000. The comparison of gene expression from multiple cDNA libraries. *Methods* **10**:2055-2061.

Sterky, F., Bhalerao, R.R., Unneberg, P., Segerman, B., Nilsson, P., Brunner, A.M., Charbonnel-Campaa, L., Lindvall, J.J., Tandre, K., Strauss, S.H., Sundberg, B., Gustafsson, P., Uhlen, M., Bhalerao, R.P., Nilsson, O., Sandberg, G., Karlsson, J., Lundeberg, J., Jansson, S. 2004. A Populus EST resource for plant functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**(38):13951-6.

Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* **18**:321-336.

Stoughton, R.B. 2005. Applications of DNA microarrays in biology. *Annu Rev Biochem*. **74**:53-82.

Subjeck, J.R., Shyy T.T., Shenad, J., Johnson, R. 1983. Association between the mammalian 110,000 dalton heat shock protein and nucleoli. *J. Cell Biol*. **97**:1389-95.

Sugiyama, Y., Suzuki, A., Kishikawa, M., Akutsu, R., Hirose, T., Waye, M.M., Tsui, S.K., Yoshida, S., Ohno, S. 2000. Muscle develops a specific form of small heat shock protein complex composed of MKBP/HSPB2 and HSPB3 during myogenic differentiation. *J Biol Chem.* **275**(2):1095-104.

Sun, L., Chen, Z.J. 2004. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*. **16**(2):119-26.

Sun, W., Van Montagu, M., Verbruggen, N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta*. **1577**(1):1-9.

Sun, Y., MacRae, T.H. 2005. Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cell Mol Life Sci*. **62**(21):2460-76.

Takasuga, A., Hirotsune, S., Itoh, R., Jitohzono, A., Suzuki, H., Aso, H., Sugimoto, Y. Establishment of a high throughput EST sequencing system using poly(A) tail-removed cDNA libraries and determination of 36,000 bovine ESTs. *Nucleic Acids Res*. **29**(22):E108.

Telles, G. P., da Silva, F. R. 2001. Trimming and clustering sugarcane ESTs. *Genetics and Molecular Biology* **24**(1-4): 17-23.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. **22**: 4673-4680.

Tian, G., Vainberg, I.E., Tap, W.D., Lewis, S.A., Cowan, N.J. 1995. Specificity in chaperonin-mediated protein folding. *Nature*. **375**(6528):250-3.

Toone, W.M., Jones, N. 1999. AP-1 transcription factors in yeast. *Curr Opin Genet Dev* **9**:55-61.

Torto, T. A., Li, S., Styer, A., Huitema, E., Testa, A., Gow, N. A., van West, P., Kamoun, S. 2003. EST mining and functional expression assays identify extracellular effector proteins from the plant pathogen *Phytophthora. Genome Res*. **13**(7): 1675-85.

Town, M., Jean, G., Cherqui, S., Attard, M., Forestier, L., Whitmore, S.A., Callen, D.F., Gribouval, O., Broyer, M., Bates, G.P., van't Hoff, W., Antignac, C. 1998. A novel gene encoding an integral membrane protein is mutated in nephropathic cystinosis. *Nat Genet*. 18(4):319-24.

Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., Dixit, V.M. 2000. Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell*. **6**(4):961-7.

Vale, V. L., Gomes, S. L., Maia, J. C. C., Mennucci, L. 1976. Transient cyclic AMP accumulation in germinating zoospores of *Blastocladiella emersonii*. *FEBS Lett*. **67**: 189-192.

Vatamaniuk, O.K., Bucher, E.A., Ward, J.T., Rea, P.A. 2001. A new pathway for heavy metal detoxification in animals. Phytochelatin synthase is required for cadmium tolerance in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem*. **276**(24):20817-20.

Veinger, L., Diamant, S., Buchner, J., Goloubinoff, P. 1998. The small heat-shock protein IbpB from Escherichia coli stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *J Biol Chem* **273**(18):11032-7.

Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science*. **270**(5235):484-7.

Vencio, R.Z., Koide, T., Gomes, S.L., Pereira, C.A. 2006. BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. *BMC Bioinformatics*. **23**;7:86.

Vencio, R.Z., Koide, T. 2005. HTself: Self-Self Based Statistical Test for Low Replication Microarray Studies. *DNA Res*. **12**(3):211-4.

Vettore, A.L., da Silva, F.R., Kemper, E.L., Souza, G.M., da Silva, A.M., Ferro, M.I., Henrique-Silva, F., Giglioti, E.A., Lemos, M.V., Coutinho, L.L., Nobrega, M.P., Carrer, H., Franca, S.C., Bacci Junior, M., Goldman, M.H., Gomes, S.L,, Nunes, L.R., Camargo, L.E., Siqueira, W.J., Van Sluys, M.A., Thiemann, O.H., Kuramae, E.E., Santelli, R.V., *et al.*, 2003. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res*. **13**(12):2725-35.

Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M.B., Labarre, J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem*. **276**:8469-74.

Walter, S., Buchner, J. 2002. Molecular chaperones--cellular machines for protein folding. *Angew Chem Int Ed Engl*. **2**(7):1098-113.

Werner-Washburne, M., Becker, J., Kosic-Smithers, J., Craig, E.A., 1989. Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell. *J Bacteriol*. **171**:2680-8.

Westood, J.T., Clos, J., Wu, C. 1991. Stress induced oligomerization and chromosomal relocalization of heat shock factor. *Nature* **353**:822-827.

White, K.P., Rifkin, S.A., Hurban, P., Hogness, D.S. 1999. Microarray analysis of *Drosophila* development during metamorphosis. *Science*. **286**(5447):2179-84.

Wolfsberg, T.G., Landsman, D. 1997. A comparison of expressed sequence tags (ESTs) to human genomic sequences. *Nucleic Acids Res*. **25**(8):1626-32.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., *et al*. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*. **21**;415(6874):871-80.

Xiao, H., Lis, J.T. 1988. Germline transformation used to define key features of heat shock response elements. *Science* **239**: 1139-1142.

Yan, W., Craig, E.A. 1999. The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol Cell Biol*. **19**(11):7751-8.

Yang Y.H., Dudoit S., Luu P., Lin D.M., Peng V., Ngai J., Speed TP**.** 2002. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acid Res*. **30**(4):e15.

Yost, H.J., Lindquist, S. 1991. Heat shock proteins affect RNA processing during the heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. **11**(2):1062-8.

