UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Análise de seqüências expressas durante a fase de esporulação do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*

Karina Fabiana Ribichich

Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo
2004

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

Ribichich, Karina Fabiana
R486a Análise de seqüências expressas durante a fase de esporulação do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* / Karina Fabiana Ribichich. -- São Paulo, 2004.
140p.

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

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

574.88 CDD

"Análise de seqüências expressas durante a fase de esporulação do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*"

KARINA FABIANA RIBICHICH

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

Aprovado(a) por:

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

Prof. Dr. SÉRGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ – USP

Profa. Dra. GLAUCIA MENDES SOUZA
IQ – USP

Prof. Dr. FRANCISCO GORGÔNIO DA NÓBREGA
UNIVAP

Profa. Dra. MARIA SUELI SOARES FELIPE
IB - UnB

SÃO PAULO
15 de DEZEMBRO 2004

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

À minha mãe Milka Nora Cordón

Ao meu pai José Ribichich (*in memoriam*)

Ao querido Ariel

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Suely Lopes Gomes, por ter me recebido no seu laboratório como aluna de doutorado, pela orientação competente, por estar sempre disponível para seus alunos, pela dedicação ao trabalho e por gostar do que faz.

Á minha família (Chichín, Mamá, Ale, Vivi, e meus sobrinhos lindos), que apesar da distância estão sempre presentes.

Á Luciana Pugliese da Silva, pela grande ajuda que me brindou nos primeiros anos da minha chegada ao laboratório e pela amizade.

À Raphaela de Castro Georg, pela colaboração, pelo bom do trabalho conjunto, pela sua alegria e pela amizade.

À Sandra Mara Saraiva Fernandes, pelos litros e litros de DM4 feitos, pela competência e cuidado no trabalho, pelos livros emprestados, pela sua serenidade e pela amizade.

À Luci Deise Navarro, pela enorme contribuição feita para este trabalho com a construção de uma das bibliotecas de cDNA e o seqüenciamento, pela grande dedicação ao trabalho, pela sua energia e sua vontade de colaboração, por suas inúmeras virtudes culinárias e pela amizade.

À Tie, pela parceria no karatê, pelos almoços e pela sua grande contribuição ao longo do trabalho, e a Cris, inseparável parceira de preparo de qualificação e de redação de tese.

Ao Prof. Dr. Sérgio Verjovski-Almeida e à equipe de bioinformática, Apuã Paquola, Milton Nishyiama e Abimael Machado pela enorme ajuda com programas de processamento de dados.

Ao Adriano Freitas pela construção e manutenção da base de dados.

À Ricardo, pela grande ajuda com o *Northern* digital.

À Ricardo de Marco e Ari Scattone Ferreira pelos comentários no início deste trabalho.

Aos amigos e colegas atuais Silvia, Michelle, Humberto, e Rogério, e aos antigos Rita e Luciano, pela ajuda na minha chegada no laboratório, Terumi e Denise, que colaboraram comigo no seqüenciamento, e Antônio Carlos, que fazem e fizeram do laboratório um ambiente agradável e que colaboram no dia a dia.

À Dra. Marilis do Valle Marques e Regina Lúcia Baldini, pelas contribuições ao longo de nossos seminários em conjunto, e ao pessoal do laboratório da Dra. Marilis, Valéria, Luiz, Ligia, Elza, José, Vânia, por compartilhar nossos seminários e contribuir para um ambiente agradável.

À Elizety, pela contribuição com a tradução ao português do meu projeto de pós-graduação.

À Ivone, pela cordialidade e sua força no trabalho.

Aos Prof. Dra. Ma. Júlia Manso Alves e Prof. Dr. Walter Colli, pelas conversas proveitosas a nossa chegada ao Brasil, e Ariel, pela ajuda com as fluorescências, e a Renata e Eric pelos papos científicos e não científicos.

Ao Dr. M. Bornens pelos anti-soros contra HsCen1, HsCen2 e HsCen3, ao Dr. M. Wiley pelos anti-soros contra ScCdc31, 20H5 eTtCen e ao Dr. M. Rose pelo anti-soro contra ScCdc31.

À Tânia e Alejandro, pela amizade e pelos longos jantares, pela grande ajuda que nos deram quando chegamos ao Brasil, e pelas pizzas.

Ao Juan e Joli, que deram uma grande força na nossa primeira viagem e que são amigos queridos.

Ao pessoal da pós-graduação, que colaboraram sempre que foi necessário.

Aos meus amigos, colegas e professores da Argentina, que contribuíram para o que eu sou: Raquel, Daniel, Mariana, Abelardo, Mariel, Alicia, Silvia, Andrea, Susana, Daniel, Cecilia, Verónica.

À Raquel e Daniel, pela sua contribuição no meu aprendizado em biologia molecular e pela experiência de trabalho em biologia molecular vegetal no seu laboratório.

Ao Abelardo, pela sua contribuição no meu aprendizado em morfologia vegetal e à Silvia e Andrea que me mostraram o mundo dos fungos.

Aos professores da USP que contribuíram com minha formação.

Ao Instituto de Química da USP pela disponibilidade de recursos e infraestrutura.

À CAPES, pela bolsa de doutorado e à FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao Brasil, que me recebeu com cordialidade e afeto, e me deu a oportunidade de desenvolver o nosso trabalho.

À todos aqueles que por esquecimento não foram citados aqui, mas que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

ÍNDICE

ABREVIATURAS vii
RESUMO ix
ABSTRACT xi
1) INTRODUÇÃO 1
1.1) O modelo *Blastocladiella emersonii.* 1
1.2) O objetivo global de estudo: As seqüências expressas 6
1.3) Os objetivos particulares de estudo: Seqüências com papel potencial na diferenciação celular 11
1.3.1. Os objetivos particulares de estudo 12
1.3.1.1 Centrinas. 12
1.3.1.2 Quinases dependentes de ciclina 19
1.3.1.3 Transportador putativo de hexose 24
2) OBJETIVO GERAL 27
2.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS 27
3) MATERIAIS E MÉTODOS 28
3.1) Vetores de clonagem e expressão 28
3.2) Meios de cultura 28
3.3) Oligonucletídeos 28
3.4) Linhagem de *Escherichia coli* 29
3.5) Condições de cultivo de *Blastocladiella emersonii* para manutenção da cepa 29
3.6) Condições de cultivo sincronizado de *B. emersonii* para preparação de RNA total ou extração de proteínas totais 29
3.7) Construção de bibliotecas de cDNA a partir de mRNA obtido de células na fase de esporulação e de células vegetativas 30
3.7.1 Extração de RNA total e isolamento de mRNA de culturas de *B. emersonii* 30
3.7.2 Construção de bibliotecas de cDNA normais 31
3.7.3 Construção de bibliotecas de cDNA subtrativas 33
3.8) Análise das seqüências isoladas 33
3.8.1 Sequenciamento dos cDNAs. 33
3.8.2 Processamento das seqüências. 34
3.8.3 Anotação das seqüências. 35
3.8.3.1 Avaliação da taxa de evolução molecular das seqüências expressas de *B. emersonii.* 37
3.8.4 *Northern* digital. 38
3.9) Preparo de células competentes de *E. coli* para transformação por eletroporação 38
3.10) Transformação de células competentes de *E. coli* por eletroporação 39
3.11) Minipreparação de DNA plasmidial. 39
3.12) Marcação de sonda radioativa. 40
3.13) Extração de DNA total de culturas de *B. emersonii* 40
3.14) *Southern-blot* genômico. 42
3.15)*Northern-blot.* 43
3.16) Amplificação rápida dos extremos do cDNA ("RACE") 44
3.17) Clonagem em vetores de expressão 45
3.18) Purificação das proteínas de fusão 46
3.19) Obtenção de anticorpos específicos 47

3.20) Extração de proteínas totais de culturas de *B. emersonii*..... 47
3.21) *Western-blot*. 48
3.22) Avaliação da capacidade de ligação a cálcio. 49
3.23) Ensaio de imunolocalização. 49
3.24) Ensaios para a avaliar a influência de diferentes açúcares ou de análogos não metabolizáveis nos fenótipos de células de *B. emersonii* na fase de esporulação..... 50
3.25) Análise filogenética. 51
4) RESULTADOS..... 52
4.1) Obtenção, processamento e anotação das seqüências expressas, e avaliação *in silico* dos perfis de expressão. 52
4.2) Caracterização das seqüências com possível papel na diferenciação celular..... 66
4.2.1 Centrinas de *B. emersonii*..... 66
4.2.1.1 Análise das seqüências dos cDNAs das centrinas de *B. emersonii*..... 68
4.2.1.2 Expressão dos genes Becen1 e Becen2. 72
4.2.1.2.1 Becen1..... 72
4.2.1.2.2 BeCen2..... 77
4.2.2 Quinases dependentes de ciclina de *B. emersonii*. 80
4.2.2.1 Análise das seqüências de cDNA das quinases dependentes de ciclina de *B. emersonii*. 81
4.2.2.2 Expressão dos genes BeCdk1 e BeCdk2. 86
4.2.2.2.1 BeCdk1..... 86
4.2.2.2.2 BeCdk2..... 90
4.2.3 Transportador putativo de hexose de *B. emersonii*. 91
5) DISCUSSÃO..... 100
5.1) Obtenção, processamento e anotação das seqüências expressas, e avaliação *in silico* dos perfis de expressão..... 100
5.2) Estudo sobre as centrinas..... 106
5.3) Estudo sobre quinases dependentes de ciclinas. 110
5.4) Estudo sobre um transportador putativo de hexose. 114
6) CONCLUSÕES..... 120
7) BIBLIOGRAFIA..... 122
8) CURRICULUM VITAE..... 139

ABREVIATURAS

ATP – Adenosina trifosfato

AMPc – Adenosina monofosfato cíclico

cDNA – DNA complementar

dCTP – 2'-desoxirribonucleotídeo-5'trifosfato de citidina

DEPC – Dietilpirocarbonato

DNA – Ácido desóxiribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

DO – Densidade ótica

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EGTA – Ácido etilenoglicol-bis-aminoetiletertetracético

g – Unidades de gravidade

h – Hora

IFI – imunofluorescência indireta

IPTG – Isopropil β-D-galactopiranosídeo

kb – Quilobase

kDa – Quilodáltons

M – Molar

mg – Miligrama

Min – Minutos

ml – Mililitro

mM – Milimolar

MOPS – Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

mRNA – Ácido ribonucléico mensageiro

nm – Nanômetro

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

pb – Pares de base

PBS – Tampão fosfato salino

PCR – reação em cadeia pela polimerase

PYG – Peptona - extrato de levedura - glicose

RNA – ácido ribonucléico

RNase – Ribonuclease

SDS – Dodecilsulfato de sódio

TBE – Tampão Tris borato EDTA

Tris – hidroxometil aminometano

UV – luz ultravioleta (254 nm)

μg – micrograma

μl – microlitro

x – vezes concentrado

X-Gal – 5-bromo, 4-cloro, 3-indolil β-D-galactosídeo

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

RESUMO

Blastocladiella emersonii é um fungo aquático da classe dos quitridiomicetos, notável pelas mudanças morfogenéticas que ocorrem durante o seu ciclo de vida. Neste trabalho isolamos 8.495 seqüências expressas (ESTs) deste fungo, que representam 3.226 seqüências únicas putativas. Destas seqüências, 37% foram classificadas segundo o processo biológico onde estariam envolvidas, de acordo com o sistema de anotação do *Gene Ontology* (GO). Analisamos os perfis de expressão *in silico* das ESTs usando estatística Bayesiana e os resultados obtidos foram validados por *Northern blot* para sete perfis de expressão selecionados. Pudemos encontrar boa correlação entre vários padrões de expressão e determinados processos biológicos. Foram selecionadas algumas seqüências potencialmente envolvidas com a esporulação do fungo para melhor caracterização. Analisamos a expressão de dois genes codificando centrinas (BeCen1 e BeCen2) pertencentes a subfamílias distintas. Centrinas são proteínas ligantes de cálcio envolvidas em diferentes processos como o direcionamento do aparelho flagelar e a duplicação dos centros organizadores de microtúbulos (MTOCs). Observamos que os níveis da proteína BeCen1, que não havia sido descrita em fungos, apresentam um máximo aos 150 min da esporulação, defasado do pico de expressão do seu mRNA que ocorre aos 90 min deste estágio. A proteína BeCen2 está presente em níveis constantes durante todo a ciclo de vida do fungo, embora o seu mRNA apresente um pico de expressão aos 120 min da esporulação. Experimentos de imunofluorescência localizaram a proteína BeCen1 no citoplasma e no corpo basal do zoósporo. Estes dados sugerem que BeCen1 atue na re-orientação e movimento dos corpos basais e BeCen2 na duplicação dos MTOCs. Investigamos também a expressão de dois genes codificando proteína-quinases dependentes de ciclina putativas (BeCdk1 e BeCdk2). Apenas uma Cdk (Cdk1) foi descrita em fungos como diretamente envolvida no controle do ciclo celular.

Ambos os genes apresentam expressão diferencial, com níveis máximos de mRNA para os dois casos aos 90 min da esporulação. Por outro lado, a proteína BeCdk1 está presente durante todo o ciclo de vida do fungo e foi localizada no núcleo e no capacete nuclear dos zoósporos. Um transportador putativo de hexose (Bemst) foi também analisado, com base na regulação por glicose de genes envolvidos com o ciclo celular observada em eucariotos. Verificou-se que os níveis do mRNA de Bemst diminuem drasticamente durante a esporulação, mas glicose ou outras hexoses não afetaram a expressão de Bemst.

ABSTRACT

Blastocladiella emersonii is an aquatic fungus that belongs to the class of chytridiomycetes, notable for the morphogenetic processes which occur during its life cycle. In this work we have isolated 8,495 expressed sequence tags (ESTs) from this fungus, representing 3,226 putative unigenes. From these unigenes, 37% were classified into a biological process, as a result of Gene Ontology (GO) annotation. Furthermore, we analyzed the expression profile *in silico* of each transcript using Bayesian Statistics and seven of these profiles were validated by Northern blot analysis. In addition, we found a good correlation between several of these expression patterns and certain biological processes. Some ESTs potentially involved in the sporulation of the fungus were selected to be further characterized. We analyzed the expression of two genes encoding two centrins (BeCen1 and BeCen2) of distinct subfamilies. Centrins are calcium-binding proteins involved in different processes such as basal body orientation and duplication of the microtubule-organizing centers (MTOCs). The amount of BeCen1, a centrin ortholog not previously described in fungi, presents a maximum at 150 min of sporulation, whereas the peak of its mRNA occurs at 90 min of this stage. Protein BeCen2 presents constant levels during the entire life cycle of the fungus, even though its mRNA shows a peak of expression at 120 min of sporulation. In addition, immunofluorescent studies localized BeCen1 in the cytoplasm and the basal body of zoospores. These results suggest that BeCen1 plays a role in re-orientation and movement of basal bodies and BeCen2 in MTOCs duplication. We also investigated the expression of two genes encoding putative cyclin-dependent protein kinases (BeCdk1 and BeCdk2). Only one type of Cdk (Cdk1) directly involved in cell cycle control has been described in other fungi. Both genes were found to be differentially expressed, with maximum mRNA levels being detected in either case at 90 min of sporulation. In contrast, BeCdk1 is present throughout the life cycle of the fungus and was

immunolocalized in the nucleus and the nuclear cap of zoospores. A putative hexose transporter (Bemst) was also investigated, taking into account the regulation by glucose of cell cycle controlled genes in eukaryotes. We found that Bemst mRNA levels decrease drastically during sporulation, but glucose and other hexoses had no effect on Bemst expression.

1) INTRODUÇÃO

1.1) O modelo *Blastocladiella emersonii*

Blastocladiella emersonii é um fungo aquático saprófita pertencente à ordem Blastocladiales, classe dos Quitridiomicetos (Alexopoulus *et al.*, 1996), cuja estrutura, ultraestrutura e bioquímica tem sido estudada extensivamente, em relação com outros quitridiomicetos, nos últimos 50 anos. O fungo foi isolado pela primeira vez por Edward C. Cantino em 1949 (Cantino, 1951), e finalmente descrito como uma nova espécie do gênero *Blastocladiella* chamada *Blastocladiella emersonii* por Cantino e Hyatt em 1953 (Cantino & Hyatt, 1953). Os quitridiomicetos ou quitrídios são organismos morfologicamente simples, que possuem como característica comum a formação de zoósporos com um flagelo único e de localização posterior.