Young, J.C, Barral, J.M., Hartl, F.U. 2003. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in Bioch. Sciences*. **28**:541-546.

Young, J.C., Moarefi, I., Hartl, F.U. 2001. Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*. **154**(2):267-73.

Zhou, Y., Tang, J., Walker, M.G., Zhang, X., Wang, J., Hu, S., Xu, H., Deng, Y., Dong, J., Ye, L., Lin, L., Li, J., Wang, X., Xu, H., Pan, Y., Lin, W., Tian, W., Liu, J., Wei, L., Liu, S., Yang, H., Yu, J., Wang, J. 2003. Gene identification and expression analysis of 86,136 Expressed Sequence Tags (EST) from the rice genome. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. **1**(1):26-42.

Zhu, H., Nowrousian, M., Kupfer, D., Colot, H.V., Berrocal-Tito, G., Lai, H., Bell-Pedersen, D., Roe, B.A., Loros, J.J., Dunlap, J.C. 2001. Analysis of expressed sequence tags from two starvation, time-of-day-specific libraries of *Neurospora crassa* reveals novel clock-controlled genes. *Genetics*. **157**(3):1057-65.

Zhu, W., Schlueter, S.D., Brendel, V. 2003. Refined annotation of the *Arabidopsis* genome by complete expressed sequence tag mapping. *Plant Physiol*. **132**(2):469-84.

VIII – MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 - Lista completa dos genes induzidos por choque térmico na esporulação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	E_HS
BeE90D03C08	P34335	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain	(b) carbohydrate metabolism	2
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	2
BeG90N03E03	P42894	Enolase	(b) glycolysis	3
BeG120N03B10	Q4PG43	Activator 1 38 kDa subunit	(b) DNA replication	4
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication	17
BeE60H29B05	Q5W6B8	Putative polyprotein	(b) DNA transposition	2
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2
BeE60H06D11		Hsp17	(b) protein folding	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding	4
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	3
BeZSPN11F12	Q4P232	Hsp60	(b) protein folding	2
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2
BeE60H15E02	Q5KLR7	Member of the DnaJ family Ydj1p	(b) protein folding	2
BeG90N10D09	Q4PFU5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	(b) protein folding	2
BeE60N13G10	P40046	Vacuolar transporter chaperone 1	(b) protein folding	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	2
BeE90D17A05	Q3X668	Hsp20	(b) protein folding	3
BeG60N08F12	Q4P5L7	SAC3/GANP domain protein	(b) protein modification	5
BeE60H23F08	Q93561	Der1-like protein 2	(b) protein transport	2
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism	3
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase 1	(m) oxidoreductase activity	2
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxin	(m) oxidoreductase activity	2
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	2
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity	2
BeE60H22D05	Q4WXC6	Mitochondrial acidic protein MAM33		2
BeE60H26A01	Q9D7M1	Protein C20orf11 homolog		2
BeE120N01E11	Q7Q5S6	Carboxy-terminal domain RNA polymerase II	(m) phosphoric monoester hydrolase activity	2
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	5
BeG90N05C03	Q31ME1	SAM-dependent methyltransferases	(m) SAM-dependent methyltransferase activity	2
BeE60H28B12	Q4P9H4	Acetolactate synthase Ilv2	(m) thiamin pyrophosphate binding	2
BeNSVP10H03	Q873A4	Cytochrome-c oxidase activity	(b) electron transport	2
BeE60H32G06	Q9P7N9	Trafficking protein particle complex subunit 5	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	11
BeG60N08E04	Q6NYZ1	Nucleosome assembly protein (NAP)	(b) nucleosome assembly	2
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport	2
BeG120N07D11	Q5KEP5	Diacylglycerol cholinephosphotransferase	(b) phospholipid biosynthesis	2
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	3
BeZSPN17C11	Q6C3M2	Secretory pathway GDP dissociation inhibitor	(b) regulation of GTPase activity	2

BeE60H29E01	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress	2
BeE90D13B08	Q7Q7M3	GTPase	(b) ribosome biogenesis	2
BeG90N18F12	Q4HU89	GTPase of unknown function	(m) GTP binding	2
BeG60N05A06	Q7PSD1	GTP binding protein	(m) nucleotide binding	2
BeG60N20C08		TPR domain protein		2
BeE120N38F02		Leucine Rich Repeat domain containing protein		2
BeE30N20B08		Putative elicitor-responsive gene		4
BeE60N08G06		Hypothetical protein		2
BeE120N01H03		Unknown		2
BeE120N26B08		Unknown		2
BeE30N20D06		Unknown		2
BeE60C08G05		Unknown		2
BeE60H08F12		Unknown		10
BeE60H09C11-1		Unknown		2
BeE60H15D02		Unknown		3
BeE60H26C07		Unknown		4
BeE60H26G08		Unknown		2
BeE60N01B04		Unknown		2
BeE60N08D08		Unknown		2
BeE90N13H07		Unknown		8
BeG120N21A12		Unknown		2
BeZSPN16E03		Unknown		2

A coluna E_HS corresponde à razão de expressão dos genes em relação ao controle sem choque térmico. Processo Biológico (b) e Função Molecular (m) representam categorias do Gene Ontology (GO). Swiss Prot corresponde ao código das proteínas presentes neste banco de dados com as quais foi observada similaridade através de BlastX com os respectivos genes putativos de *B. emersonii* (Clone ID).

Tabela S2 - Lista completa dos genes induzidos por choque térmico na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G_HS
BeE30N10F07	Q6NWC3	Amino acid permease	(b) amino acid transport	2
BeZSPN17H06	O06479	Amino acid permease	(b) amino acid transport	2
BeE60C15E06	Q5X330	Glutamine synthetase	(b) glutamine biosynthesis	2
BeE90D03C08	P34335	Phosphorylase B kinase alpha regulatory chain	(b) carbohydrate metabolism	3
BeE90D02G04	Q4INK9	Glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase	(b) carbohydrate metabolism	3
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	3
BeE60C31B06	Q4AQV4	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase precursor	(b) glycerol metabolism	3
BeG120N03B10	Q4PG43	Activator 1 38 kDa subunit	(b) DNA replication	3
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication	9
BeE60H29B05	Q5W6B8	Putative polyprotein	(b) DNA transposition	3
BeZSPN17B12	Q8S819	Putative transposase	(b) DNA transposition	2
BeE60H22E01	Q9ES84	snRNP core protein SMX5d	(b) mRNA processing	2
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2
BeE60H06D11		Hsp17	(b) protein folding	2
BeE30N03D10	Q6USC1	Cyclophilin A	(b) protein folding	2
BeE60C24C07	Q7ZA53	FK506-binding protein	(b) protein folding	2
BeE60H32E04	Q75UL2	FK506-binding protein	(b) protein folding	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding	4
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	2
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2
BeE60H19D03	Q99170	Hsp70-8	(b) protein folding	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	4
BeG90N10D09	Q4PFU5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C	(b) protein folding	2
BeG60N12E03	Q4G0C5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase H	(b) protein folding	3
BeE60H24H06	Q3U0J1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase like	(b) protein folding	2
BeG120N25A08	O14334	Probable prefoldin subunit 1	(b) protein folding	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2
BeE60N02A06	Q4I9S8	Ubiquitin-activating enzyme E1 (UBA)	(b) protein modification	3
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism	7
BeE60C30D10	Q6C2Y1	Related to ubiquitin-activating enzyme E1	(b) protein modification	2
BeE60N10G05	Q9CZJ2	Hsp70-10	(m) nucleotide binding	2
BeG60N08F12	Q4P5L7	SAC3/GANP domain protein	(m) protein modification	3
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxin	(m) oxidoreductase activity	2
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase 1	(m) oxidoreductase activity	3
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	2
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	2
BeG60N15E05	P17624	NUD-1 protein	(b) cell division	2
BeNSVP10H03	Q873A4	Cytochrome-c oxidase activity	(b) electron transport	2
BeE60H32G06	Q9P7N9	Trafficking protein particle complex subunit 5	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	13
BeE60N03G10	Q5KJC4	Cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase	(b) lipid biosynthesis	2
BeE120N09D11	Q4P363	AMP-binding protein	(b) metabolism	2
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport	3

BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	4
BeE90D07H12	Q6NWC3	40S ribosomal protein S2	(b) protein biosynthesis	2
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis	2
BeE60H32H12	Q7Q7M3	ADP-ribosylation factor-like protein 1	(b) small GTPase mediated signal transduction	2
BeE90D04C07	Q4P6E9	Cofilin	(m) actin binding	2
BeE60N16C07	Q5U3C0	ARMC4 protein	(m) binding	2
BeE120N31D03	Q2TL59	Calreticulin	(m) calcium ion binding	2
BeE120N38E10	Q9D5P6	Similar to Calmodulin-like protein	(m) calcium ion binding	2
BeG30N12F01	Q6XQ94	Putative endonuclease	(m) endonuclease activity	3
BeE60N13A07	Q7KQS3	Nuclear pore protein SEH1	(m) protein binding	2
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	4
BeE120N25H03	Q2PBB6	14-3-3 protein	(m) protein domain specific binding	2
BeG90N05C03	Q31ME1	SAM-dependent methyltransferases	(m) SAM-dependent methyltransferase activity	2
BeNSVP03D01	Q7RXW0	Probable nuclear protein SNF4		2
BeE120N38F02		Leucine Rich Repeat domain containing protein		2
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein		2
BeE60N05B05		Leucine-rich protein		2
BeE90N15B12		Cytochrome P-450		2
BeE60H26G08		Hypothetical protein		3
BeE90D18B09		Hypothetical protein		2
BeE120N01H03		Unknown		3
BeE120N03D02		Unknown		2
BeE120N03E08		Unknown		2
BeE120N21D06		Unknown		2
BeE120N25E05		Unknown		2
BeE120N25G03		Unknown		2
BeE30N08F07		Unknown		2
BeE60C05A01		Unknown		2
BeE60C24E07		Unknown		2
BeE60C32F10		Unknown		2
BeE60H08F12		Unknown		9
BeE60H13F04		Unknown		2
BeE60H15D02		Unknown		4
BeE60H16A10		Unknown		2
BeE60H21D10		Unknown		2
BeE60H26C07		Unknown		5
BeE60H30E06		Unknown		3
BeE60H32E11		Unknown		2
BeE60N01B04		Unknown		3
BeE90D01G02		Unknown		3
BeE90D04A05		Unknown		3
BeE90D12D05		Unknown		2
BeE90D17D01		Unknown		3
BeE90N04C12		Unknown		2
BeE90N07E01		Unknown		2
BeE90N13H07		Unknown		6
BeG30N14D05		Unknown		2

BeG60N15A07	Unknown	2
BeG60N17B09	Unknown	2
BeG90N03D10	Unknown	2
BeG90N11E11	Unknown	2
BeZSPN14E12	Unknown	2

G_HS corresponde à razão de expressão dos genes em relação ao controle sem choque térmico. Outros detalhes na tabela S1.

Tabela S3 – Lista completa dos genes reprimidos por choque térmico na esporulação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo Biológico/Função Molecular	E_HS
BeNSVP03D05	Q6CCZ9	Hypothetical protein	(b) amino acid metabolism	2
BeE60N07C12	Q7ZWF5	Similar to glutamate oxaloacetate transaminase	(b) amino acid metabolism	2
BeE120N26G05	Q6CCZ9	Vacuolar ATP synthase 16 kDa	(b) ATP synthesis coupled proton transport	2
BeE60N16H03	Q4I9W1	BarJ	(b) electron transport	3
BeE60C01E02	Q4P7J1	Hypothetical protein	(b) protein catabolism	2
BeE60N08H03	Q7QD93	Hypothetical protein	(b) protein catabolism	2
BeG90N22B10	Q4PGP6	AgCP11849 (Fragment)	(b) protein targeting to mitochondrion	2
BeE60N02F11	Q4PAF8	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit	(b) regulation of progression through cell cycle	2
BeE60N09H01	O13774	GTP cyclohydrolase	(b) tetrahydrobiopterin biosynthesis	2
BeE30N14B02	Q7S903	Hypothetical protein	(b) ubiquitin-dependent protein catabolism	2
BeE30N07B02	Q9HFY6	Calmodulin	(m) calcium ion binding	2
BeE120N07A12	Q9HFY6	Roadblock-related dynein light chain	(m) calcium ion binding	2
BeE90N05E03-1		Putative mitochondrial inner membrane protein		4
BeE120N01C11-1		Unknown		3
BeE120N01D06		Unknown		3
BeE120N03D02		Unknown		2
BeE120N07D01		Unknown		2
BeE120N09B03		Unknown		2
BeE120N20E11		Unknown		3
BeE120N22B08		Unknown		3
BeE30N08A11		Unknown		3
BeE60C06C11		Unknown		2
BeE60H16A10		Unknown		2
BeE60H16E03		Unknown		3
BeE60N01E03		Unknown		2
BeE60N03A10		Unknown		2
BeE60N06C01		Unknown		3
BeE60N08G09		Unknown		3
BeE60N11G03		Unknown		3
BeE60N13D02		Unknown		4
BeE60N13F03		Unknown		2
BeE60N14B10		Unknown		2
BeE60N14G10		Unknown		2
BeE60N19C09		Unknown		2
BeE90N02A02		Unknown		3
BeNSVP01A12		Unknown		2
BeNSVP09G10		Unknown		2
BeNSVP11B12		Unknown		2
BeZSPN03D08		Unknown		2
BeE90D07C08		Unknown		2

Maiores detalhes vide Tabela S1.