Os quitridiomicetos juntamente com os zigomicetos, os ascomicetos e os basidiomicetos constituem o grupo dos chamados "fungos verdadeiros" (Alexopoulus *et al.*, 1996). Este primeiro grupo é filogeneticamente antigo contando com registros fósseis que datam de 400 milhões de anos (Powell, 1993). Este dado junto com os de filogenia molecular baseados no RNA ribossomal e algumas proteínas, coloca este grupo divergindo precocemente na linhagem dos fungos (Van de Auwera & De Wachter, 1996; Heckman *et al.*, 2001). Embora o grupo possua esta posição taxonômica particular e seja formado por saprófitas e por alguns patógenos de diversos organismos, entre eles plantas, animais e fungos, apenas algumas espécies da ordem Blastocladiales tem sido estudadas sob o ponto de visto bioquímico.

O fungo *B. emersonii* é particularmente apropriado aos estudos de desenvolvimento (Lovett, 1975; Jaworsky & Thomson, 1980; Bonato *et al.*, 1987), embora não seja ainda possível

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

fazer testes que envolvam manipulação genética. Seu ciclo de vida apresenta duas fases durante as quais ocorrem transformações celulares notáveis: a germinação (seguida do crescimento) e a esporulação (seguida pela produção de zoósporos) (Figura 1). Ambas as fases são rápidas e podem ser induzidas com um alto grau de sincronia (Lovett, 1975).

No processo de germinação, o zoósporo, uma célula uninucleada móvel e sem parede celular, retrai seu flagelo, forma um cisto produzindo uma parede celular rica em quitina, e produz um rizoide primário ou tubo de germinação que se desenvolve em um sistema de rizoides. Basicamente, a germinação pode ser desencadeada pela adição de meio rico em nutrientes ou na presença de uma solução inorgânica contendo K^+ e outras sais (Soll & Sonneborn, 1972), em paralelo com um aumento transiente de AMP cíclico intracelular até a formação do cisto (Vale *et al.*, 1976; Gomes *et al.*, 1978), e um efluxo de Ca^{++} (Soll & Sonneborn, 1972; Gomes *et al.*, 1980), que atuariam como mediadores do processo. Inibidores da fosfodiesterase de AMP cíclico também são indutores específicos da germinação (Silverman & Eptein, 1975 e Menucci *et al.*, 1978 apud Gomes *et al.*, 1980). A maioria das células encontra-se na forma de cistos 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 não acompanhadas de divisão celular produzindo um cenócito (Lovett, 1975).

A carência de nutrientes, a qualquer momento de seu 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 apud Ingebretsen & Sanner, 1976). Os esporângios de resistência são formados em condições adversas para o crescimento e demoram vários dias para

amadurecer; os zoosporângios são produzidos em condições normais de crescimento e amadurecem em poucas horas. A esporulação é induzida em uma solução tamponada contendo Ca^{++}, 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).

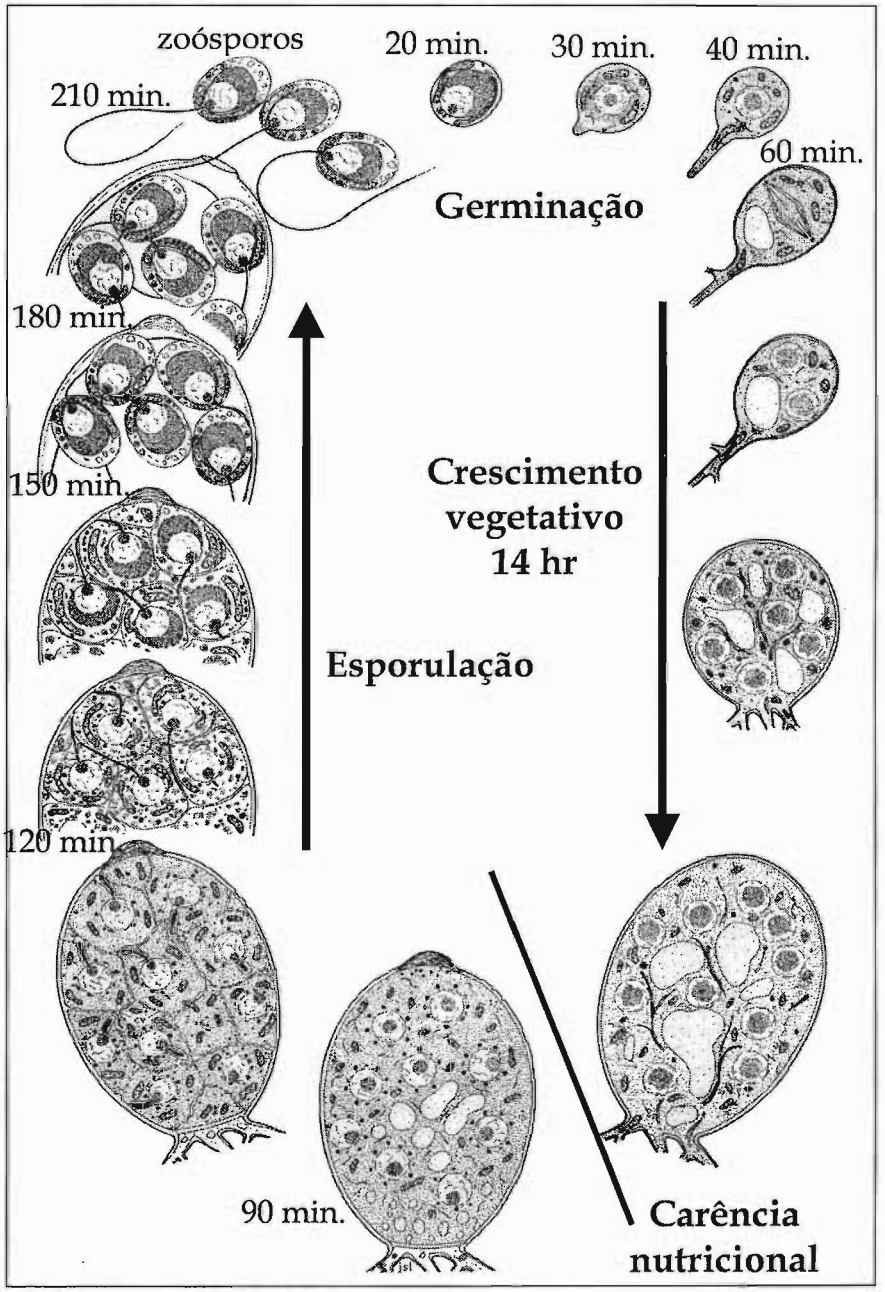


Figura 1. Esquema do ciclo de vida de *Blastocladiella emersonii* (modificado de Lovett, 1975)

Durante o processo de diferenciação, o esporângio desenvolve uma parede basal transversal e uma papila de descarga, 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 cistos (Lovett, 1975). Depois da germinação, as células podem retomar o crescimento caso encontrem as condições nutricionais adequadas. No restante desta primeira parte da introdução nos referiremos às características do zoosporângio que foi o objeto deste estudo.

Em cultivos de uma única geração, a fase de germinação e crescimento requer cerca de 16h, utilizando-se um meio rico em nutrientes e mantendo-se as células a 19°C de temperatura. A esporulação pode ser induzida em tempos tão curtos quanto 1,5h após a indução da germinação e desta forma pode-se obter cultivos de ciclos curtos de crescimento (cultivos microcícliclos). Este processo de diferenciação é sincrônico e culmina com a produção dos zoósporos após 3,5-4h a 27°C. Ao final do ciclo de vida completo de *B. emersonii* formam-se em média 250-300 zoósporos por cada célula vegetativa inicial.

A citodiferenciação de *Blastocladiella* ao longo do seu ciclo de vida é conhecida em detalhe, devido a estudos feitos com microscopia óptica e eletrônica (Lovett, 1975). Estas observações revelam o zoósporo como uma célula altamente diferenciada, possuindo um típico flagelo eucariótico localizado posteriormente; um corpúsculo basal e um segundo centríolo pequeno; microtúbulos que se conectam com a membrana nuclear e o capacete nuclear (uma organela de membrana dupla que contém todos os ribossomos e envolve a parte posterior do núcleo); uma mitocondria única gigante, localizada abaixo do núcleo, próxima ao flagelo; um complexo formado por corpúsculos e grânulos lipídicos; grânulos de glicogênio; vesículas apicais e partículas gamma (corpos densos rodeados por membrana e geradores de corpos

multivesiculares que podem contribuir com a formação da parede celular durante o encistamento) (Cantino *et al.*, 1963; Lessie & Lovett, 1968).

Durante a germinação, o flagelo é retraído, os microtúbulos despolimerizam-se, a célula torna-se esférica produzindo uma parede celular rica em quitina, os ribossomos presentes no capacete nuclear dispersam-se e surge um retículo endoplasmático e vesículas de Golgi. Desaparecem as partículas gamma produzindo-se vesículas que se fundem com a membrana da célula; a mitocondria única divide-se em várias de menor tamanho e também ocorre a formação do tubo germinativo, que mais tarde transforma-se num sistema de rizoides (Lessie & Lovett, 1968). Os rizoides transportam seletivamente nutrientes ao interior da célula (Kropf & Harold, 1982).

Durante o crescimento vegetativo, a mitose não é acompanhada de citocinese e a célula transforma-se em um cenócito. O citoplasma contém uma distribuição normal de organelas, embora a grande maioria dos ribossomos não esteja associada ao sistema de endomembranas.

Durante a esporulação, a formação do zoosporângio caracteriza-se por uma série de mudanças notáveis das quais as mais evidentes são a formação de um septo basal, que separa o corpo multinucleado dos rizoides, e a formação de uma papila de descarga por onde saem os zoósporos. A diferenciação do zoósporo implica na formação do axonema flagelar e o aparecimento de grupos de vesículas que progressivamente envolvem o flagelo em expansão e que se fundem para produzir uma rede tridimensional de planos por onde se produzem as divisões celulares ou citocinese. Os eventos seguintes completam os arranjos necessários para a formação dos zoósporos totalmente diferenciados (Lessie & Lovett, 1968).

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

1. 2) O objetivo global de estudo: As seqüências expressas

Uma questão fundamental em biologia do desenvolvimento é o estudo da expressão diferencial de genes que são necessários para a progressão ordenada das etapas da diferenciação celular. As taxas e os padrões de síntese de RNA e proteínas têm sido estudados em *B. emersonii* abrindo a possibilidade de integrar a informação sobre as mudanças morfológicas com as variações nos níveis da atividade celular.

Durante o transcurso de seu ciclo de vida, *B. emersonii* apresenta padrões de biossíntese distintos. A informação disponível proveniente da medida de variáveis como volume celular, peso seco, ácidos nucleicos, proteína solúvel e conteúdo de glicogênio, indica a existência de um crescimento exponencial balanceado durante a etapa principal de crescimento. Cerca de quarenta minutos após a germinação, ocorre um aumento na quantidade de RNA por célula em função do tempo seguido por um aumento do peso seco, em seguida de proteína e finalmente de DNA. Esta defasagem leva a um aumento na relação RNA/proteína para o cenócito em crescimento. A velocidade de acúmulo de RNA e proteína, não diminui durante o período de síntese de DNA e cariocinese. Após a indução da esporulação, o peso seco e o conteúdo de RNA, proteína e DNA continuam aumentando por algum tempo, porém com uma diminuição nas velocidades. Finalmente, alcançam um máximo neste estágio em tempos específicos, e na etapa final da formação dos zoósporos, a síntese mostra um decréscimo com exceção do DNA cuja diminuição é praticamente desprezível (Lovett, 1975).

Se considerarmos as diferenças de biossíntese, as maiores alterações nas taxas de acúmulo de RNA e proteínas ocorrem no início e no final do ciclo de crescimento. Em cada caso as variações correlacionam-se com um período de rápida diferenciação celular.

Das duas fases do ciclo de vida, a germinação é a etapa estudada em maior detalhe (Lovett, 1968; Soll & Sonneborn, 1971a; Soll & Sonneborn, 1971b; Jaworsky & Thomson, 1980; Van Brunt & Harold, 1980; Jaworsky & Stumhofer, 1981, 1984; Jaworsky & Wilson, 1989; Silva *et al.*, 1987). A maior parte das mudanças estruturais conhecidas durante a germinação parece não requerer a transcrição, ou a tradução concomitantes (Lovett, 1968; Soll & Sonneborn, 1971a; Soll & Sonneborn, 1971b; Silva *et al.*, 1987). Durante a fase precoce da germinação, a síntese de proteínas parece dever-se em sua maior parte a mRNAs sintetizados durante a esporulação, armazenados no zoósporo (Silva *et al.*, 1987). Inclusive, as evidências sugerem a existência de uma população de mRNAs preferencialmente traduzidos (Jaworski & Stumhofer, 1981). A ocorrência de um controle pós-traducional também se verifica através da degradação de proteínas específicas (Jaworski & Stumhofer, 1984; Silva *et al.*, 1987). Em uma etapa tardia, a maioria das proteínas sintetizadas, correspondem a novos mRNAs. Isto indica que ao longo da germinação do zoósporo, estão atuando níveis múltiplos de regulação envolvendo controles transcricionais, traducionais e pós-traducionais (Silva *et al.*, 1987).

A indução da fase de esporulação gera uma mudança drástica no programa de expressão gênica com alterações nas espécies de mRNAs traduzíveis e na síntese de proteínas. Não há conservação ou degradação preferencial dos mensageiros transcritos durante o crescimento. Sem dúvida, o mRNA transcrito durante a esporulação precoce é preferencialmente degradado, em contraste com aquele sintetizado durante a esporulação tardia, que é conservado no zoósporo (Jaworski & Thomson, 1980). Jaworski & Wilson (1989) propuseram a existência de pelo menos duas classes regulatórias de mRNAs contidos nos zoósporos denominadas GPRNA (***growth phase RNA***) e LSRNA (***late sporulation RNA***), representando mRNAs sintetizados durante a fase de crescimento e a esporulação tardia, respectivamente. Durante a esporulação, uma parte dos GPRNAs encontra-se associado aos polirribossomos porém faz uma transição a

monorribossomos ao final desta etapa. Então, são sintetizados os LSRNAs (aproximadamente nos 30 minutos finais), que se associam aos polirribossomos. Estes resultados sugeriram a existência de um padrão específico na esporulação para o aparecimento dos transcritos. GSRNAs e monorribossomos mostram –se inativos em um sistema de tradução *in vitro*, em contraste com os LSRNAs, muito ativos neste sistema.

Embora a degradação protéica seja especialmente alta durante este período (Lodi & Sonneborn, 1974), a regulação da expressão gênica durante a esporulação parece ocorrer principalmente em nível transcricional (Silva *et al.*, 1986). A taxa de acúmulo de RNA total cai drasticamente após a indução da esporulação, mas ocorre a síntese de RNA novo, que provavelmente são mRNAs necessários à seqüência de eventos subseqüentes, segundo infere-se dos efeitos da actinomicina D adicionada a células em diferentes tempos pós-indução. A adição deste inibidor de transcrição no início da diferenciação bloqueia a formação da papila por completo, e a conversão dos macrotúbulos nas cisternas precursoras das partículas gamma. Entretanto, adicionando-se nas horas mais tardias, as papilas e as cisternas são formadas embora estas últimas não apresentem os grânulos que se observam nas células não tratadas. Quando a actinomicina D é adicionada na metade da fase de esporulação, a fase final da diferenciação durante a formação do zoósporo é inibida (Murphy & Lovett, 1966 apud Lovett, 1975).

Apesar da síntese de RNA, o problema da taxa de degradação impede que se conheça a quantidade real gerada. Também se desconhece quanto destas mudanças são controladas por mecanismos regulatórios específicos associados com a diferenciação, enquanto as alterações quantitativas poderiam ser um fenômeno regulado de forma independente. As transformações que se produzem são numerosas e implicam na necessidade de uma variedade de materiais novos: flagelo, fusão mitocondrial, formação do capacete nuclear onde ficam armazenados os ribossomos, partículas gamma, microtúbulos e vesículas que determinam os planos de divisão

celular. É possível que parte ou todos estes materiais sejam produto de mudanças geradas durante a formação do zoosporangio ou na última parte da fase de crescimento, mais do que no decorrer da diferenciação do zoósporo. Neste sentido, é especialmente interessante analisar os genes que expressam-se mais durante a fase de esporulação e que poderiam estar envolvidos nos eventos específicos de diferenciação, como os relacionados com a citocinese, que só ocorre no final desta etapa.

Há vários estudos com enfoque no ciclo de vida de *B. emersonii* que descrevem a observação de mudanças nas taxas de acúmulo de RNA e de proteínas, e nas espécies traduzíveis de RNA e na síntese de proteínas (Loddi & Sonneborn, 1974; Jaworsky & Thomson, 1980; Silva et al., 1986, 1987), como também informam as variações na expressão e a caracterização de proteínas específicas (Behrens & Maia, 1986; Bonato *et al.*, 1987; Marques *et al.*, 1992; Etchebehere *et al.*, 1993). Entretanto, nenhum estudo até o presente trabalho tinha investigado as mudanças na expressão global de genes relacionados com a esporulação e, até o momento deste estudo, o conhecimento sobre os genes expressos em *B. emersonii* limitava-se aos RNA ribossomais e oito seqüências codificadoras de proteínas (Forster *et al.*, 1990; Marques & Gomes, 1992; de Oliveira *et al.*, 1994; Stefani & Gomes, 1995; Van der Auwera & De Wachter, 1996; de Souza & Gomes, 1998; Rocha & Gomes, 1998, 1999; Simão & Gomes, 2001; Fietto *et al.*, 2002).

Uma forma relativamente rápida de obter-se informações sobre a expressão de genes e seqüências codificantes de genomas não caracterizados é o sequenciamento de um grande número de clones de cDNA (*Expressed sequence tags* ou ESTs) selecionados ao acaso (Adams *et al.*, 1991). Abordagens deste tipo vêm sendo desenvolvidas em humanos (Adams *et al.*, 1991; Hillier *et al.*, 1996; Camargo *et al.*, 2001; Dias Neto *et al.*, 2000; Brandenberger *et al.*, 2004), outros animais (Waterston *et al.*, 1992; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003; Sharov *et al.*, 2003; Carninci *et al.*, 2003; Putta *et al.*, 2004), protozoários (Porcel *et al.*, 2000; Kappe *et al.*, 2001),

plantas (Newman, 1994; Vettore *et al.*, 2003; Fei *et al.*, 2004; Sterky *et al.*, 2004) e fungos (Nelson *et al.*, 1997; Trail *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2002; Goldman *et al.*, 2003; Felipe *et al.*, 2003) entre outros organismos. A comparação dos dados obtidos com as seqüências de proteínas existentes nas bases de dados públicas permite classificar os genes segundo uma categoria funcional putativa. Quando os dados são obtidos de bibliotecas não normalizadas (ou seja, que não sofrem um passo de substração dos mRNAs mais abundantes) espera-se que as proporções dos mRNAs da célula estejam representadas nestes dados (Bonaldo *et al.*, 1996; Soares *et al.*, 1994). Isto permite avaliar a abundância das ESTs, de modo a poder designar-se uma identidade às variações tanto qualitativas como quantitativas (Ewing *et al.*, 1999; Iranfar *et al.*, 2001). As ESTs refletem a complexidade da expressão gênica num dado momento, em diferentes tecidos, tipos celulares ou estágios de desenvolvimento. Isto tem permitido também descobrir seqüências características de doenças específicas (Brentani *et al.*, 2003), patógenos (Kim *et al.*, 2001) ou de determinados estresses (Frank *et al.*, 2004).

Neste projeto desenvolveu-se um programa de sequenciamento de clones de ESTs de *B. emersonii* obtidos a partir de mRNAs de células de esporulação e células vegetativas. As seqüências foram processadas em seu conjunto e anotadas (identificação putativa) seguindo a classificação do *Gene Ontology Consortium* (2001) que visa padronizar os sistemas de anotação. O conjunto de ESTs foi também avaliado pelo perfil de expressão *in silico*, identificando-se genes diferencialmente expressos durante a esporulação, alguns dos quais foram testados e confirmados por *Northern-blot*. Finalmente, se escolheram seqüências com um potencial papel na diferenciação celular, particularmente na que ocorre durante a esporulação, para uma melhor caracterização.

1. 3) Os objetivos particulares de estudo: Seqüências com papel potencial na diferenciação celular.

A nossa hipótese para a seleção desses genes foi que mecanismos regulatórios comuns aos eucariotos e genes específicos envolvidos nesses mecanismos seriam compartilhados por *B. emersonii*. Entretanto, *este fungo* poderia apresentar genes e mecanismos mais próximos dos encontrados em protozoários, plantas e mamíferos do que em fungos superiores, devido à sua posição taxonômica basal no clado dos fungos (Van de Auwera & De Wachter, 1996; Heckman *et al.*, 2001).

Nesse sentido decidimos investigar genes que tivessem papeis *chave no controle do ciclo celular* nos eucariotos e genes com *potencial papel* no desenvolvimento celular através de *sinais nutricionais*. Os genes foram escolhidos seguindo os seguintes critérios:

-O ciclo celular em eucariotos possui dois eventos principais: a replicação dos cromossomos durante a fase S e a sua segregação durante a mitose ou fase M. Antes da segregação dos cromossomos, os centros organizadores de microtúbulos (conhecidos por sua sigla em inglês MTOCs) duplicam-se e separam-se; a duplicação é essencial para a montagem do fuso mitótico (defeitos nos MTOCs causam a inibição da citocinese entre as fases G_2/M do ciclo celular) (Ivanovska & Rose, 2001; Arlot-Bonnemains & Prigent, 2002). Os MTOCs são organelas praticamente universais entre os eucariotos, mas que possuem diversidade morfológica e diferente grau de complexidade. Assim, recebem nomes como centrossoma (em células que possuem centríolos, não flagelares, não ciliadas, como a maioria das células dos mamíferos), corpo basal (em células flagelares ou ciliadas), e corpo polar do fuso ou *spindle pole body* (SPB) (em células sem centríolos como as dos fungos superiores). Membros da família das centrinas possuem um papel fundamental na duplicação dos MTOCs.

-Na maioria das células as fases S e M estão acopladas, possuindo pontos de controle que asseguram a progressão ordenada ao longo do ciclo celular (Broek *et al.*, 1991). O controle do ciclo celular parece ter mecanismos comuns entre os eucariotos, dependendo da ativação e inativação apropriada de membros da família de quinases dependentes de ciclina (Cdks).

-A esporulação em *B. emersonii* é induzida por mudanças nutricionais drásticas. Em um estudo feito nos anos oitenta (Correa & Lodi, 1986), os autores observaram que concentrações relativamente baixas de glicose como 0,1% (5,5 mM) e de alguns aminoácidos como triptofano (1 mM), bloqueavam a esporulação, apresentando-se as células em sua maioria não papiladas. Em alguns trabalhos (Newcomb *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1999; Madi *et al.*, 1997), vem se indicando a existência de uma relação entre transportadores-sensores e metabolismo de glicose, e regulação de genes envolvidos com o ciclo celular.

Selecionamos cinco genes de interesse para análise posterior, com base nas seqüências clonadas em nossas bibliotecas e nos critérios mencionados: dois genes que codificam centrinas pertencentes às duas subfamílias descritas na literatura, dois genes que codificam quinases dependentes de ciclinas, e um gene que codifica um transportador putativo de hexose. As características de cada um desses genes que levaram à sua escolha serão analisadas a seguir.

1.3.1) Os objetivos particulares de estudo.

1.3.1.1 Centrinas.

A centrina é membro da superfamília das proteínas do tipo calmodulina com uma massa molecular relativa de 20kDa e com quatro domínios *EF-hand* de união a cálcio. A superfamília é formada por numerosas famílias que surgiram do ancestral eucarioto via duplicação gênica

(Nakayama *et al.*, 1992). O domínio *EF_hand*, descrito pela primeira vez por Moews e Kretsinger (1975 apud Moncrief *et al.*, 1990) consiste de 29 aminoácidos em uma conformação de uma hélice, uma alça de ligação a cálcio, e outra hélice. A ligação a cálcio é coordenada por seis resíduos que usualmente possuem cadeias laterais contendo oxigênio e cujas posições são aproximadas pelos vértices de um octaedro (Moncrief *et al.*, 1990).

A família das centrinas evoluiu de um precursor comum de quatro domínios *EF-hand* e inicialmente foi considerada uma unidade (Nakayana *et al.*, 1992). A centrina foi inicialmente isolada dos rizoplastos (ou raízes flagelares) da alga verde unicelular *Tetraselmis striata* (Salisbury *et al.*, 1984), onde é responsável pela contração das fibras sensíveis a cálcio que conectam os corpos basais entre sim e estes ao núcleo. As fibras dos rizoplastos estão envolvidas na localização, orientação e segregação dos corpos basais (Wright et al., 1985; McFadden et al., 1987; Taillon et al., 1992). Neste sentido, estudos de imunofluorescência em *Chlamydomonas reinhardtii* mostraram mudanças na distribuição e na atividade do sistema de fibras baseado em centrina durante a mitose, indicando seu importante papel importante nos eventos de re-estruturação e de contração que ocorrem durante este processo (Salisbury *et al.*, 1988). Outro conjunto de fibras presentes na zona de transição entre o corpo basal e o axonema também possue centrina na sua constituição, sofrendo contração na presença de cálcio, e com envolvimento na excisão do flagelo (Salisbury *et al.*, 1987; Sanders & Salisbury, 1989; Sanders & Salisbury, 1994).

A centrina é encontrada geralmente nas estruturas centrossômicas em eucariotos (Figura 2a). Homólogos da centrina foram encontrados em distintos organismos incluindo fungos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schyzosaccharomyces pombe* (Baum *et al.*, 1986; Paoletti *et al.*, 2003), protistas (Meng *et al.*, 1996; Madeddu *et al.*, 1996; Levy *et al.*, apud Middendorp *et al.*, 1997), plantas (Klink & Wolniak, 2001; Tsai & Wolniak, 2001; Blackman *et al.*, 1999) e

vertebrados (Ohta *et al.*, 1990; Ogawa & Shimizu, 1993; Lee & Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Paoletti *et al.*, 1996). Em fungos que não possuem aparelho flagelar, as centrinas estão localizadas em uma região especializada da membrana nuclear denominada meia-ponte (ou *half-bridge*), adjacente ao SPB, onde inicia-se a duplicação deste MTOC (Baum *et al.*, 1986; Spang *et al.*, 1993; Paoletti *et al.*, 2003). Enquanto em fungos foi caracterizada apenas uma centrina, em mamíferos foram descritas até dez isoformas diferentes. Entretanto, a maior parte da proteína não está associada a centrossomos (Paoletti *et al.*, 1996).

Quando Middendorp e colaboradores (1997) clonaram a terceira isoforma de humano (HsCen3), mais próxima à centrina de *S. cerevisiae* (ScCdc31) que à centrina de *C. reinhardtii* (CrCen), propuseram a existência de duas subfamílias divergentes: a subfamília do tipo *Chlamydomonas reinhardtii* e a subfamília do tipo *Saccharomyces cerevisiae.* As subfamílias podem distinguir-se basicamente pela porcentagem de identidade das seqüências (os membros da subfamília tipo *C. reinhardtii* compartilham entre 65-71% de identidade entre si, enquanto apenas possuem 50-51% de identidade com os membros da subfamília tipo *S. cerevisiae*), assim como por variações específicas nos domínios *EF-hand* e pela presença ou ausência do motivo LY no carboxi-terminal (Middendorp *et al.*, 1997). A primeira subfamília foi originalmente formada por CrCen, as isoformas de Homo sapiens HsCen1 e HsCen2, e a do camundongo MmCen1, e a segunda subfamília esteve formada por ScCdc31, HsCen3 e MmCen3. À primeira subfamília pode se adicionar a centrina 4 (HsCen4) clonada e caracterizada recentemente (Gavet *et al.*, 2003).

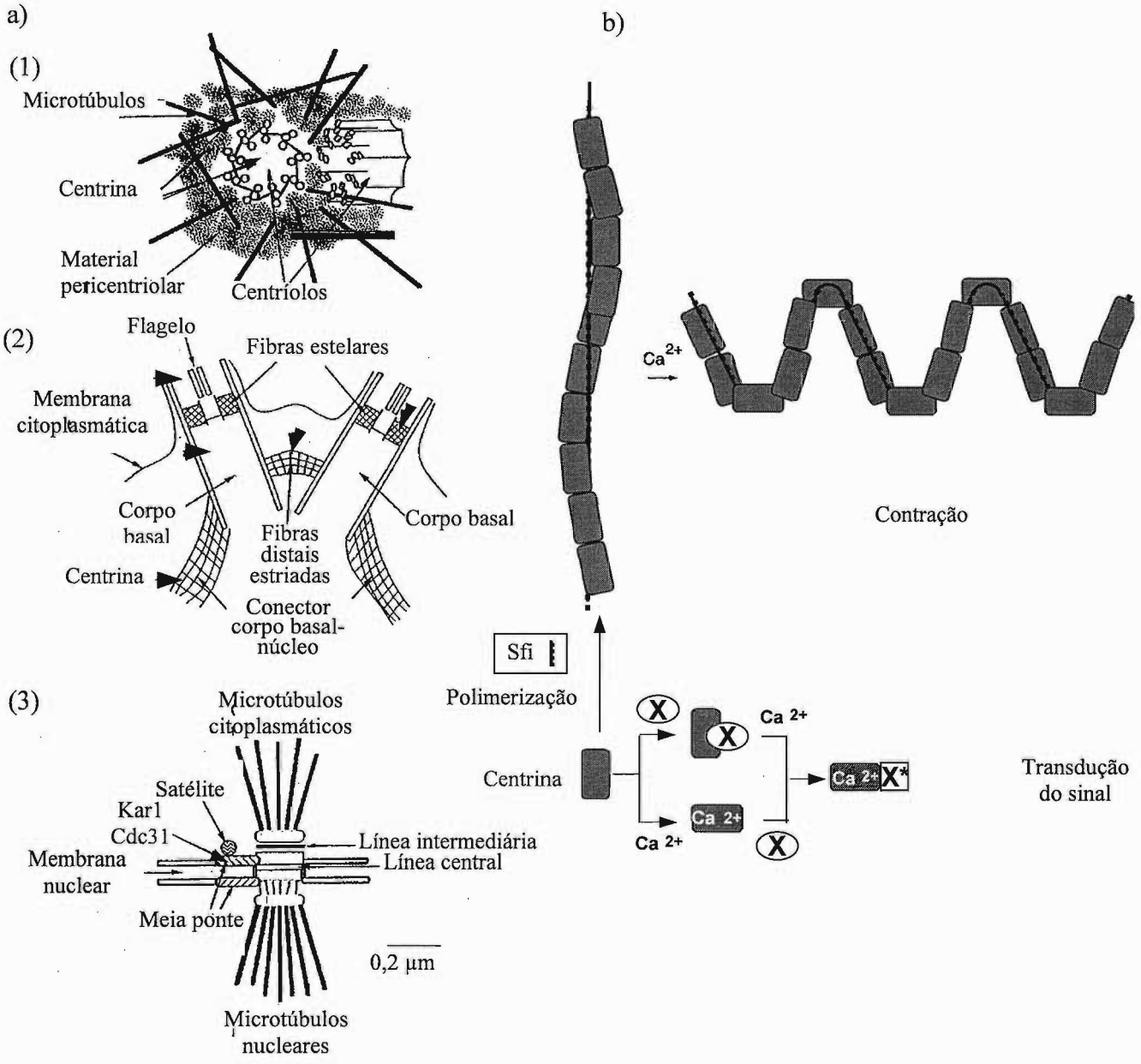


Figura 2. Localização e modelo proposto para o mecanismo de ação das centrinas. a) Localização da centrina em diferentes MTOCs (1) centrossoma (*H. sapiens*), (2) corpo basal (*C. reinhardtii*) e (3) SPB (*S. cerevisiae*), b) modelo de ação proposto para a centrina (modificado de Schiebel & Bornens, 1995 e Salisbury, 2004). As pontas das setas em (2) indicam a localização da centrina.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

A proposta de Middendorp e colaboradores (1997) é que as centrinas pertencentes às duas subfamílias diferentes possuiriam papeis distintos na célula, funcionando na contração nas algas verdes e na separação do SPB em *S. cerevisiae*. Assim, os eucariotos de um modo geral apresentariam dois tipos de genes com funções diferentes. Porém, nenhuma centrina pertencente à primeira subfamília foi descrita em fungos e no genoma de *S. cerevisiae* há apenas um gene codificando uma centrina, o *cdc31*. Este fato não é surpreendente considerando que os fungos superiores não possuem aparato flagelar ou estruturas contráteis associadas aos MTOCs, o que poderia indicar a perda secundária do gene devido à perda de função associada a ele.