Tabela S4 – Lista completa dos genes reprimidos por choque térmico na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo Biológico/Função Molecular	G_HS
BeG30N19E10	Q4P7R7	60s ribosomal protein L3	(b) protein biosynthesis	4
BeG120N02B04	Q6CIZ1	Diphthine synthase	(b) metabolism	2
BeG60N19B01	P38625	GMP synthase glutamine-hydrolyzing	(b) glutamine metabolism	2
BeG90N10A10	Q6C0Y4	High mobility group-like nuclear protein 2	(b) ribosome biogenesis and assembly	2
BeG120N20E02	Q6Q547	Nop10p	(b) ribosome biogenesis	2
BeNSVP04C11	Q9T034	Phenylalanyl-trna synthetase-like protein	(b) protein biosynthesis	2
BeG60N15D01	Q4P0K3	RS6/L7A ribosomal protein homolog	(b) ribosome biogenesis and assembly	2
BeNSVP09E10	Q6CCZ9	Similar to methionyl aminopeptidase 2	(b) proteolysis	2
BeG120N23E11	Q4P4N9	Similar to NADH dehydrogenase	(b) electron transport	2
BeE30N17A03	Q9FG72	Oligopeptide transporter 1	(b) oligopeptide transport	3
BeG120N04E02	Q7SF16	Hypothetical protein	(b) protein biosynthesis	2
BeG90N10B01	Q5XK67	Hypothetical protein	(b) transcription	2
BeE30N10D02	Q9SUA4	Oligopeptide transporter 5	(b) oligopeptide transport	2
BeG30N15A08		Hypothetical protein		2
BeNSVP09C06		Unknown		2
BeNSVP04E05		Unknown		2
BeE30N15B02		Unknown		2
BeNSVP07B04		Unknown		2
BeNSVP05B07		Unknown		2
BeE30N14E05		Unknown		2

Maiores detalhes vide Tabela S1 e S2.

Tabela S5 - Lista completa dos genes induzidos por cádmio na esporulação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	E100	E200
BeE120N02B11	Q9Y823	Homocitrate synthase, mitochondrial precursor	(b) amino acid biosynthesis		2
BeE60C11F11	Q6FWJ8	Argininosuccinate synthase	(b) amino acid biosynthesis	3	
BeE90D12G12	Q03393	6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase	(b) amino acid metabolism	5	3
BeG120N15B05	Q00266	S-adenosylmethionine synthetase	(b) amino acid metabolism		2
BeG120N26D12	Q5KJ92	Glutamate dehydrogenase	(b) amino acid metabolism	2	
BeG60N01F09	Q4WZ19	High affinity methionine permease	(b) amino acid transport	2	4
BeZSPN05A11	Q6BS26	Amino acid permease	(b) amino acid transport	3	8
BeE30N06E01	Q34DS8	Amino acid permease family protein	(b) amino acid transport		2
BeE60H21G09	Q8PLF9	Cationic amino acid transporter	(b) amino acid transport		2
BeG30N07G09	Q7NI34	Probable amino acid transporter	(b) amino acid transport		4
BeG30N12H02	Q7NK14	Probable amino acid transporter	(b) amino acid transport		3
BeG30N13H09	Q3WZJ7	Amino acid transporters	(b) amino acid transport		2
BeG90N09B05	Q43YH9	Sodium:dicarboxylate symporter	(b) dicarboxylic acid transport		2
BeE30N19D09	Q54X49	N5-methyltetrahydropteroyltriglutamate-homocysteine methyltransferase	(b) methionine biosynthesis		2
BeE90D13A09	Q962Y8	Ribosomal protein L18	(b) protein biosynthesis	2	2
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis		2
BeE90D11C10	Q4P991	Ribosomal L10 protein, putative	(b) protein biosynthesis		2
BeG120N17E03	Q754C8	Elongation factor 2	(b) protein biosynthesis		3
BeG90N19F12	O14460	Elongation factor 2	(b) protein biosynthesis		3
BeZSPN01B08	Q4PEZ5	Ribosomal protein S12	(b) protein biosynthesis		2
BeZSPN09C01	Q5D0C9	Ribosomal protein S20	(b) protein biosynthesis		3
BeE120N26D02	Q4P991	60S ribosomal protein L10	(b) protein biosynthesis	2	
BeG90N05A04	Q6BKG1	60S acidic ribosomal protein P0	(b) ribosome biogenesis and assembly		2
BeG30N16H05	Q4P0C0	Probable eukaryotic translation initiation factor 6	(b) translational initiation	6	3
BeE90D13D07	Q4X1P0	Hsp60	(b) protein folding	2	2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding		3
BeG30N02D12	Q6FPX9	Metacaspase	(b) proteolysis	15	3
BeZSPN06B03	Q3AS69	Metacaspase	(b) proteolysis	4	2
BeE120N32F08	Q3J9Z6	Peptidase C14, caspase catalytic subunit p20	(b) proteolysis	3	2
BeZSPN14H04	Q55KQ8	Protein with caspase domain	(b) proteolysis		2
BeG30N17E08	Q59RF7	Peptidase	(b) proteolysis	9	
BeG60N07C03	Q55VL6	Hsp70-3	(m) nucleotide binding		2
BeE90N04D11		Metacaspase		3	3
BeG30N02C03		Metacaspase		18	6
BeG120N22G10	Q4HUL9	Monosaccharide transporter	(b) carbohydrate transport		4
BeG90N16C06	Q5K7D2	Hexose transporter HXT14	(b) carbohydrate transport		2
BeE60C17C02	P38356	Metal homeostatis protein BSD2	(b) metal ion transport	5	6
BeE60C08E01	Q6P7N0	ADP/ATP translocase	(b) mitochondrial transport	2	2
BeZSPN09E08	Q7Z8B6	H(+)-ATPase	(b) proton transport		2
BeE60C03D04	Q7WH61	Putative efflux system transmembrane protein	(b) transport		2
BeE90D08C11	Q35AA5	ATP-binding cassette, sub-family B, member 7	(b) transport	2	
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 6	(b) cell redox homeostasis	2	2