Em concordância com a idéia da existência de funções distintas nas centrinas, as quatro isoformas da centrina caracterizadas em *Homo sapiens* mostraram diferenças na distribuição celular e na localização subcelular, como algumas evidências funcionais: enquanto HsCen1 é majoritariamente expressa em retina e testículos, HsCen2 e HsCen3 são ubiqüitamente expressas, e HsCen4 é predominantemente expressa em células ciliares do cérebro, em rins, pulmão e ovário. Todas as centrina aparecem associadas aos centríolos/corpos basais: HsCen2 e HsCen3, foram observadas no lúmen distal em células em proliferação, HsCen1 e/ou HsCen2 foram localizadas no lúmen distal durante as etapas precoces da diferenciação dos centríolos e na região de transição dos axonemas quando os centríolos estão maduros, e HsCen3 manteve-se restrita ao lúmen distal (não há estúdos sobre a localização subcelular da HsCen4). Enquanto as suas funções, HsCen1 e/ou HsCen2 poderiam estar envolvidas no movimento do flagelo, considerando que o movimento foi bloqueado por anticorpos que reconheciam ambas as proteínas (Laoukili *et al.*, 2000); HsCen2 e HsCen3 poderiam estar envolvidas em etapas precoces da biogênese do centríolo (Laoukili *et al.*, 2000) e na duplicação dos centrossomos, segundo foi sugerido por experimentos de interferência sobre à HsCen2 (Salisbury *et al.*, 2002) e a superexpressão da HsCen3 (Middendorp *et al.*, 2000) que resultaram em defeitos na duplicação destas organelas; e

HsCen4 estaria relacionada com o amadurecimento dos corpos basais ou a formação dos cílios, e funções associadas (Gavet *et al.*, 2003). Por outro lado, observou-se que a centrina (HsCen2) é fosforilada durante o ciclo celular, atingindo um máximo durante a transição G_2/M quando os centrossomos se separam. As conseqüências funcionais desta fosforilação são desconhecidas, mas poderiam ter a ver com seu papel na duplicação ou separação dos centrossomos (Lutz *et al.*, 2001). Em concordância com estes resultados, observou-se que a fosforilação da centrina em *Tetraselmis striata* correlaciona-se com a extensão das fibras contendo centrinas associadas a centríolos/corpos basais (Salisbury *et al.*, 1984; Martindale & Salisbury, 1990).

Embora a função melhor caracterizada das centrinas seja a de sua participação na duplicação dos MTOCs, também foram sugeridas funções distintas para algumas das centrinas humanas: HsCen2 poderia participar no mecanismo de reparo por excisão de nucleotídeos (Araki et al., 2001), e HsCen1 na transdução de sinais mediada por fotoreceptores (Pulvermuller *et al.*, 2002).

Neste sentido, estudos de mutagênese sobre a ScCdc31, a única centrina de *S. cerevisiae*, revelaram regiões da proteína associadas a funções diversas (Ivanovska & Rose, 2001). Assim, mutantes no carboxi-terminal exibiram bloqueio na fase G_2/M do ciclo celular e interação com a proteína mutada Kar1 (que gera a localização incorreta de Cdc31 na meia-ponte) indicando o envolvimento desta região com a duplicação do SPB. Mutantes na região intermédiária do gene mostraram um aumento na lise celular, por bloqueio da interação com a quinase Kic1. Uma terceira região no amino-terminal mostrou termosensibilidade sem afetar a lise celular ou a transição G_2/M, indicando a existência de uma terceira função. Recentemente, foi descrito que esta região interage com a maquinaria de exportação do RNA mensageiro do núcleo ao citoplasma celular, e que mutantes nesta região possuem defeitos nesta exportação (Fischer *et al.*, 2004).

Considerando que, embora as isoformas das centrinas sejam candidatas a várias funções, poderia haver um mecanismo molecular comum a todas elas, há alguns anos foi proposto um modelo de funcionamento das centrinas (Schiebel & Bornens, 1995) que ainda hoje pode ser sustentado (Figura 2b). O modelo tem como base o fato de que as centrinas mudam sua conformação pela ligação a cálcio. Em um caso, esta mudança serviria à contração, e em um outro caso esta mudança proveria o sinal que seria transduzido para, por exemplo, a duplicação do SPB; a especificidade da reação neste segundo caso seria determinada pelas proteínas interagindo com a centrina. O modelo da contração foi otimizado com o descobrimento de uma nova proteína centrossómica com sítios de ligação à centrina, Sfi1 (Kilmartin, 2003). Na nova proposta, Sfi1 agiria como uma coluna vertebral elástica em torno da qual as moléculas da centrina se uniriam e produziriam o encurtamento de toda a estrutura pela ligação a cálcio (Salisbury, 2004).

B. emersonii, como os outros quitridiomicetos, possue centríolos e corpos basais em suas estruturas flagelares ao contrário de fungos superiores. Isto nos levou a pensar que *Blastocladiella* poderia ter dois genes que codificassem para centrina: um gene que codificasse para uma centrina do tipo *C. reinhardtii* e um gene que codificasse para uma centrina do tipo *S. cerevisiae.* Seqüências expressas dos dois tipos foram isoladas nas bibliotecas de cDNA e foram objeto deste estudo.

1.3.1.2 Quinases dependentes de ciclina.

A alternância entre divisão nuclear e citocinese é uma característica comum a procariotos e eucariotos. A coordenação temporal e espacial entre a divisão nuclear e a citocinese assegura a distribuição uniforme do material genético entre as duas novas células (Nanninga, 2001). Entre os eucariotos, também se descreve a progressão entre os eventos ou fases que ocorrem no núcleo (S, G2, M, G1) (Mironov *et al.*, 1999); o acoplamento entre a fase S, de replicação dos cromossomos, e a fase M, de segregação dos cromossomos, assegura a progressão ordenada ao longo do ciclo celular (Broek *et al.*, 1991). Os mecanismos de coordenação e controle parecem conservados entre os eucariotos ao longo da evolução, sendo controlados por uma classe comum de serina/treonina quinases heterodiméricas. Estas quinases possuem uma subunidade catalítica, chamada quinase dependente de ciclina (Cdk) e uma subunidade ativadora, a ciclina (Morgan, 1997).

A existência de conexões regulatórias entre divisão nuclear e citocinese foi revelada por observações em fungos, nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schyzosaccharomyces pombe* que indicaram que esses dois processos estão acoplados (Balasubramanian, 2000). Também foi em *S. pombe* onde a primeira Cdk (Cdc2) foi caracterizada (Nurse & Bisset, 1981). A seguir foi descrita a homóloga em *S. cerevisiae* (Beach *et al.*, 1982) e mais tarde foram descritas Cdks em metazoários (Nurse, 1990) incluindo as plantas (John *et al.*, 1989).

As Cdks possuem uma região conservada de união às ciclinas contendo a seqüência EGVPSTAIRESLLKE ou variantes. Esta região é conhecida como hélice PSTAIRE e é adjacente à alça catalítica (John *et al.*, 1989). Os níveis das Cdks parecem permanecer constantes ao longo do ciclo celular e suas atividades são controladas principalmente pós-traducionalmente por uma variedade de mecanismos, incluindo a ligação a diferentes ciclinas ao longo do ciclo celular,

fosforilação/desfosforilação, degradação protéica mediante ubiqüitinação e interação com inibidores (Zhang *et al.*, 2002; Santori *et al.*, 2002). A hipótese é de que as ciclinas direcionam a atividade das Cdks a diferentes substratos, pela afinidade de cada ciclina por proteínas particulares. As ciclinas são sucessivamente substituídas por outras ciclinas características de cada fase ao longo do ciclo celular; os principais fatores afetando essa substituição são a regulação da transcrição e a proteólise.

Entre os fungos estudados, as Cdks das leveduras *S. pombe* e *S. cerevisiae* são as melhor caracterizadas. Nestas leveduras, apenas uma Cdk está diretamente envolvida no ciclo celular, sendo codificada pelo gene $cdc2^+$ em *S. pombe* e por *cdc28* em *S. cerevisiae*; os produtos desses genes homólogos são chamados de Cdk1. Uma variedade de ciclinas complexadas com Cdk1 dirige o ciclo através de S e M: as ciclinas G_1, S e mitóticas que recebem os nomes de Puc1, Cig1 e Cig2, e Cdc13, respectivamente em *S. pombe*, e as ciclinas CLN, CLB 5/6 e CLB 3/4, respectivamente em *S. cerevisiae* (Moreau *et al.*, 1998). Em células com apenas uma Cdk, a inibição por fosforilação regula apenas a transição da fase G_2 para M (Moreau *et al.*, 1998, Nurse, 1990). A regulação do ciclo celular em outros fungos é menos conhecida, mas também identificou-se pela seqüência apenas um homólogo putativo de $cdc2^+$ em outros fungos como *Aspergillus nidulans* (Osmani *et al.*, 1991), *Candida albicans* (Damagnez e Cottarel, 1996), *Neurospora crassa* (Borkovich *et al.*, 2004) e *Criptococcus neoformans* (Takeo *et al.*, 2004), junto com algumas *Cdk-like* ou *Cdk-related.* Nenhuma Cdk foi descrita até o momento em quitridiomicetos ou outro grupo de fungos primitivos.

Em contraste com as leveduras, várias Cdks foram identificadas em eucariotos superiores: o complexo ciclina (cyc) D/Cdk4-6 regula a passagem através da fase G_1; os complexos cyc E/Cdk2, cyc A/Cdk2 regulam a replicação do DNA na fase S; e os complexos cycA/Cdk1, cyc B/Cdk1 regulam a divisão celular na mitose (Moreau *et al.*, 1998). A presença de múltiplas Cdks

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

permite a regulação por inibição ou ativação, que é específica de uma Cdk ou um grupo de Cdks; em metazoários, a fosforilação controla a transição da fase G_1 para S e a de G_2 para M (Moreau *et al.*, 1998). O achado inicial de mais de dez proteínas relacionadas com Cdc2 em vertebrados, levou a pensar que o ciclo celular em eucariotos superiores era controlado por combinações complexas de Cdks e ciclinas, mas a maioria parece cumprir papeis auxiliares ou não estar envolvida no controle do ciclo celular. Entre estas Cdks encontram-se Cdk5, Cdk7, Cdk8, Cdk9 e várias Cdks que, como as anteriores, possuem variações no motivo PSTAIRE. O grupo inclui as quinases PCTAIRE, PISSLRE, PITALRE e PITSLRE que foram pouco caracterizadas (Morgan, 1997; Sauer *et al.*, 1996; Price, 2000). Cdk3, que como Cdk1 e Cdk2 possui a hélice PSTAIRE conservada e está fortemente relacionada com a prototípica Cdc2, parece estar envolvida no controle do ciclo celular, mas não é facilmente detectada em células de mamífero e não foi identificada uma ciclina que faça parte de um complexo com Cdk3 (Morgan, 1997).

Em diversas espécies de plantas, como em animais, foram identificadas várias Cdks, as quais podem ser distinguidas com base em sua seqüência de aminoácidos (Mironov *et al.*, 1999). Algumas evidências indicando a formação de complexos com ciclinas e a dependência de ciclinas para a atividade quinase foram descritas por Magyar e colaboradores (1997), que detectaram atividade quinase em imunoprecipitados com anticorpos contra ciclina mitótica em alfafa. Porceddu e colaboradores (2001) observaram máxima atividade quinase em complexos de massa molecular que indicariam a presença de uma subunidade ativadora, provavelmente uma ciclina, em culturas celulares de tabaco.

Diferentemente do descrito em outros metazoários, as Cdks em plantas parecem dividir-se em dois grupos, que podem distinguir-se pela seqüência de aminoácidos e o padrão de expressão. O grupo melhor caracterizado é o das Cdks tipo A, o grupo mais próximo das Cdc2/Cdc28 de leveduras e das Cdk1/Cdk2 de animais. Estas Cdks possuem o motivo PSTAIRE conservado,

complementam parcialmente mutações *cdc2/cdc28* em leveduras e em conseqüência, são consideradas como homólogos funcionais das mesmas Cdks (Mironov *et al.*, 1999). Os níveis do RNA mensageiro e o das proteínas são detectados em todas as fases do ciclo celular, enquanto que a atividade, medida *in vitro*, correlaciona-se bem com a maior porcentagem das células na fase S e nas fases G_2 e M do ciclo celular (Fobert *et al.*, 1996; Sorrell *et al.*, 2001; Magyar *et al.*, 1997) (Figura 3).

Várias Cdks "não-PSTAIRE" foram caracterizadas em plantas. Entre estas, o grupo que tem sido mais estudado é o das Cdks do tipo B, que apresentam as seqüências variantes PPTALRE ou P(S/P)TTLRE (Segers *et al.*, 1996; Fobert *et al.*, 1996; Magyar *et al.*, 1997; Sorrell *et al.*, 2001, Umeda *et al.*, 1999). Diferentemente das Cdks típicas, a expressão das Cdks do tipo B é altamente regulada durante o ciclo celular (Figura 3). Em cultura de células sincronizadas de alfafa e tabaco, a atividade quinase acompanha a abundância dos RNA mensageiros e os níveis das proteínas associadas, coincidentemente com a transição G_2-M das fases do ciclo celular (Magyar *et al.*, 1997; Sorrell *et al.*, 2001).

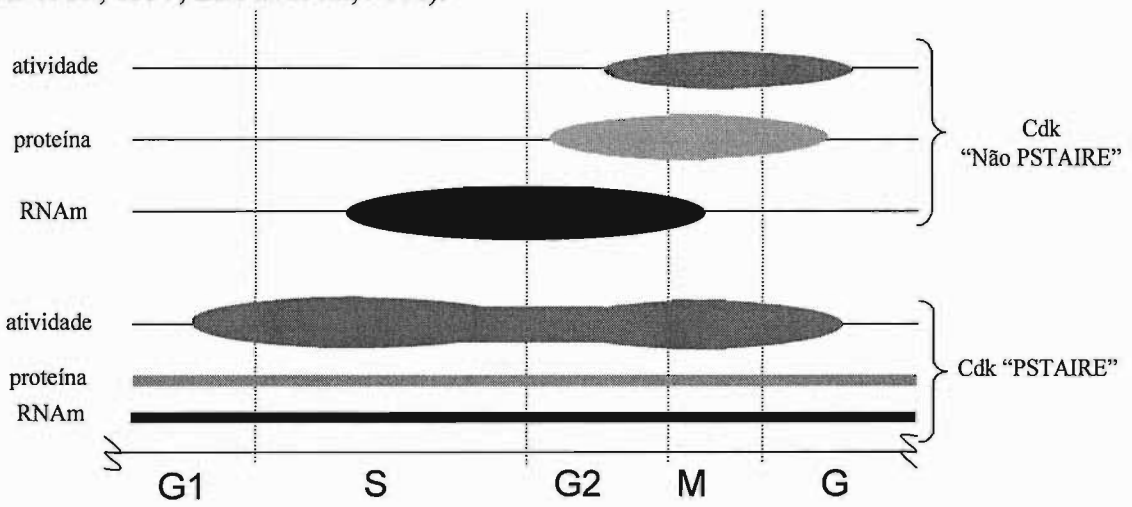


Figura 3. Expressão das quinases dependentes de ciclina com e sem motivo PSTAIRE conservado. O tamanho das áreas reflete qualitativamente o nível de RNAm, proteína ou atividade segundo está indicado (modificado de Mironov *et al.*, 1999).

A falta de complementação de mutantes de levedura deficientes em Cdk com seqüências codificadoras de Cdks do tipo B abriu o questionamento sobre o possível papel dessas Cdks no ciclo celular. Entretanto, Porceddu e colaboradores (2001) mostraram que um tipo de Cdk "não-PSTAIRE" específico de planta está envolvido no controle da transição G_2/M, quando descreveram um retardo na transição entre essas duas fases, associado à diminuição da atividade dessa quinase, em um mutante dominante negativo. A proteólise das ciclinas do tipo B durante a anáfase reduz a atividade mitótica da Cdk, necessária para completar a anáfase (John *et al.*, 2001). Curiosamente, a participação de ciclinas e a da sua correspondente Cdk na citocinese foi apenas descrita em plantas até o momento. Mews e colaboradores (1997) sugeriram que este fato poderia ter evoluído de situações durante as quais o aparelho microtubular citocinético está presente simultaneamente com o fuso mitótico, quando o complexo Cdk/ciclina está associado com estruturas microtubulares. Este mecanismo em plantas também poderia ser vantajoso em programas de desenvolvimento onde a citocinese é postergada e, entretanto, ocorre a formação de tecidos cenocíticos, como o endosperma (Heese *et al.*, 1998). Assim, diferentes complexos Cdk/ciclina poderiam facilitar a regulação independente da divisão nuclear e da citocinese. Recentemente, Boudolf e colaboradores (2004) mostraram que a superexpressão de uma mutante dominante negativa para uma Cdk do tipo B (CdkB1;1) induziu a endoreduplicação, corroborando essa hipótese.

Estes resultados indicam que Cdks diferentes de Cdk1 estariam ativas na mitose em plantas, o que não é comum em mamíferos onde Cdks adicionais à Cdk1 são expressas em G_1 e S, e a Cdk1 é a Cdk de importância durante a mitose (Sherr, 1996; John *et al.*, 2001).

Um aspecto notável do ciclo de vida de *B. emersonii* são os sucessivos ciclos de divisão nuclear ou cariocinese, com ausência de divisão celular ou citocinese. Este é um aspecto característico do grupo que também está presente em outros fungos, mas cujos mecanismos e

pontos de controle, que levam à subdivisão da célula multinucleada em compartimentos celulares, permanecem obscuros. Em diferentes bibliotecas de cDNA de *B. emersonii* foram clonadas seqüências expressas correspondentes a duas Cdks "não-PSTAIRE" putativas. Nenhum dos motivos encontrados foi descrito antes em plantas, mamíferos ou fungos e por isso foram objeto deste estudo.

1.3.1.3 Transportador putativo de hexose.

A regulação da expressão de genes por glicose é um fenômeno geral em eucariotos. Exemplos disso foram observados em microorganismos como *S.cerevisiae* (Rolland *et al.*, 2001), plantas (Graham *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2003) e animais (Vaulont *et al.*, 2000; Zinke *et al.*, 2002), particularmente em relação a genes envolvidos na fermentação, respiração e metabolismo de fontes alternativas de carbono. O papel da glicose como regulador da expressão gênica também abrange genes relacionados direta ou indiretamente com o ciclo celular tanto em levedura (Newcomb *et al.*, 2003), plantas (Barker *et al.*, 2000) como em animais (Vaulont *et al.*, 2000; Zinke *et al.*, 2002).

Ao mesmo tempo, tem-se descrito genes que funcionariam especificamente como sensores de glicose (Figura 4a). Em levedura, Snf3 e Rgt2 foram caracterizados como sensores, homólogos de carregadores de glicose não transportadores. Uma característica destes sensores é a presença de um domínio citoplasmático estendido que está ausente nos transportadores ativos. Rco3 foi também descrito em *N. crassa* como sensor putativo de glicose (Madi *et al.*, 1997) e Stu2 como sensor de sacarose em tomate (Barker *et al.*, 2000), ambos lembrando estruturalmente os sensores de levedura. Mais dois grandes mecanismos de detecção de glicose foram propostos, com evidências experimentais em alguns casos (Figura 4 b,c). Em um dos mecanismos, o sinal

estaria relacionado com o metabolismo de glicose, sendo transduzido por um transportador ativo ou algum componente após a ação do transportador, podendo ser uma hexoquinase ou um intermediário metabólico; no outro, um receptor não homólogo de transportador associado à proteína G ativaria a via da adenilato ciclase-cAMP que regula a expressão de genes envolvidos no metabolismo de glicose.

Vários estudos focalizaram a análise nos genes e mecanismos envolvidos na indução ou na repressão da esporulação em fungos pela presença desta hexose, principalmente em *S. cerevisiae*. Em *S. cerevisiae* e na presença de glicose, a via da proteína quinase A/AMP cíclico é uma das responsáveis pela inibição da meiose ao inibir a transcrição e inativar um fator de transcrição chave, via Sok2 que age como repressor (Shenhar & Kassir, 2001), e via um homólogo da glicogênio sintase quinase 3 beta, que age como inativador (Rubin-Bejerano *et al.*, 2004). Nutrientes em alta concentração bloqueiam a conidiação em *Neurospora crassa*; o gene *rco-3*, um homólogo dos transportadores de hexose de *S.cerevisiae*, foi indicado como sensor do estado nutricional e envolvido na esporulação, devido ao desenvolvimento do conidióforo mostrado em um mutante para esse gene na presença de glicose 2% (100mM) (Madi *et al.*, 1997).

Em um estudo feito nos anos oitenta (Correa & Lodi, 1986), foi caracterizada a influencia de alguns nutrientes no desenvolvimento da fase de esporulação de *Blastocladiella*. Os autores observaram que concentrações relativamente baixas de glicose como 0,1% (5,5 mM) e de alguns aminoácidos como triptofano (1 mM), bloqueavam a esporulação, apresentando-se as células em sua maioria não papiladas.

Com base nesses resultados, nos propusemos avaliar a expressão de um gene que codifica para um transportador putativo de hexose durante a esporulação, cujo fragmento carboxi-terminal foi isolado em duas bibliotecas de cDNA de *B. emersonii*

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

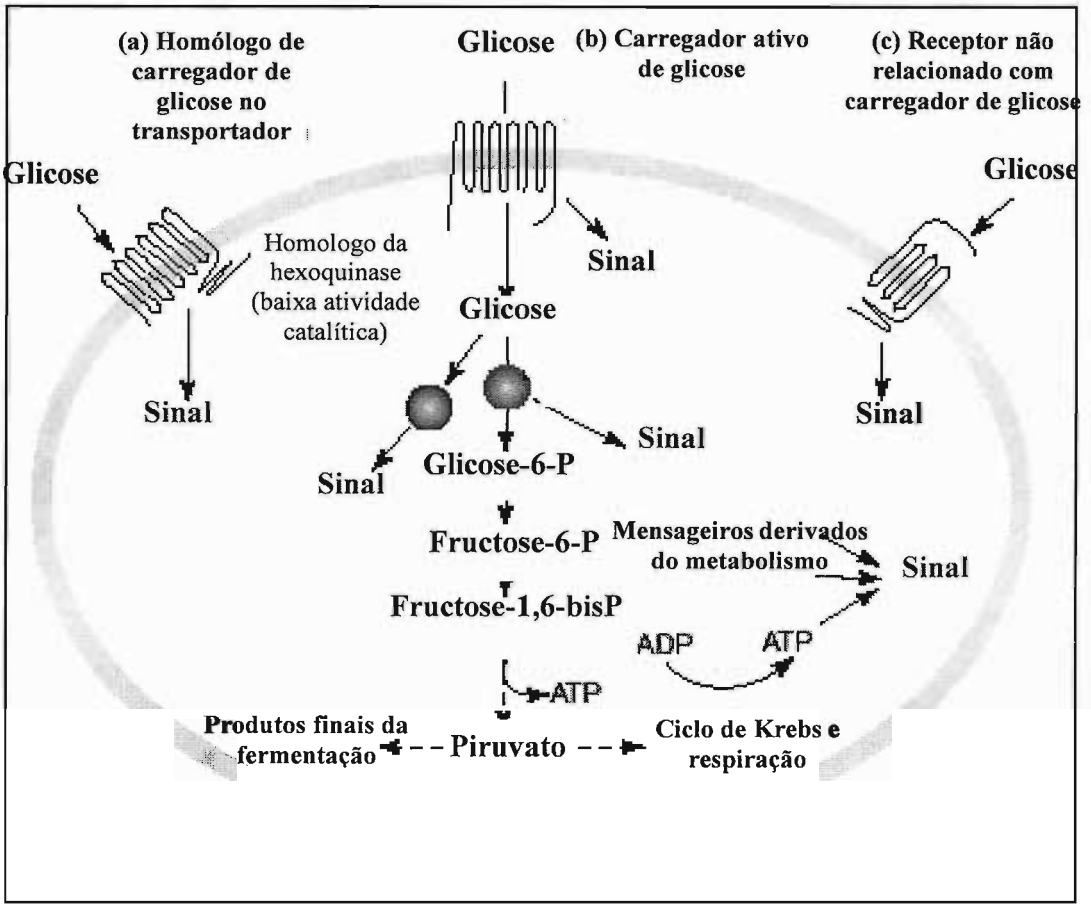


Figura 4. Modelos propostos para a detecção e transmissão do sinal gerado pela glicose (modificado de Rolland *et al.*, 2001).

2) OBJETIVO GERAL

Estudar a expressão gênica global durante a esporulação de *B. emersonii* e analisar as possíveis relações entre as variações na expressão e as mudanças morfológicas.

2.1) OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar um programa de sequenciamento de clones de cDNA obtidos a partir das seqüências expressas (ESTs) durante a fase de esporulação e a fase vegetativa de *B. emersonii*.

2. Comparar as seqüências obtidas com as existentes em bancos de dados para sua identificação putativa.

3. Analisar os perfis de expressão das seqüências expressas para identificar genes cuja expressão seja regulada durante a fase de esporulação.

4. Caracterizar transcritos relacionados com a divisão celular e potencialmente envolvidos com o controle do ciclo celular, identificando a seqüência temporal de acúmulo.

5. Caracterizar as proteínas codificadas por esses transcritos por massa molecular aparente, seqüência temporal de acúmulo e localização.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) Vetores de clonagem e expressão

pSPORT I, vetor de clonagem, Ap^r (Life Technologies).

pGem-T e pGEM-T Easy, vetor de clonagem para fragmentos de PCR obtidos com *Taq* polimerase, Ap^r (Promega).

pMAL-c2, vetor de expressão que gera uma proteína de fusão à proteína ligante maltose (MBP) com destino citoplasmático, possui indução por IPTG e seleção de colônias brancas/azuis, Ap^r (New England BioLabs).

3.2) Meios de cultura

LB líquido: bacto-triptona 1%; extrato de levedura 0,5%; NaCl 1%, pH 7,5.

LBA líquido: LB contendo ampicilina 0,1 mg/ml.

LBA ágar: LBA contendo ágar 1,5%.

SOB: triptona 20 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 0,6 g/l; KCl 0,2 g/l, pH 6,8.

SOC: SOB contendo glicose 0,36%.

PYG ágar: peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,3%; ágar 1,5%.

PYG-P líquido: 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.

DM4 (Maia & Camargo, 1974): $CaCl_2$ 1mM, $MgSO_4$ 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, 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, Tris-maleato 3,5 pH 6,8. O pH do meio foi ajustado com KOH 1 M e a concentração final de K+ foi ajustada para 50mM com KCl 1 M.

3.3) Oligonucletídeos

T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

SP6: 5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'

5'-CDS: 5'-$(T)_{25}$VN -3'

BD SMART II A: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'

BeCen2-1eft: 5'-GATCTTGCCCTTCTTGTCCGTGT-3'

BeCen2-left2: 5'-GGTTGAGTTGATGCGTTGCTTCCCC-3'

NUP: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'

4-4-BeCen2-MBP: 5'-GGAATTCCACGAGGTCA-3'

Forward: 5'-CCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'

3.4) Linhagem de *Escherichia coli*

DH5α: *supE44 lacU169 (80 lac ZΔM15) hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1.*

3.5) Condições de cultivo de *Blastocladiella emersonii* para manutenção da cepa.

Foi utilizada cepa de *Blastocladiella emersonii* mantida em nosso laboratório por repiques diários em meio PYG e incubando-se por 16 h a 19°C e 8 h a 27 °C.

3.6) 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 14 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 (SE) (SE: tampão Tris/maleato 1mM, pH 6,8 contendo $CaCl_2$

1mM), 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 (~3,5 h). Em diferentes tempos após a indução da esporulação, alíquotas de células foram coletadas para extração do RNA total (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 210 minutos) ou de proteínas totais (30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 minutos). Para a obtenção de amostras durante a fase de germinação, seguiu-se o mesmo procedimento que para a obtenção das amostras durante a fase de esporulação até a obtenção de zoósporos. Os novos zoósporos foram inoculados em meio DM4 a uma densidade de 2 x 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 minutos após a indução da germinação.

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.

3.7) Construção de bibliotecas de cDNA a partir de mRNA obtido de células na fase de esporulação e de células vegetativas.

3.7.1. 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 (Life Technologies). As células foram coletadas por filtração em papel Whatman N° 1 e em seguida foram retiradas do papel (células em esporulação ou células vegetativas) ou juntamente com o papel (células em germinação) foram colocadas em graal de porcelana, previamente esterilizado por calor a 180°C e resfriado em banho de gelo seco. As células foram então maceradas na presença de nitrogênio líquido e de Trizol (2 x 10^7 células/1,5 ml Trizol). A mistura congelada foi

então aquecida em banho-maria 65°C até dissolver. A seguir foram adicionados 500 µl de H_2O milliQ previamente tratada com DEPC (0,1%) para inativar ribonucleases. A mistura foi agitada vigorosamente e incubada a temperatura ambiente durante 5 minutos. A seguir foram adicionados 300 µl de clorofórmio e, após agitação vigorosa, as amostras foram incubadas novamente a temperatura ambiente por mais 3 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 xg durante 15 minutos a 4°C e a fase aquosa foi precipitada com isopropanol (0,5 ml/ml Trizol) durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguindo-se centrifugação a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C. Os precipitados obtidos foram lavados com etanol 75 % tratado com DEPC (0,1 %) e foram secos no fluxo laminar. O RNA total obtido foi ressuspenso em água milliQ e aquecimento a 65°C para total ressuspensão. A quantificação e a avaliação do grau de pureza foram feitos pela medida da absorbância da amostra a 260 nm e a 280 nm.

Para verificação da integridade do RNA, uma alíquota de cada amostra foi diluída em tampão de amostra (formamida 0,66%; MOPS 10x, 0,13 %; formaldeido 37%, 0,08%; azul de bromofenol 0,2%) contendo brometo de etídio e submetida a eletroforese em gel de agarose 1,5% - formaldeído 2,2 M. Após a eletroforese o gel foi observado sob luz UV. (Ausubel *et al.*, 1995). O RNA poli A+, foi isolado por cromatografia em coluna de oligo (dT)-celulose, seguindo as instruções do *Oligotex mRNA mini kit* (Qiagen).

3.7.2. Construção de bibliotecas de cDNA normais.

Quatro bibliotecas de cDNA foram construídas usando o kit *SuperScript plasmid system for cDNA synthesis and plasmid cloning* (Life Technologies), partindo de aproximadamente 1,25 µg dos mRNAs poli A+ isolados, e seguindo as instruções do fabricante. Na construção da primeira fita do cDNA foi usado como iniciador oligo-dT contendo o sítio de restrição *Not*I. As bibliotecas foram denominadas E30, E60, E90 (construída e seqüênciada por L. D. Navarro) e

E120. Após a síntese da dupla fita de cDNA foram ligados dois adaptadores previamente digeridos com a enzima *Sal*I. Após a digestão com a enzima *Not*I, os fragmentos de cDNA *Sal* I/*Not* I obtidos foram fracionados por tamanho mediante filtração em gel de poliacrilamida (Sephacryl S-500 HR (Amersham Pharmacia Biotech BA)). Após a passagem de um volume de no máximo 550 μl, todas as frações coletadas foram consideradas como contendo cDNAs de tamanho estimado em 500 pb ou mais (com base nos dados fornecidos pelo fabricante) e foram misturadas e precipitadas com dois volumes de etanol 100%. Após lavagem com etanol 70%, as amostras foram secas e ressuspensas em 10 μl de tampão TEN (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 0,1 mM; NaCl 25 mM). Finalmente, foi feita a clonagem do cDNA no plasmídeo do kit (pSPORT1) que é direcionada, ficando as extremidades 5' e 3' entre os sítios *Sal*I e *Not*I, respectivamente. A seguir, bactérias da cepa de *Escherichia coli* DH5α foram transformadas por eletroporação com as reações de ligação feitas entre os cDNAs e o plasmídeo pSPORT1, após diálise da ligação em filtro de 0,025 μm de poro, seguindo-se plaqueamento em meio LBA contendo X-gal (0,002% em DMF) e IPTG (1 mM).

Colônias bacterianas brancas foram isoladas e preparações de plasmídeos dos clones selecionados foram feitas manualmente, usando filtros *MultiScreen* (Milllipore) no último passo (vide detalhes em 3.11), para obter uma amostra de DNA com maior grau de pureza. Algumas preparações de plasmídeos foram selecionadas aleatoriamente e foram analisadas quanto à presença de insertos, mediante digestão com as enzimas *Not*I e *Sal*I, seguindo-se eletroforese em géis de agarose 1,2 %. Após eletroforese, o gel foi corado com brometo de etídio para visualização do DNA sob luz UV. As preparações de plasmídeo ressuspensas em Tris-HCl 10 mM pH 8,0 foram armazenadas a –20°C até o momento do sequenciamento do DNA. Os clones bacterianos correspondentes foram armazenados a –80°C, após adição de glicerol (20 %, concentração final).

3.7.3. Construção de bibliotecas de cDNA subtrativas.

Duas bibliotecas subtrativas de cDNA foram construídas usando o kit *CLONTECH PCR-select cDNA subtraction* (CLONTECH) (Diatchenko *et al.*, 1999), a partir de 2 μg de mRNA poliA+. Uma das bibliotecas, proveio do cDNA de células de 120 minutos da esporulação, subtraído com cDNA de células vegetativas isoladas imediatamente antes da indução da esporulação (denominada S120); a outra, proveio de cDNA subtraído no sentido contrário (cDNA de células vegetativas subtraído com cDNA de esporulação, denominada SV).