BeE90D18H03	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 5	(b) cell redox homeostasis	5	3
BeE60H19G07	Q4ING2	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	(b) electron transport	8	4
BeE90D07E02	Q4ING2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport	18	9
BeE90D11E10	Q4PFU9	Disulfide-like protein	(b) electron transport		2
BeE60C04G01	O14463	Thioredoxin	(b) response to reactive oxygen species		2
BeE120N20B11	Q92SR2	Putative glutathione S-transferase 4	(m) glutathione transferase activity	6	3
BeE90D16C06	P91252	Probable glutathione S-transferase 3	(m) glutathione transferase activity	2	
BeE60H29C03	Q36TA0	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	(m) oxidoreductase activity (b) metabolism	2	
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	4	2
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	4	3
BeG30N10B09	Q4I159	Putative aminotransferase	(b) biosynthesis		2
BeE60N03F03	Q4P9L4	Glutamine-fructose-6-phosphate transaminase	(b) carbohydrate metabolism	2	
BeG90N10C12	Q802A8	Heterochromatin protein 1 gamma	(b) chromatin assembly or disassembly		2
BeG120N24F09	P07053	Pathogenesis-related protein 1B precursor	(b) defense response		2
BeE60H16G11	Q3TMI6	Origin recognition complex, subunit 5-like	(b) DNA replication		2
BeE60N10H11	Q7PVB7	Kinesin-like protein	(b) microtubule-based movement		2
BeZSPN16B05	Q4E4D1	Choline transporter-like protein 2	(b) phosphate metabolism	2	
BeE60H26A05	Q54SN5	Related to phosphatidylserine decarboxylase	(b) phospholipid biosynthesis	6	10
BeE90D17B02	Q2UFR5	Isoflavone reductase family protein CipA	(b) regulation of nitrogen utilization	9	5
BeE60H29E01	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress	2	2
BeE60N09E09	Q8LG37	AtPH1-like protein	(b) steroid metabolism		2
BeE60N04D09	O00625	Pirin-like protein 1	(b) transcription from RNA polymerase II promoter	12	5
BeE120N37F12	Q4R349	Similar to human armadillo repeat containing 4	(m) binding	3	3
BeE90D08A05	Q4ILJ0	Hypothetical protein	(m) nucleic acid binding	4	4
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	3	2
BeE60H07F03	Q22020	Hypothetical protein	(m) protein binding	2	
BeG30N10E10	Q9VXY3	Dihydrolipoyl transacylase	(m) protein binding		2
BeG30N10B05	Q4ILF9	Chitin synthase class VI	(m) transferase activity, transferring hexosyl groups		2
BeE120N35B10		Super cysteine rich protein; SCRP		6	3
BeG90N07B05	Q5K8Z0	Stomatin-like protein		5	2
BeE30N20B08		Putative elicitor-responsive gene		4	5
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein		3	4
BeG30N09B10		CLB1-like protein			2
BeE30N18G10		Hypothetical protein		3	
BeE60C31H05		Hypothetical protein		15	9
BeG30N15A08		Hypothetical protein		4	
BeE60C16D03		Unknown		7	8
BeE60N01B04		Unknown			6
BeG90N17D12		Unknown		5	5
BeE30N06F05		Unknown		11	5
BeE60C23B10		Unknown		6	4
BeG120N22B10		Unknown			4

BeE90D14D07	Unknown	7	3
BeG30N01C09	Unknown	6	3
BeE30N16A03	Unknown	3	
BeG90N16A06-1	Unknown		3
BeE90D08B11	Unknown	3	3
BeG120N22B01	Unknown		3
BeE90D09D04	Unknown	3	3
BeG30N09G04	Unknown	4	3
BeE60C31A02-1	Unknown		3
BeE90D17B09	Unknown	3	3
BeG60N14E04	Unknown	3	
BeG30N02B03	Unknown	3	
BeE60C19A10	Unknown	4	3
BeE60H29A12	Unknown		2
BeE120N01C01	Unknown		2
BeZSPN12F01	Unknown	2	
BeNSVP09E01	Unknown		2
BeE60H05E07	Unknown		2
BeE60H29E10	Unknown	2	
BeE90D07H03	Unknown	4	2
BeE90D20H11	Unknown		2
BeG30N12G03	Unknown		2
BeE90D04H01	Unknown	2	
BeE30N20D06	Unknown		2
BeG90N18G02	Unknown		2
BeG30N10E11	Unknown		2
BeE60H07D11	Unknown	2	
BeG60N20A07	Unknown		2
BeG90N17C01	Unknown		2
BeE90N13H07	Unknown	2	2
BeE60H17E03	Unknown	2	2
BeE60H08F12	Unknown	3	2
BeE90D09H05	Unknown	2	2

As colunas E100 e E200 correspondem à razão de expressão dos genes em células tratadas na esporulação com cádmio 100 e 200 μM, respectivamente, em relação ao controle sem cádmio. Processo Biológico (b) e Função Molecular (m) representam categorias do Gene Ontology. Swiss Prot corresponde ao código das proteínas presentes neste banco de dados com as quais foi observada similaridade através de BlastX com os respectivos genes de *B. emersonii* (Clone ID).

Tabela S6 - Lista completa dos genes induzidos por cádmio na germinação.