Mais duas bibliotecas subtrativas, SE120B e SVB foram construídas, eliminando o primeiro passo de digestão dos cDNAs com a enzima *Rsa*I, na tentativa de evitar a diminuição excessiva dos tamanhos dos fragmentos. Como controles da ligação dos adaptadores e como controles negativos da subtração, duas alíquotas iguais de cDNA (duas de células de 120 minutos da esporulação ou duas de células vegetativas) ligadas com distintos adaptadores, foram misturadas e amplificadas por PCR. Além disso, estes controles foram usados por nós, para construir duas novas bibliotecas de cDNA (denominadas NS120 e NSV) . A clonagem foi feita no plasmídeo T-Easy (Promega), sendo não direcionada. A transformação, seleção e preparação de plasmídeos foi feita da mesma forma que para as bibliotecas normais.

3.8) Análise das seqüências isoladas

3.8.1. Sequenciamento dos cDNAs.

Os plasmídeos purificados e conservados a –20°C foram descongelados, e alíquotas na concentração de 200-500 ng/ml, determinada por absorbancia a 260 nm, foram submetidas à reação de sequenciamento 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).

O sequenciamento dos cDNAs foi realizado a partir da extremidade 5', utilizando o iniciador universal T7. A maioria das extremidades 3' das seqüências da biblioteca E120 não contidas nas seqüências feitas a partir de T7, foram obtidas e usando o iniciador universal SP6, a partir da extremidade 3'.

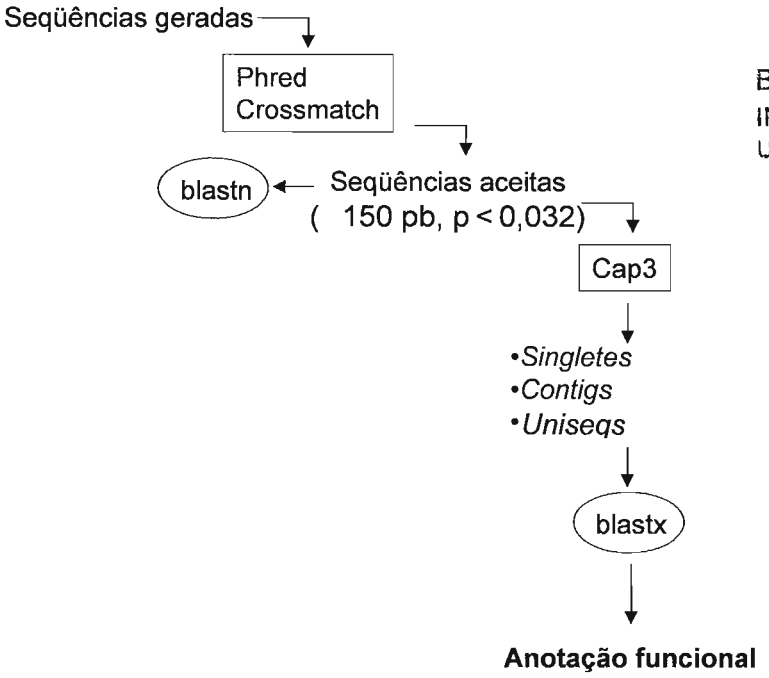
3.8.2. Processamento das seqüências.

As seqüências expressas obtidas nas diferentes bibliotecas normais de cDNA foram processadas pelo pacote de programas ESTWeb (Paquola *et al.*, 2003). O ESTWeb utiliza a combinação dos programas PHRED (Ewing & Green, 1998; Ewing *et al.*, 1998), crossmatch e PHRAP (Green, 1996) ou CAP3 (Huang & Madan, 1999) para atribuir os nomes às bases, mascarar o vetor usado e comparar as ESTs entre si para a formação de grupos prováveis de RNAs mensageiros provenientes dos mesmos genes (*contigs*), respectivamente. 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 mascara 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 informa 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 5). As seqüências expressas referidas em este trabalho, junto com outras seqüências que fazem parte do trabalho de tese de doutorado da S. M. Salem-Izacc foram depositadas na seção EST do *GenBank*, e receberam os número de acesso CO961503 – CO978552.

3.8.3. Anotação das seqüências.

Como resultado do processamento das seqüências foram gerados grupos de seqüências superpostas, com probabilidade de serem RNAs mensageiros provenientes dos mesmos genes (*contigs*) e seqüências isoladas não incluidas em nenhum *contig* (*singletes*), a partir dos quais nos contabilizamos o número de seqüências únicas que estariam sendo expressas, soma dos *singletes* e um representante de cada *contig* (*uniseqs*). As *uniseqs* com tamanho maior que 150 pb foram anotadas usando o algoritmo BLAST (ltschul *et al.*, 1997), por comparação com a base de dados não redundante (nr) do *GenBank* do *National Center of Biotechnology Information* (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* (http://www.geneontology.org). 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* $\geq$ 55 (*Score* normalizado ou *bit score*) foram consideradas como identidades putativas (esse valor equivale aproximadamente a um valor esperado ou *E-value* $\leq 10^{-6}$ para o tamanho atual da base nr do GenBank) e, para a segunda anotação, foram considerados os alinhamentos obtidos com um valor esperado $\leq 10^{-6}$.



BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Figura 5. Diagrama que representa o processamento ao qual foram submetidas as seqüências isoladas.

Como seqüências codificadoras completas existentes no transcriptoma de *B. emersonii* (Ribichich *et al.*, submetido) foram considerados os *uniseqs* que alinharam com qualquer dos 10 primeiros amino ácidos de uma proteína da base de dados *Swiss-Prot and TrEMBL* (com valor esperado $\leq 10^{-6}$), e que tivessem a 5' do primeiro amino ácido alinhado, o número mínimo de nucleotídeos necessário para cobrir os amino ácidos não alinhados na extremidade N-terminal da proteína. Para estabelecer o número existente neste trabalho, as seqüências foram analisadas usando o algoritmo BLASTN e os alinhamentos foram revisados manualmente para verificar a área de cobertura (isto é, a porcentagem do alinhamento que os *uniseqs* deste trabalho cobriram das seqüências na base de dados (Ribichich *et al.*, submetido)).

3.8.3.1. Avaliação da taxa de evolução molecular das seqüências expressas de *B. emersonii.*

As seqüências expressas de *B. emersonii* foram comparadas com as seqüências não fúngicas de duas bases de dados construídas *ad hoc* (uma de animais e outra de plantas) e o mesmo foi feito com as seqüências de proteínas de *N. crassa* e de *U. maydis* depositadas no GenBank. A seguir, os *scores* obtidos para pares de ortólogos foram comparados para avaliar se a baixa proporção de genes identificados em *B.emersonii* podia ser atribuída a uma evolução molecular acelerada. O procedimento adotado foi feito com base no trabalho de Braun e colaboradores (2000). A base de dados de animais foi formada pelas bases de dados de proteínas do GenBank correspondentes a *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Xenopus laevis*, *Dario rerio*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* e *Anopheles gambiae*. A base de dados de plantas foi formada pelas bases de dados de *unigenes* do GenBank correspondentes a *Arabidopsis thaliana, Lycopersicon esculentum, Zea mays, Glicine max e Triticum aestivum*. Em ambos os casos, os organismos foram escolhidos pelo número de seqüências completas depositadas e pela representação de cada um deles dentro do grupo. Na procura na base de dados de animais foi usada a ferramenta BLASTX, e na base de dados de plantas foi a ferramenta tBLASTX; em ambos os casos foi usado um valor esperado $\leq 10^{-5}$ como ponto de corte para a aceitação do alinhamento. Os alinhamentos foram revisados manualmente e as seqüências expressas de *B. emersonii* aceitas como ortólogos (20-24) foram escolhidas de acordo com a área de cobertura da proteína ou do *unigene* (igual ou superior ao 60%), e de acordo com sua identificação putativa.

3.8.4. *Northern* digital.

As bibliotecas de cDNA construídas não tiveram um passo de normalização, ou seja, de homogeneização dos níveis dos RNA mensageiros que estavam sendo expressos nas células. Por tanto, os níveis de ESTs obtidos poderiam representar os níveis de diferentes tipos de RNA mensageiro que estavam sendo expressos nas células em uma determinada condição. Para avaliar as mudanças na abundância de cada EST entre todos os ESTs seqüenciados das diferentes bibliotecas, um *Northern* digital foi feito contando o número de ESTs seqüenciados para um dado gene relativo ao total da população seqüenciada (contagem normalizada). Para isso foi desconsiderada a biblioteca NSV que possui um passo de PCR. Como processo de amostragem que envolve contagem, o *Northern* digital é modelado usando estatística Bayesiana básica. Nós utilizamos este modelo na construção de intervalos de credibilidade (barras de erro) para os resultados de abundância de acordo com Vêncio e colaboradores (2003). Nós escolhemos uma função de densidade de probabilidade não-informativa a priori e intervalos de credibilidade de 68% (que podem se assimilar a um desvio estándar em uma distribuição Gaussiana) . O algoritmo *K-means* (Tavazoie *et al.*, 1999) e a métrica de correlação cosseno foram usados para agrupar os perfis de expressão, usando o programa *Spotfire for Functional Genomics* (Spotfire).

3.9) Preparo de células competentes de *E. coli* para transformação por eletroporação.

Uma colônia isolada de *E. coli* DH5α foi inoculada em 5 ml de meio SOB e incubada sob agitação de 180 rpm, a 37 °C, durante a noite. Na manhã seguinte a cultura foi diluída 100 vezes no mesmo meio fresco e incubou-se sob nas mesma condições até atingir uma absorbância a 600 nm entre 0,5 e 0,6. A seguir, as células foram centrifugadas em rotor GSA-Sorvall, a 7.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 100 ml de glicerol 10% gelado e novamente centrifugadas a 3.000 xg durante 10 minutos a 4°C.

Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 ml de glicerol 10% e guardadas até o uso em alíquotas de 20 µl a -80°C.

3.10) Transformação de células competentes de *E. coli* por eletroporação.

As células preparadas para eletroporação foram descongeladas em gelo e 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 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 37°C e espalhadas em placa de LBA.

3.11) Minipreparação de DNA plasmidial.

A preparação do DNA plasmidial isolado de colônias selecionadas após a transformação feita com as bibliotecas de cDNA foi realizada segundo o método descrito por Sambrook e colaboradores (1989) com modificações. Todas as centrifugações foram feitas em rotor S20-Jouan. As culturas foram crescidas em placas de 96 poços sob agitação de 250 rpm, por um máximo de 22 h a 37 °C. Alíquotas de 100 µl foram estocadas em glicerol 20%, a –70 °C e, a seguir, as culturas foram centrifugadas a 2.700 rpm, durante 8 minutos, a 20°C. O sobrenadante foi descartado e foi feita uma lavagem com GET (glicose 9%, EDTA 10 mM, Tris-HCl 250 mM pH 8,0) 240 µl/poço. A seguir, foram acrescentados seqüencialmente 90 µl de GET/Rnase (GET mais Rnase 0,15 mg/ml) e, após ressuspensão das células, 60 µl de solução de lise e 60 µl de solução de neutralização. Após de 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, as placas foram incubadas durante 30 minutos a 90 °C, e então colocadas em gelo por 10 minutos. Após

centrifugação a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, 100 µl de cada sobrenadante foram filtrados em placa G.V. (Millipore) e recolhidos em 110 µl de isopropanol 100%, mediante centrifugação a 4.000 rpm durante 40 minutos a 4 °C. Os precipitados foram lavados com etanol 70% e após centrifugação a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C, foram secos no fluxo laminar, ressuspensos em Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e estocados a –20°C.

A preparação do DNA plasmidial de colônias particulares foi realizada segundo o método descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

3.12) Marcação de sonda radioativa.

A marcação das sondas radioativas foi feita pela técnica de síntese de DNA utilizando como iniciadores oligonucleotédeos de seqüências aleatórias (ou *random primed synthesis*) (Feinberg & Volgestein, 1984). Para isso foi utilizado o kit *Random Primer Labeling* (Life Technologies) ou o kit High Prime (Roche) e [α-^{32}P]-dCTP como radioisótopo. A reação foi incubada durante a noite a 37°C, e para a remoção dos nucleotídeos não incorporados a sonda foi purificada por precipitação em etanol 100% durante 30 minutos em gelo seco, seguindo-se centrifugação a 12.000xg durante 15 minutos a 4°C, e lavagem com etanol 70% seguida de centrifugação nas mesmas condições, ou foi utilizado o kit *QIAquick nucleotide removal* (Qiagen).

3.13) Extração de DNA total de culturas de *B. emersonii*

A extração do DNA foi feita a partir de zoósporos obtidos de cultivo em meio PYG-P, para a obtenção de grandes quantidades.

Os zoósporos oriundos de crescimento em PYG ágar a 27°C foram recolhidos em água estéril, contados como foi descrito em 3.6, e inoculados a uma densidade de 7 x 10^4 zoósporos/ml

de PYG-P. A cultura foi incubada sob agitação de 150 rpm durante 14 h a 22°C. Após esse tempo, as células vegetativas foram separadas do meio por filtração em rede de náilon (30μm de poro), e lavadas com 1,4 l de SE por cada litro de cultura. A seguir, as células foram ressuspensas em 600 ml de SE por cada litro de cultura e incubadas sob agitação de 150 rpm a 27° C, até o desenvolvimento e liberação dos zoósporos ao meio (3,5 h). Os zoósporos foram separados dos esporângios vazios por filtração em rede de náilon, foram recolhidos e concentrados por centrifugação em rotor GSA-Sorvall, a 4.000 rpm durante 5 minutos a 4°C.

Os zoósporos obtidos (2,3 x 10^9) foram ressuspensos em 5 ml de SE e a seguir adicionaram-se 5 ml de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contendo EDTA 10 mM, NaCl 1M e SDS 2%) e 10 ml de fenol equilibrado no mesmo tampão. A mistura foi agitada em agitador orbital durante 30 minutos a temperatura ambiente, e centrifugada em rotor basculante S4180-Beckman, a 4.800 rpm durante 20 minutos a 4°C. A fase aquosa foi recolhida e acrescentaram-se 5 ml de clorofórmio e 5 ml de fenol saturado em solução A. Após a centrifugação nas mesmas condições, a fase aquosa foi misturada com 10 ml de clorofórmio, e a mistura foi centrifugada novamente. Finalmente, a fase aquosa foi coletada, foram adicionados à mesma 40 ml de etanol gelado, seguindo-se incubação por 30 minutos em gelo seco. A suspensão foi centrifugada em rotor SS-34 (Sorvall), a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado final foi seco a vácuo e ressuspenso em 4 ml de solução SSC (NaCl 0,15 M, citrato de sódio 15 mM, pH 7,0). Após diálise com agitação suave contra SSC 0,1x durante a noite a 4°C, adicionou-se ao conteúdo do saquinho de diálise 0,2 ml de SSC 20x (concentração final igual a SSC 1x) e as enzimas α-amilase IIA (200μg/ml), RNase A (400μg/ml) e RNase T1 (280U) para a degradação de polissacarídeos e de RNA. A mistura foi incubada a 37°C com agitação, dialisando-se contra SSC 1x. A solução de diálise foi trocada após 3 h e então a diálise foi incubada durante a noite. A hidrólise de RNA foi acompanhada pela

diminuição da leitura da absorbância a 260 nm do tampão de diálise, até atingir aproximadamente uma ordem de grandeza menor que o valor inicial. No dia seguinte a diálise foi trocada novamente e adicionou-se pronase (350μg/ml). A seguir, o sistema foi incubado com agitação por mais três horas a 37 °C, até a absorbância a 260 nm cair a níveis próximos ao do branco de leitura (tampão de diálise). Após este período, a amostra foi retirada e foram adicionados 5 ml de fenol saturado em tampão B (Tris-HCl 500 mM, pH 8 contendo EDTA 10 mM, NaCl 10 mM e SDS 0,5%). A mistura foi mantida sob agitação em agitador orbital durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguindo-se centrifugação em rotor S4180-Beckman a 4.200 rpm durante 15 minutos a 4°C.

Finalmente, a fase aquosa foi recuperada e adicionou-se 2 volumes de etanol 100% gelado, seguindo-se incubação em gelo seco. A suspensão foi centrifugada em rotor SS-34-Sorvall a 8.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado foi seco a vácuo, ressuspenso em 1 ml de SSC 0,1x, e dialisado contra SSC 0,1x durante a noite a 4°C. A concentração do DNA e o grau de pureza foram estimados por medidas de absorbância a 260 nm e a 280 nm.

3.14) *Southern-blot* genômico.

Aproximadamente 10 μg de DNA total extraído de zoósporos de *B. emersonii* foram digeridos com várias enzimas de restrição e com combinações duplas dessas enzimas durante 4 h a 37°C. Após esse tempo, as digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TBE (Tris-HCl 0,89 M, pH8; ácido bórico 0,89 M; EDTA 20 mM), a 80 volts. O resultado da digestão foi visualizado com luz ultravioleta na presença de tampão contendo brometo de etídio e foi fotografado.

A seguir, o gel foi tratado sob agitação com solução de depurinação (HCl 250 mM) durante 15 minutos, depois com solução de desnaturação (NaOH 0,5 N; NaCl 1,5 M) durante 20 minutos e a seguir com solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M, pH 7,5; NaCl 1,5 M) durante 20 minutos. Após o tratamento do gel, o produto das digestões foi transferido para uma membrana de náilon (Hybond N, Amersham) embebida em tampão SSC 10x 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 minutos a 80 °C e o DNA transferido foi fixado à membrana sob luz UV. Após a fixação, a membrana foi incubada em solução de pré-hibridização (tampão fosfato de potássio 60 mM, pH 6,2 contendo leite em pó desnatado 5%, SSC 2x, EDTA 10 mM, SDS 0,1% e formamida 50%) durante 30 minutos, a 37°C. Após esse tempo, a sonda radioativa, marcada segundo o item 3.12) e previamente desnaturada durante 5 minutos a 94 °C, foi adicionada a essa solução e a incubação prosseguiu durante 16 h a 37°C. Após esse período, a solução contendo a sonda foi retirada e foram feitas três lavagens durante 30 minutos cada uma, a 42°C, primeiro com solução SSC 2x contendo SDS 0,1%, depois com SSC 0,5x contendo SDS 0,1% e, finalmente, com SSC 0,1x contendo SDS 0,1%.

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

3.15) *Northern-blot.*

Amostras de RNA total isolado de células coletadas em diferentes tempos da esporulação e da germinação foram fracionados por eletroforese em gel de agarose-formaldeído, conforme item 3.7.1). Após eletroforese, o gel foi incubado em solução de desnaturação (NaOH 0,05 N) durante 30 minutos, e a seguir em solução de neutralização (Tris-HCl 0,1 M pH 7,5; NaCl 0,15 M) também por 30 minutos. Após o tratamento, o RNA foi transferido para membrana de nylon (Hybond N^+, Amersham) em solução SSC 10x, também por pressão positiva, conforme item

3.13.2). As membranas foram incubadas primeiramente em solução de prehibridização (Na_2PO_4 120 mM, pH 7,2 contendo SDS 0,07%, NaCl 250 mM e EDTA 1 mM) durante 1 h. A hibridização foi feita no mesmo tampão, porém contendo a sonda radioativa previamente desnaturada por fervura, e a incubação prosseguiu a 42°C por 16h. Os filtros foram lavados seguindo o mesmo protocolo que em 2.13.2), mas a 42°C as duas primeiras lavagens e a 50°C a última. Finalmente, os filtros foram secos a temperatura ambiente, e expostos a filme de raios-X usando intensificador Cronex, ou a placa intensificadora de fósforo (phosphorimaging sheets, Storm) para sua análise com *Storm PhosphorImager* (Molecular Dynamics), e cálculo de densitometria com o programa *Image Quant*.

3.16) Amplificação rápida dos extremos do cDNA ("RACE").

Com o objetivo de obter a seqüência completa de um cDNA de interesse foram feitas amplificações da extremidade 5', ou da extremidade 3', dos cDNAs utilizando o kit *BD SMART RACE cDNA* (CLONTECH), seguindo as instruções do fabricante. A seqüência incompleta de interesse foi o fragmento 3' da seqüência do cDNA de um gene codificador para uma isoforma da centrina (BeCen2). Para amplificação da extremidade 5' foi feita a síntese da primeira fita do cDNA usando transcriptase reversa e o oligonucleotídeo 5'-CDS do *kit* como iniciador, durante 90 minutos, a 42 °C. A transcriptase reversa adiciona vários resíduos dC na extremidade 5' que servem para a hibridização de um segundo iniciador (BD SMART II A) utilizado para a síntese da segunda fita. A amplificação por PCR foi feita a seguircom um iniciador específico para o cDNA de interesse (os iniciadores 3' BeCen2-left ou BeCen2-left2), complementar da seqüência do fragmento 3' clonado, e um iniciador universal 5', o NUP (item 3.3). O protocolo de amplificação usado compreendeu 5 ciclos de 2 passos (94°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos), 5 ciclos de 3 passos (94°C por 30 segundos, 70°C por 30 segundos e 72°C por 3

minutos), e 25 ciclos de 3 passos (94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e 72°C por 3 minutos), totalizando 35 ciclos. Um fragmento de aproximadamente 400 pb foi obtido na amplificação do extremo 5' do cDNA *Becen2*, que foi clonado no vetor pGEM-T (Promega) e sequenciado.

3.17) Clonagem em vetores de expressão.

Diferentes seqüências de interesse foram subclonadas unidirecionalmente no vetor de expressão pMAL c-2 (NEBiolabs). A seqüência completa do cDNA codificador da centrina BeCen1, isolada no plasmídeo pSPORT1, foi digerida nos sítios *Eco*RI e *Hind*III e subclonada nos mesmos sítios em p-MAL c-2. Um fragmento do cDNA amplificado por RACE, codificador da centrina BeCen2 (conforme descrito em 3.16) foi obtido por PCR usando os iniciadores 4-4-BeCen2-MBP (iniciador 5') e SP6 (iniciador 3' do próprio plasmídeo), e então foi subclonado nos sítios *Eco*RI e *Not*I de pMAL c-2. Finalmente, o fragmento *Pst*I/*Hind*III do cDNA codificador da Cdk1 putativa foi subclonado nos mesmos sítios de pMAL c-2. As ligações obtidas foram usadas para transformar bactérias *E. coli* DH5α., que foram inoculadas em placas de LBA ágar contendo X-gal 0,002% (em DMF) e IPTG 1mM. Das transformantes obtidas foram selecionadas entre 20 e 30 colônias brancas de cada transformação, para extração dos plasmídeos e para digestão enzimática com o objetivo de comprovar os tamanhos dos insertos esperados. Dos clones positivos, com o tamanho esperado do inserto, um ou dois foram selecionados para testar a indução da expressão da proteína de fusão à proteína ligante de maltose (MBP).

Ensaios preliminares foram feitos para determinar o melhor tempo de indução e a localização da proteína (corpos de inclusão ou sobrenadante), seguindo-se as instruções do fabricante, exceto pela concentração de IPTG (0,6 mM) usado como indutor. Como tempos, foram avaliados 1, 2 e 3 h, e em todos os casos, estabeleceu-se 3 h como tempo máximo de

indução. Em um segundo teste, após as 3 h de indução, a amostra foi centrifugada a 4.000 xg durante 10 minutos a 4°C, e o precipitado foi ressuspenso em tampão de coluna (Tris-HCl 50mM pH 7,5 contendo NaCl 0,2 M e EDTA 1 mM) e congelado a –80°C durante 30 minutos. Após esse tempo, a suspensão foi sonicada 4 vezes durante 20 segundos, com intervalos de 30 segundos, e o lisado foi centrifugado a 9.000 xg durante 20 minutos, a 4°C. Precipitado e sobrenadante foram coletados e uma amostra de cada um foi ressuspensa em tampão de amostra para análise por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (Laemmli, 1970) determinando-se a expressão majoritária da proteína no sobrenadante. Finalmente, foram feitos os ensaios finais para a purificação da proteína de fusão, partindo de 80 ml de cultura que foram ressupensos em 10 ml de tampão de coluna.

3.18) Purificação das proteínas de fusão

As proteínas de fusão sintetizadas foram purificadas do sobrenadante do lisado bacteriano obtido como descrito em 3.17, por incubação com resina amilose-agarose. As amostras foram incubadas com a resina por 2 horas em agitador orbital a 4°C (5 ml de amostra em 4 ml de coluna que foi regenerada após uso). Após esse período, foram feitas 5 lavagens com tampão de coluna (descrito em 3.17) de 4 volumes cada uma, durante 5 minutos, seguidas de centrifugação a 1.500 xg em rotor basculante e sem freio. A eluição das proteínas de fusão foi feita no mesmo tampão de coluna contendo 20 mM de maltose (1:1). No caso da proteína de fusão BeCen1-MBP, a eluição foi feita também incorporando factor Xa (1 mg/ml) para obter o produto de fusão clivado ou sem clivar. O eluato contendo centrina livre foi usado para testar a união da centrina a cálcio. Os eluatos contendo a fusão BeCen1-MBP e a fusão BeCdk1-MBP foram usados para inoculação de coelhos visando a obtenção de anticorpos. O eluato contendo a fusão BeCen2-MBP foi usado como controle em experimentos de *Western-blot* com soros heterólogos. Os eluatos foram

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

concentrados 10 vezes. O eluato clivado foi concentrado por centrifugação usando o sistema centricon-10 (Amicon) e os demais foram concentrados usando o sistema centricon-30. Alternativamente, os eluatos foram concentrados por liofilização e a seguir dialisados contra 500 volumes de tampão de coluna. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS, para verificar a grau de pureza considerando massa molecular relativa calculada e para usar como controle da especificidade dos anticorpos obtidos.

3.19) Obtenção de anticorpos específicos

Duas coelhas para cada proteína foram imunizadas 3 vezes em intervalos de 15 a 30 dias, até a coleta final um mês após a última imunização. As inoculações foram feitas em doses subcutâneas de 1 ml contendo 300-500 μg de proteína de fusão e 0,5 ml de adjuvante completo (1° imunização) ou incompleto (2° e 3° imunização) de Freund. Quinze dias após cada injeção as coelhas foram sangradas para análise do soro por *Western-blot*.

3.20) Extração de proteínas totais de culturas de *B. emersonii*

Para a extração de proteínas totais, as células coletadas de cultivos sincronizados (conforme descrito em 3.6) e em diferentes tempos após a indução da esporulação e da germinação foram tratadas com ácido tricloroacético (TCA) a uma concentração final de 10% (36 ml de cultura). Após a incubação em gelo durante 30 minutos, as células foram centrifugadas a 1.500 xg por 10 minutos a 4°C, e os precipitados foram ressuspensos em 5 ml de NaOH 90 mM. A seguir as amostras foram sonicadas de 4 a 6 vezes com pulsos 20 segundos cada vez, com intervalos de 30 segundos, a uma potência de saída entre 40-60 Watts. A quebra das células foi monitorada pela observação ao microscópio óptico. Foram acrescentados 5 ml de TCA 20% e, após incubação em gelo durante 30 minutos, a suspensão foi centrifugada a 1.500 xg durante 10

minutos a 4°C. Os precipitados foram lavados 2 vezes com 5 ml de etanol 100% e a seguir foram lavados uma vez com 5 ml de clorofórmio/etanol (1:1). As centrifugações entre os passos foram feitas a 1.500 xg durante 5 minutos a 4°C. Os precipitados finais foram secos sob vácuo durante 10 minutos e depois foram ressuspensos em 2 ml de tampão de amostra 2x (Tris-HCl 62,6 mM pH 6,8 contendo glicerol 17,4% (v/v), SDS 4% e azul de bromofenol 0, 01%) para eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS, e alíquotas de 500μl foram estocadas a –20°C.

3.21) *Western-blot.*

Extratos de proteínas totais, obtidos conforme descrito em 3.20, foram resolvidos por electroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (SDS-PAGE) segundo o método descrito por Laemmli (1970). Previamente, as amostras foram fervidas por 5 minutos em tampão de amostra contendo β-mercaptoetanol 1,25% e, após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose segundo Towbin e colaboradores (1979). A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), porém a quantidade de proteína aplicada foi corrigida pela observação feita após a electroforese. A eletrotransferência foi feita em tampão para transferência semi-seca (Tris-base 25 mM; glicina 126 mM; etanol 20%) utilizando o sistema Multiphor II (Amersham-Pharmacia) segundo instruções do fabricante e foi verificada por coloração das membranas com Ponceau S 0,1 % em ácido acético 10%.

Após a eletrotransferência as membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5 % em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM) durante 30 minutos, a temperatura ambiente, seguindo-se incubação com o primeiro anticorpo durante a noite, a 4°C. Após o primeiro e o segundo anticorpos, a membrana foi lavada 4 vezes durante 5 minutos com TBS-T (TBS contendo Tween 20 0,05%), e uma última vez durante 10 minutos com TBS, a temperatuta ambiente. Como segundo anticorpo foi utilizado um conjugado a peroxidase ou a fosfatase

alcalina. Considerando o conjugado usado, o *Western-blot* foi revelado com os reagentes ECL para quimioluminiscência (Amersham Bioscience) após a exposição a filme de raio-X para quimioluminiscência (Amersham Bioscience), ou com tampão para fosfatase alcalina (Tris-HCl 10 mM, pH 9,0; NaCl 100 mM; $MgCl_2$ 5 mM) contendo BCIP (0,3 mg/ml) e NBT (0,15 mg/ml).

3.22) Avaliação da capacidade de ligação a cálcio

Alíquotas da proteína de fusão BeCen1-MBP eluída da resina amilose-agarose em tampão de coluna contendo maltose e fator Xa foram incubadas com $CaCl_2$ 5mM ou com EGTA 2mM, logo foram ressupensas em tampão de Laemmli e fervidas, seguindo-se eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (Laemmli, 1970).

3.23) Ensaio de imunolocalização.

Zoósporos obtidos de placas de PYG ágar foram coletados em água milli-Q estéril e foram fixados com um volume de para-formaldeído 4% em PBS (Sambrook *et al.*, 1989) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram centrifugadas 3 minutos a 5.000 xg, e lavadas duas vezes com PBS. Após as lavagens, as células foram ressuspensas em PBS e colocadas sobre poços de lâmina de fluorescência. A seguir, as suspensões foram secas a 37°C, lavadas com água destilada e o excesso de água foi retirado com papel de filtro. Os poços foram bloqueados com leite desnatado 5% em PBS-T (PBS contendo 0,05% de Tween 20), durante 30 minutos a 37°C e, após de retirado o excesso, as células foram incubadas com diferentes diluições de anti-soros específicos (1/50, 1/100,1/200 e 1/400) em leite desnatado 1% em PBS contendo 0,01 % de Tween 20 (PBS-T).

Um conjunto de células foi incubado com soro pré-imune ou com anti-soro policlonal anti-BeCen1, com anti-soro policlonal purificado por afinidade anti-ScCdc31 ou com anti-soro

policlonal anti-HsCen3. Um segundo conjunto de células foi incubado com soro pré-imune ou com anti-soro policlonal anti-BeCdk1, nas mesmas diluições. As lâminas foram deixadas em câmara úmida durante a noite, a 4°C. Após a incubação com o anti-soro primário, as lâminas foram lavadas 3 vezes durante 5 minutos com PBS-T, e incubadas com anti-soro secundário conjugado com *alexagreen* (Molecular Probes) no mesmo diluente que o anti-soro primário. As novas incubações foram feitas em câmara úmida durante 1 hora, a 37°C. Junto com o anti-soro secundário foi acrescentado DAPI 0,001% (Molecular Probes) para visualização dos núcleos.

Após a segunda incubação, as lâminas foram submetidas às mesmas lavagens que as usadas para retirar o excesso de anticorpo primário e foram secas a temperatura ambiente, retirando-se o excesso de líquido com papel de filtro. Finalmente, as lâminas foram montadas em solução de montagem (glicerol/PBS 1:1, pH 8,0) e estocadas no escuro a 4°C até sua observação sob microscópio de fluorescência. A captura de imagens foi feita em um microscópio óptico Nikon Microphot-FX e o programa de computador Image-Pro Plus (Media Cybernetics).

3.24) Ensaios para a avaliar a influência de diferentes açúcares ou de análogos não metabolizáveis nos fenótipos de células de *B. emersonii* na fase de esporulação.

A avaliação da influência de diferentes açúcares ou de análogos não metabolizáveis sobre o processo de esporulação foi feita como descrito por Correa e Lodi (1986), com algumas modificações. 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 6 h a 27°C, foram lavadas 3 vezes com 1,1 ml de SE, e foram induzidas a esporular em SE em um volume de 1,4 ml, na presença ou na ausência de monosacarídeos ou de análogos não metabolizáveis, em diferentes concentrações. Os ensaios foram feitos com glicose ou com manose em concentrações

entre 0,1% e 2% (5,5 mM a 100 mM), com frutose ou com galactose em concentrações de 2%, e com 2-deoxiglicose e com 3-O-metilglicose em concentrações de 0,1%. Também foi usado glicerol 1% (100 mM). Durante os ensaios, a progressão da esporulação foi acompanhada pela mudança no fenótipo do zoosporângio (de zoosporângio septado, para zoosporângio papilado, e para zoosporângio vazio) (Correa & Lodi, 1986; Peralta & Lodi, 1988). Para analisar o efeito da glicose na esporulação foi calculada a porcentagem de zoosporângios vazios aos 240 minutos após a indução da esporulação, na presença e na ausência de glicose (2% em SE), sobre a média de três experimentos.