Clone ID	Swiss Prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G100	G200
BeG120N15B05	Q00266	S-adenosylmethionine synthetase	(b) amino acid metabolism	3	3
BeE120N26B11	O60931	Cystinosin	(b) amino acid metabolism	11	10
BeE30N06E01	Q34DS8	Amino acid permease family protein	(b) amino acid transport	2	2
BeG30N13H09	Q3WZJ7	Amino acid transporters	(b) amino acid transport		2
BeE90D18C05	Q752N9	Carbamoyl-phosphate synthase, arginine-specific	(b) glutamine metabolism		2
BeE90N13F05	Q9NL96	Glutathione reductase	(b) glutathione metabolism	2	
BeE30N14F04	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 6	(b) cell redox homeostasis	2	3
BeE90D18H03	Q3M328	Putative glutathione S-transferase 5	(b) cell redox homeostasis	2	5
BeE90D07E02	Q4ING2	NADH-dependent flavin oxidoreductase	(b) electron transport	13	16
BeZSPN10H02	Q7RW00	NADPH oxidase 1	(b) electron transport		2
BeE60H19G07	Q4ING2	NADH:flavin oxidoreductase/NADH oxidase	(b) electron transport	6	
BeE90D18F01	Q754Y9	Glutathione peroxidase 3	(b) response to oxidative stress	2	2
BeE120N20B11	Q92SR2	Putative glutathione S-transferase 4	(m) glutathione transferase activity	2	4
BeE30N15D01	Q7SC51	NADP-dependent alcohol dehydrogenase	(m) oxidoreductase activity	3	3
BeE60H11C04	Q5MJG6	Peroxiredoxins	(m) oxidoreductase activity	2	3
BeE60C16F10	Q8XQU5	Putative oxidoreductase protein	(m) oxidoreductase activity		3
BeE60H29C03	Q36TA0	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase	(m) oxidoreductase activity		2
BeE60C19G01	Q4IHX8	Thioredoxin peroxidase	(m) oxidoreductase activity	3	
BeE60H08E04	Q4WVA8	Quinone oxidoreductase	(m) oxidoreductase activity	2	
BeE60N16E03	Q4P7C0	Alcohol dehydrogenase [NADP+]	(m) oxidoreductase activity	3	
BeE120N37A02	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 1	(m) transferase activity	4	9
BeE30N17E08	P91252	Putative glutathione S-transferase 3	(m) transferase activity	3	3
BeG120N18H03	Q6DDA5	Putative microsomal glutathione S-transferase 2	(m) transferase activity	4	11
BeE60H26E02	Q3L1D0	Hsp100	(b) protein folding	3	2
BeE60H30A07	P36182	Hsp90	(b) protein folding	4	3
BeG90N03H04	O74225	Hsp70-2	(b) protein folding	2	2
BeZSPN11F03	Q7RX42	Hsp10	(b) protein folding		2
BeE60H13D04	Q09912	Protein psi1	(b) protein folding	2	
BeG120N23B05	Q5KPI3	T-complex protein 1, eta subunit	(b) protein folding	2	
BeE60H14B07	Q4P2B7	Arginine-tRNA-protein transferase	(b) regulation of protein catabolism	3	3
BeE60N08H04	Q6PBZ8	Exosome complex exonuclease	(b) RNA processing	2	
BeZSPN17H02	P35551	Fibrillarin	(b) rRNA processing	2	
BeE60H29D03	Q7XZG6	Putative RNA binding protein	(m) nucleotide binding	2	2
BeE90N18D12-1	Q8L460	Putative DNA-damage repair protein DRT111	(m) nucleotide binding	2	
BeG30N08H04	Q4P3W3	Putative ATP-dependent RNA helicase	(m) RNA binding	2	
BeE60H27A03	P53337	Surfeit locus protein 4 homolog	(b) ER to Golgi vesicle-mediated transport	2	
BeG30N19E11	Q8XMG8	Zinc transporter zupT	(b) metal ion transport	2	
BeE60N10A01	P38264	Inorganic phosphate transporter PHO88	(b) phosphate transport		2
BeE60N18F10	O74846	Exocyst complex component sec6	(b) protein transport	2	
BeE120N05F06	Q54HG6	P-type ATPase	(b) proton transport	2	
BeE60C01B07	Q7WXJ8	Probable ferrisiderophore receptor protein, TonB dependent	(b) siderophore transport	2	
BeE60C03D04	Q7WH61	Putative efflux system	(b) transport	2	3

		transmembrane protein			
BeE90D19D04	Q3YB29	ABC transporter, similar to Ycf1	(b) transport		2
BeG30N20G10	Q75HT8	Putative ATP-dependent transmembrane transporter (ABC family)	(b) transport		2
BeE90D17F04	Q3FM35	Inner-membrane translocator:ABC transporter precursor	(b) transport	2	
BeE90D19D08	Q8T665	ABC transporter AbcH.1	(b) transport	2	
BeG30N13H07	Q13685	Angio-associated migratory cell protein	(b) cell motility	3	3
BeE60C06F05	Q9A6V8	Propionyl-CoA carboxylase, beta subunit	(b) fatty acid biosynthesis	2	
BeE90N12C06	Q880E1	Filamentous hemagglutinin, intein-containing	(b) intein-mediated protein splicing	2	
BeG30N19E04	Q5BAC2	Cysteine desulfurase, mitochondrial precursor	(b) metabolism		2
BeE90D04D05	Q5KAB9	Ribosomal protein L14	(b) protein biosynthesis	4	5
BeE60C09E10	Q7WFQ7	Putative methionine sulfoxide reductase	(b) protein metabolism	2	
BeE90D17B02	Q2UFR5	Isoflavone reductase family protein CipA	(b) regulation of nitrogen utilization	7	13
BeE60H29E01	Q75LL0	Universal stress protein (USP)	(b) response to stress	2	
BeE60N16F05	Q5KHZ2	Aerobic respiration-related protein	(b) small GTPase mediated signal transduction	2	
BeE60N04D09	O00625	Pirin-like protein 1	(b) transcription from RNA polymerase II promoter	8	9
BeE120N37F12	Q4R349	Similar to human armadillo repeat containing 4	(m) binding	3	4
BeE60N12F01	Q4WDH3	Adenyl-nucleotide exchange factor	(m) binding		2
BeZSPN11E04	Q59Z14	HEAT-like (PBS lyase) domain	(m) binding		2
BeE90N16B06	Q7Q0S2	WD-repeat protein	(m) binding	2	
BeZSPN15E12	Q66KT3	HEAT-like (PBS lyase) repeat containing 1	(m) binding	2	
BeE60H08G12	Q75K28	NCS-1/frequenin-related protein	(m) calcium ion binding	2	
BeG30N11A12	Q4PGN7	Putative cytochrome c oxidase assembly protein	(m) copper ion binding	2	
BeE60H15G08	Q18691	XAP-5 protein isoform 5-like	(m) protein binding	2	
BeE60C10B01	Q6LUC6	Predicted nucleotidyltransferase	(m) transferase activity	2	
BeE60H16G08		Putative arsenite inducible RNA associated protein		2	5
BeE60C32D08		Putative integral membrane efflux protein		3	
BeZSPN16E09		Ankyrin containing protein		2	
BeE120N27C04		Hypothetical protein		2	
BeE60N18H09		Hypothetical protein		2	
BeG30N06E06		Hypothetical protein		2	
BeE120N30G07		Unknown		2	
BeE120N33E07		Unknown		2	
BeG30N02B03		Unknown		2	2
BeE60H32E11		Unknown		2	
BeE120N37E05		Unknown		2	
BeE60C08G05		Unknown		2	
BeG30N01E08		Unknown		2	2
BeG30N10C07		Unknown		2	2
BeG120N14G12		Unknown		2	
BeE90D17D01		Unknown		2	
BeE120N30B03		Unknown		2	
BeE120N06D02		Unknown		2	
BeE60H26C07		Unknown		2	2

BeG30N08A04	Unknown	2	3
BeE120N28C06	Unknown	2	
BeE60H08F12	Unknown	2	
BeE90D09D04	Unknown	2	4
BeE60H29E10	Unknown	2	
BeE60C16D03	Unknown	3	
BeE90D17B09	Unknown	3	3
BeE90D07H03	Unknown	4	4
BeE60H15D02	Unknown	5	5
BeZSPN15A06	Unknown		2
BeE90D18F07	Unknown		2
BeG60N19B07	Unknown		2
BeG90N18G02	Unknown		2
BeG60N14D12	Unknown		2
BeE60C03A12	Unknown		2
BeG120N09D02	Unknown		2

As colunas G100 e G200 correspondem à razão de expressão dos genes em células tratadas na germinação com cádmio 100 e 200 μM, respectivamente, em relação ao controle sem cádmio. Para maiores detalhes vide Tabela S5.

Tabela S7 – Lista completa dos genes reprimidos por cádmio na esporulação.

Clone ID	Swiss prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	E100	E200
BeE60N07B06	Q6W388	Asparagine synthetase	(b) asparagine biosynthesis	2	
BeE60N10B03	Q7SEH8	Hypothetical protein	(b) ATP synthesis coupled proton transport	2	
BeG90N20H10	Q53GX7	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	(b) electron transport		2
BeE60N16E11	Q65DL0	UDP-glucose 4-epimerase,	(b) galactose metabolism	2	
BeG90N11A02	Q6NYM9	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	(b) glucose metabolism	2	
BeE60N08B06	Q4P9R9	Probable clathrin-associated adaptor complex	(b) intracellular protein transport	2	2
BeE120N35H01	Q5K720	Vesicle-mediated transport-related protein	(b) intracellular protein transport		2
BeE60N03A04	Q8K2P9	Rabl2a protein	(b) intracellular protein transport	4	
BeE90N15E03	Q503Z7	Dynein light polypeptide 4, axonemal	(b) microtubule-based process		2
BeE60N15H01	Q7XQN4	OSJNBa0089K21.2 protein	(b) mRNA processing	2	
BeE60N08H03	Q7QD93	Belongs to the AAA ATPase family	(b) protein catabolism	2	
BeE60N05B04	Q4WTK9	Carboxypeptidase	(b) proteolysis	2	
BeE60N14D09	Q5PPU3	ADP-ribosylation factor-like protein	(b) ribosome biogenesis	2	2
BeE30N10H03	P31320	cAMP-dependent protein kinase regulatory chain	(b) signal transduction	2	
BeE60N14F02	Q6CCZ9	Protein translation factor SUI1	(b) translational initiation	2	
BeE90D19D08	Q8T665	ABC transporter AbcH.1	(b) transport	2	
BeE60N10D10	Q4PCW7	Hypothetical protein	(b) ubiquitin-dependent protein catabolism	2	
BeE60N09H03	Q6CCZ9	JNK-binding protein	(b) ubiquitin-dependent protein catabolism		2
BeE30N14B02	Q7S903	Hypothetical protein	(b) ubiquitin-dependent protein catabolism	2	
BeE120N38D06	Q4DWU0	Hypothetical protein	(m) binding	2	2
BeE90N18E06	Q6CCZ9	Similar to WD repeat membrane protein	(m) binding	2	2
BeNSVP04H09	Q4F6W5	Cell division control protein 31	(m) calcium ion binding		2
BeE60N12E01	Q4PFY7	Myosin regulatory light chain cdc4	(m) calcium ion binding	2	2
BeE60N07E05	Q6DCU1	Myosin regulatory light chain 2,	(m) calcium ion binding	2	
BeE60H08G12	Q75K28	NCS-1/frequenin-related protein	(m) calcium ion binding	2	2
BeE120N07A12	Q9HFY6	Calmodulin	(m) calcium ion binding	2	
BeE60H29D02	Q7ZV94	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1A	(m) kinase activity		2
BeE120N30D02	Q4WUJ7	Myosin type II heavy chain, putative	(m) motor activity	2	
BeE60N10G05	Q9CZJ2	Hsp70-10	(m) nucleotide binding	2	
BeE60H23C11	Q9W227	Contains 1 PPIase cyclophilin-type domain	(m) peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity	2	
BeG120N09D05	Q2PBB6	14-3-3 protein	(m) protein domain specific binding	2	
BeE120N26G06	Q5GMH2	Q8VCX2 Solute carrier family 35 member C2		2	
BeG60N01F08	Q5K7A6	Zinc finger protein		2	
BeE60N18H09		Hypothetical protein		2	2
BeE120N27G09		Hypothetical protein		2	

BeZSPN15F03	Hypothetical protein	2	
BeE90N05E03-1	Putative mitochondrial inner membrane protease		2
BeE60N14G10	Unknown		2
BeE90N01C04	Unknown		2
BeE60N16E09	Unknown		2
BeE120N07D01	Unknown	2	2
BeE60N03C12	Unknown		2
BeE60N13A03	Unknown		2
BeE60N05B05	Unknown		2
BeE120N01H03	Unknown		2
BeE60N11G03	Unknown		2
BeE60N07H03	Unknown	2	2
BeE60N13D03	Unknown		2
BeE120N37D03	Unknown		2
BeE60N19C08	Unknown		2
BeNSVP09G10	Unknown		2
BeE30N14B04	Unknown		2
BeE30N11D01	Unknown	3	2
BeNSVP01A12	Unknown		2
BeE120N31E07	Unknown	2	2
BeE120N30G01	Unknown	3	2
BeE120N20E11	Unknown	2	2
BeE120N09B11	Unknown		2
BeG90N04D05	Unknown		2
BeE60H32E11	Unknown	2	2
BeE60N05F03	Unknown	2	2
BeG90N05H06	Unknown		2
BeNSVP07E10	Unknown		2
BeE120N01C11-1	Unknown	2	2
BeE60C06C11	Unknown	2	2
BeE60N01E03	Unknown	2	2
BeE120N06A04	Unknown	2	2
BeE60N19C09	Unknown	2	2
BeE30N01E07	Unknown	3	2
BeE60N07G07	Unknown	3	2
BeE120N38G07	Unknown		2
BeE60N13A04	Unknown		2
BeE60N06C01	Unknown	4	2
BeE60N13D02	Unknown	3	2
BeE120N26A10	Unknown	2	2
BeE120N03D02	Unknown	3	3
BeE60N08G09	Unknown	4	4
BeE60N12A08	Unknown	2	
BeE60N17E03	Unknown	2	
BeE120N01D06	Unknown	2	
BeE120N07F05	Unknown	2	
BeE120N37E05	Unknown	2	

BeE60N14B10	Unknown	2
BeE60N07B11	Unknown	2
BeE60N03A10	Unknown	4

Para maiores detalhes vide Tabela S5.

Tabela S8 – Lista completa dos genes reprimidos por cádmio na germinação.

Clone ID	Swiss prot	Anotação	Processo biológico/Função molecular	G100	G200
BeE30N15B02	Q7RYW6	Hypothetical protein	(b) amino acid biosynthesis	2	3
BeG120N26D12	Q5KJ92	NAD-specific glutamate dehydrogenase	(b) amino acid metabolism		2
BeE60H28B07	Q4HZJ2	CulA	(b) cell cycle	2	
BeG30N20G08	Q8NIH8	Nuclease Le3	(b) DNA catabolism		2
BeNSVP12G02	Q5BC12	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	(b) gluconeogenesis	2	
BeG60N06G05	P79078	Delta-9 fatty acid desaturase	(b) lipid biosynthesis	2	4
BeG90N18E08	Q8X097	Probable ATP-citrate synthase subunit 1	(b) metabolism	2	
BeE60N12G09	P07436	Tubulin beta-1 chain	(b) microtubule-based movement		2
BeE60H06A02	P48720	Hsp70-1	(b) protein folding	2	
BeE60C13F09	Q9I4A1	Probable multidrug resistance efflux pump	(b) protein secretion	2	
BeG90N09D08	Q6CCZ9	Mitochondrial import inner membrane translocase subunit TIM9	(b) protein targeting	2	
BeE30N10D02	Q9SUA4	OPT2	(b) protein transport	4	2
BeE60N14F02	Q6CCZ9	Protein translation factor SUI1	(b) translational initiation	2	2
BeE30N17A03	Q9FG72	Oligopeptide transporter 1	(b) transport	3	
BeE90D11F01	Q4PGQ1	Multidrug resistance-associated protein Mrp2	(m) nucleotide binding	2	
BeZSPN16C07	Q6P449	Hypothetical RING finger protein	(m) zinc ion binding	2	
BeG60N20E04	Q9VAY7	XAP-5 protein		2	
BeG60N19C12		Antigenic cell wall protein MP2			2
BeG60N03C06		Unknown		2	
BeNSVP09G10		Unknown		2	
BeZSPN10G02		Unknown		2	
BeE90N05D02		Unknown		2	
BeE30N20B03		Unknown		2	
BeZSPN09F05		Unknown		2	
BeZSPN11C05		Unknown		2	
BeG90N03B02		Unknown		2	
BeG90N07C04		Unknown		2	
BeNSVP10D12		Unknown		2	
BeNSVP10C07		Unknown		2	
BeZSPN09E01		Unknown		2	
BeG60N18G09		Unknown		2	2
BeE30N18H03		Unknown		2	
BeG30N12D08		Unknown		2	
BeNSVP11A09		Unknown		2	
BeE120N22C08		Unknown		2	
BeG60N04H08		Unknown		2	
BeE60C24E07		Unknown		2	
BeG90N12C05		Unknown		2	
BeG60N04B05		Unknown		2	
BeG30N10F02		Unknown		2	
BeG60N09D08		Unknown		2	
BeG90N05B09		Unknown		2	
BeE90N12E05		Unknown		2	

BeE90N25C12	Unknown	2	
BeG90N08C07	Unknown	2	
BeE90N26A08	Unknown	2	
BeG90N21E08	Unknown	2	
BeG60N04A07	Unknown	2	
BeG90N09B05	Unknown	2	
BeNSVP02H10	Unknown		2
BeE60N06C09	Unknown		2

Para maiores detalhes vide Tabela S5 e S6.

IX – *CURRICULUM VITAE*

Nome: Raphaela de Castro Georg

Local e data de nascimento: Goiânia, GO, 05 de novembro de 1979.

Educação:

Ensino Médio:

Escola Estadual Lyceu de Goiânia – Goiânia – GO – 1994 a 1996.

Graduação:

Universidade Federal de Goiás – Goiânia – GO

Bacharelado em Ciências Biológicas – 1997 a 2000.

Ocupação:

Bolsista CNPq – 2001 a 2003.

Bolsista FAPESP – 2003 a 2006.

Publicações:

Georg, R.C., Gomes, S.L. Transcriptome analysis in response to heat shock and cadmium in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. (em processo de revisão - revista *Eukaryotic Cell*).

Pugliese, L., **Georg, R.C.**, Fietto, L.G., Gomes, S.L. Expression of the heat shock gene *hsp90* is developmentally regulated in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. (manuscrito em preparação).

Georg, R.C., Gomes, S.L. 2007. Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Gene*. 386:24-34.

Ribichich, K.F., **Georg, R.C.**, Gomes, S.L. 2006. Comparative EST analysis provides insights into the basal aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *BMC Genomics*. 12;7(1):177.

Ribichich, K.F., Salem-Izacc, S.M., **Georg, R.C.**, Vencio, R.Z., Navarro, L.D., Gomes, S.L. 2005. Gene discovery and expression profile analysis through sequencing of expressed sequence tags

from different developmental stages of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell*. 4(2):455-64.