3.25) Análise filogenética

As seqüências dos cDNA de interesse foram traduzidas e as seqüências de amino ácidos deduzidas foram alinhadas com outras seqüências obtidas do GenBank usando o programa ClustalW versão 1.82 (Thompson *et al.*, 1994). Os alinhamentos foram revisados manualmente e foram feitas árvores baseadas no algoritmo de agrupamento de vizinhos (ou *Neighbor-joining*) com correção gama (Saitou & Nei, 1987), usando o pacote de programas MEGA versão 2.1 (Kumar *et al.*, 2001) e o teste de amostragem (ou *bootstrap*) (Felsenstein, 1985) sobre 1.000 repetições para estimar o suporte da árvore obtida.

4) RESULTADOS

4.1) Construção das bibliotecas de cDNA, processamento e anotação das seqüências expressas.

Dez bibliotecas de cDNA foram construídas a partir dos RNA mensageiros isolados de células sincronizadas ao longo da fase de esporulação e de células vegetativas do fungo: quatro normais, quatro subtrativas, e duas normais feitas de cDNA gerado como controle da subtração, aqui denominadas *não subtrativas*, para distingui-las das outras quatro normais. As bibliotecas foram avaliadas pela qualidade da informação que apresentavam (Tabela 1).

Tabela 1. Bibliotecas de cDNA construídas a partir de mRNAs de *B. emersonii* obtidos de células ao longo da fase de esporulação e da fase vegetativa do fungo.

Biblioteca	Fonte
E30	Zoosporângios, 30 minutos após a indução da esporulação.
E60	Zoosporângios, 60 minutos após a indução da esporulação.
E90	Zoosporângios, 90 minutos após a indução da esporulação.
E120	Zoosporângios, 120 minutos após a indução da esporulação.
SV	Células vegetativas imediatamente antes da indução da esporulação e após a subtração de mRNAs de células de 120 minutos de esporulação.
SE120	Zoosporângios, 120 minutos após a indução da esporulação e após a subtração de mRNAs de células vegetativas.
SVB	Idem SV, mas eliminando o passo de digestão com RsaI na construção.
SE120B	Idem SE120, mas eliminando o passo de digestão com RsaI na construção.
NSV	Células vegetativas imediatamente antes da indução da esporulação.
NSE120	Zoosporângios, 120 minutos após a indução da esporulação*.

*: A biblioteca NSE120 diferentemente da E120 envolveu um passo de PCR na sua construção.

As bibliotecas subtrativas fizeram parte de uma estratégia de clonagem de RNAs mensageiros pouco abundantes e com pouca probabilidade de serem obtidos nas bibliotecas normais. Entretanto, as quatro bibliotecas correspondentes (chamadas SV, SE120, SVB e SE120B) produziram como resultado um nível alto de redundância de poucos RNAs mensageiros e seqüências muito curtas sem similaridade com as seqüências existentes nos bancos de dados, que poderiam ser novos genes ou fragmentos pouco conservados de genes já conhecidos. Como conseqüência, os dados resultaram insatisfatórios e foram excluídos desta análise.

As seqüências das restantes seis bibliotecas normais foram avaliadas comparativamente, na medida em que iam sendo geradas, em relação ao o tipo e qualidade de informação que produziam. Em uma primeira fase do seqüenciamento, observou-se que uma das duas bibliotecas não subtrativas (chamada NSE120) gerava poucas seqüências novas em relação à biblioteca análoga E120 (uma das outras cinco bibliotecas normais, incluindo NSV) e, portanto, optou-se por continuar seqüenciando a E120 e abandonar a NSE120.

Finalmente, realizou-se um programa de seqüenciamento baseado em cinco bibliotecas normais de seqüências expressas, provenientes de diferentes momentos ao longo da fase de esporulação e da fase vegetativa do fungo *B. emersonii.* (Tabela 2). O número de seqüências gerado e aceito de cada biblioteca esteve dentro da faixa de 1.020 a 2.265, dependendo da redundância de cada biblioteca em particular e da redundância do conjunto. Neste sentido, o seqüenciamento foi continuado enquanto a porcentagem de novas seqüências em cada grupo de 96 atingisse aproximadamente 10%.

Tabela 2: Características das bibliotecas de cDNA de *B. emersonii*.

Nome da biblioteca	Seqüências totais	Seqüências aceitas	Nº de *contigs*	Nº de *singletes*	Nº de *uniseqs*	RNA cont. (%) [a]	Média das seqüências [b]	Rd (%)
E120	2976	1550	260	629	889	0,0007	485	42,6
E90	2496	2265	338	1083	1421	NR	592	37,3
E60	1920	1836	321	726	1047	0,004	593	43,0
E30	2016	1824	231	668	889	0,002	605	51,2
NSV	1152	1020	166	209	375	0,02	391	63,0

Contigs = conjuntos de seqüências que apresentaram superposição, determinados com o *Cap3*; *singletes* = seqüências isoladas que não foram incluídas em nenhum *contig*; *uniseqs* = seqüências únicas soma dos singletes e um representante de cada *contig*. Rd (Redundância) = (Nº ESTs totais - Nº *uniseqs*) / Nº ESTs totais x 100. [a] RNA ribosomal e RNA mitocondrial. [b] Média dos tamanhos das seqüências utilizáveis após o processamento.

As bibliotecas também foram processadas em conjunto para a avaliação do programa de seqüenciamento global, gerando como resultado 10.560 seqüências (Tabela 3). O conjunto reúne as ESTs obtidas na fase de esporulação e vegetativa. Após o processamento das ESTs foram obtidas 8.495 seqüências expressas, o que representa 80% de aproveitamento das seqüências geradas. A faixa de tamanhos de inserto sugeriu que pelo menos uma parte deles poderia conter seqüências codificadoras completas (Tabela 3). Alguns alinhamentos, com proteínas que apresentam a extremidade amino terminal altamente conservada, indicaram que tinham sido isoladas várias seqüências completas entre os cDNAs. Com base em uma estimativa prévia das seqüências codificadoras completas cobertas no transcriptoma de *B. emersonii* (Ribichich *et al.*, submetido) foi feita uma procura das mesmas entre as *uniseqs*. O resultado indicou a existência de 14% (452) de seqüências prováveis. O tamanho médio do total das seqüências (534 nt) também sugeriu que a maioria das leituras tinha se estendido pelo menos até parte da região codificadora.

Tabela 3. Características do conjunto das seqüências expressas de *B. emersonii*.

Total de seqüências	10.560
Seqüências aceitas[a]	8.495
Média do tamanho dos insertos[b] **(pb)**	650
Média do tamanho das seqüências[c] **(nt)**	534
RNA contaminante[d] **(%)**	< 0,003
Número de *contigs*	1.113
Número de *singletes*	2.093
Número de *uniseqs*	3.206
Redundância (%)	62
Número estimado de seqüências completas	452
Seqüências expressas com identificação no GenBank	1.825 (57 %)
Seqüências expressas sem identificação no GenBank	1.401 (43 %)
Seqüências expressas com identificação no Swiss-Prot and TrEMBL	1.591 (49 %)
Seqüências expressas sem identificação no Swiss-Prot and TrEMBL	1.635 (51%)

[a]Seqüências com um mínimo de 150 pb e de valor de qualidade *Q* dada pelo *Phred* ≥ 15. [b]A media dos tamanhos dos insertos foi calculada tomando por base reações de PCR de 1500 clones de diferentes bibliotecas de cDNA. [c]Média do tamanho da seqüência após o processamento. [d]RNA ribosomal e RNA mitocondrial.

A identificação putativa das 3.226 seqüências únicas feita por comparação com as seqüências da base não redundante do *GenBank* mostrou resultados um pouco diferentes daquela feita ao comparar as nossas seqüências com a base de proteínas do *Swiss-Prot and TrEMBL*, e ao anotá-las de acordo com as ontologias do consórcio GO (Tabela3). Variações no número de seqüências identificadas e na identificação propriamente dita já era esperado considerando as diferenças existentes entre um e outro sistema de identificação. Diferenças claras podem ser atribuídas ao tamanho dos bancos de dados, às restrições impostas às seqüências para serem aceitas em uma ou outra destas bases, e à variável usada para estabelecer o ponto de corte em um e outro caso, *bit score* no *GenBank* e *E-value* no *Swiss-Prot and TrEMBL*. O *bit score* representa o *score* ou a pontuação que o alinhamento recebe, normalizada pelo sistema de pontuação usado, o que permite comparar pontuações de alinhamentos provenientes de diferentes buscas; o *E-value* ou valor esperado representa o número de alinhamentos que é *esperado* que ocorram ao acaso quando são gerados em uma base de dados de um determinado tamanho; devido a isso o *E-value* vai se modificando na medida em que o tamanho da base aumenta e, embora haja uma relação entre o *bit score* e o

E-value, essa relação não é fixa. Entretanto, apesar das considerações feitas acima serem significativas ao comparar os dois sistemas de identificação, parte da diferença no número de seqüências identificadas putativamente pode ser explicada pelo número de proteínas hipotéticas considerado em um e outro caso. As proteínas hipotéticas não possuem uma designação na hierarquia do GO devido a que elas não representam uma entidade biológica. De acordo com isso, as proteínas hipotéticas que poderíamos chamar de "puras" não são anotadas, ou seja, não são anotados os quadros de leitura abertos sem evidência de serem transcritos e sem similaridade significativa com alguma proteína ou domínios de proteínas caracterizados. Como conseqüência, o número de proteínas hipotéticas identificadas no *GenBank* (744) caiu drasticamente após a sua classificação em uma ou mais ontologias (266) e essa queda cobre amplamente a diferença no número de seqüências anotadas (234). Entretanto, parte dessas 234 seqüências deve corresponder a seqüências não incorporadas à base *Swiss-Prot and TrEMBL*.

O número de seqüências não identificadas por ambas as vias (43% e 51%) constitui uma porcentagem grande semelhante à porcentagem de genes sem identificação putativa indicados em outros fungos como *N. crassa* (41%) ou *Paracoccidioides brasiliensis* (52%). As razões para essa porcentagem elevada podem ser diversas (ver DISCUSSÃO). Uma das razões poderia ser uma elevada taxa de evolução das seqüências de *B. emersonii* em relação à de outros organismos, resultando em uma proporção das mesmas que não pudesse ser identificada por alinhamentos. Para testar esta hipótese, decidimos comparar a divergência de seqüência entre pares de ortólogos de *B. emersonii* e de *Neurospora crassa* (ascomiceto) (Figura 6 a,b) com respeito a organismos distintos dos fungos, representados por animais e por plantas. A mesma comparação foi feita para pares de ortólogos de *B. emersonii* e de *Ustilago maydis* (basidiomiceto) (Figura 6 c,d). Para os dados analisados não há uma divergência maior nas seqüências de *B. emersonii* que nas seqüências de outros fungos. Isso

estaria indicando que uma taxa de evolução molecular maior que a dos outros fungos não seria uma das causas predominantes para o número de seqüências órfãs obtido.

Das 3226 *uniseqs* putativas obtidas após o agrupamento, 1591 (49%) foram anotadas pela classificação do GO, entre as três ontologias do sistema: processo biológico, componente celular e função molecular. O objetivo do Consorcio *Gene Ontology* é propor um vocabulário estruturado para descrever estes três conceitos que representam conjuntos de

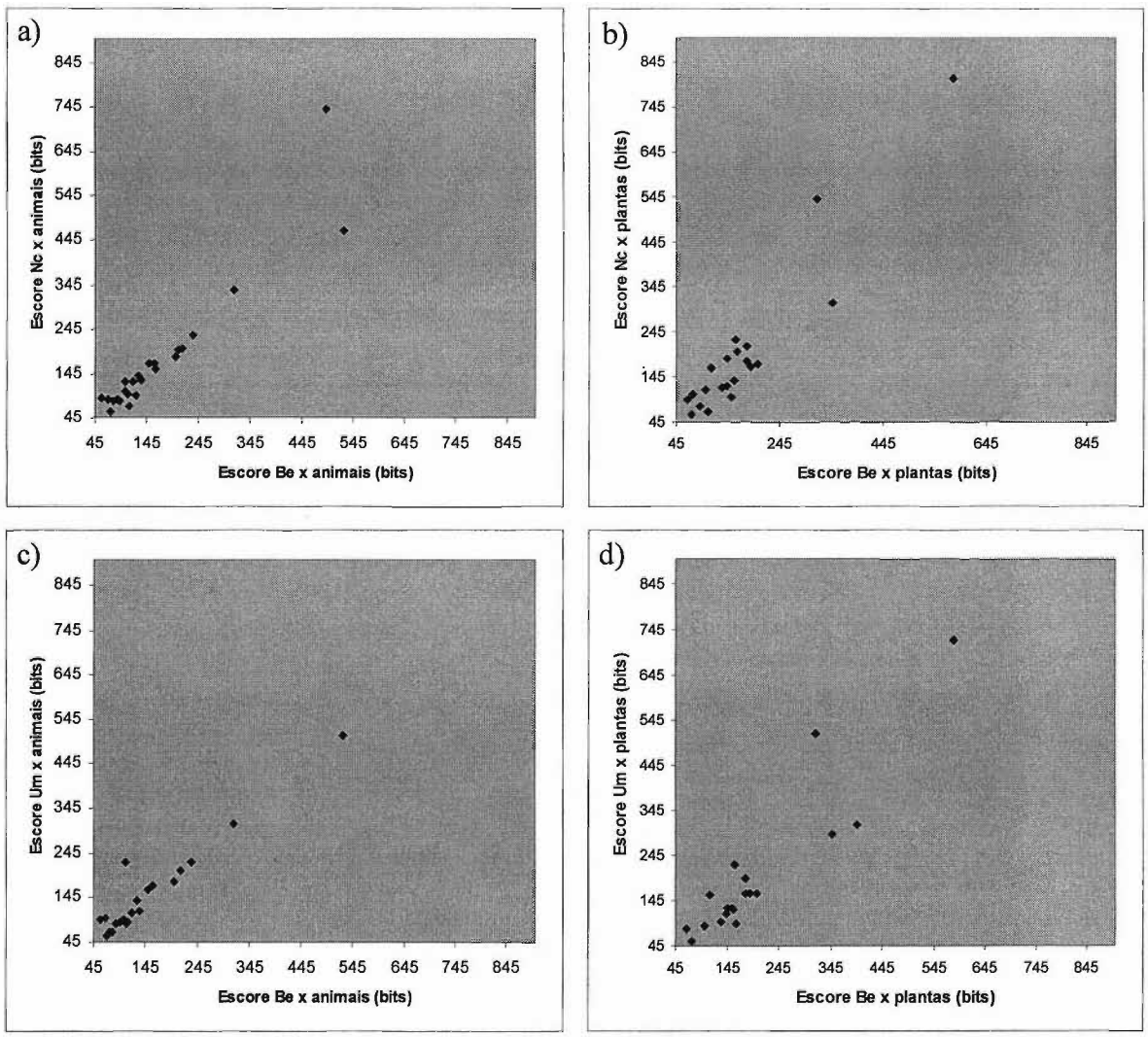


Figura 6. Divergência entre pares de ortólogos de *B. emersonii* e *N. crassa* (a, b) e *B. emersonii* e *U. maydis* (c, d) e animais (a, c) ou plantas (b, d). Os gráficos representam os valores dos escores normalizados obtidos usando a ferramenta BLASTX (a, c) ou tBLASTX (b, d). Os números colocados no canto superior direito de cada gráfico correspondem aos coeficientes de correlação.

informações comuns a todas as formas de vida. Cada termo pode ter uma ou mais relações com outros termos, estando ligados uns aos outros pelas relações "é um" e "é parte de", sendo que termos muitos gerais e termos muito precisos estão ambos representados. Como conseqüência deste mecanismo de anotação um mesmo *singlete* ou *contig* pode ser classificado em mais de uma categoria.

Das 1591 seqüências anotadas, 1185 (74%) *singletes* ou *contigs* foram incluídos na categoria processo biológico. Uma primeira análise envolveu o cálculo das porcentagens das seqüências classificadas em processos biológicos maiores. No cálculo, foram eliminadas manualmente as seqüências anotadas em mais de um processo biológico particular pertencente ao mesmo processo principal, para minimizar o efeito de superestimar a contagem de seqüências envolvidas nos processos principais. As maiores porcentagens corresponderam a metabolismo de proteínas (*protein metabolism* no GO) com 22%, crescimento celular e manutenção (*cell growth and maintenance* no GO) com 19% e metabolismo de bases nitrogenadas, nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos (*nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism* no GO) com 13% (Figura 7).

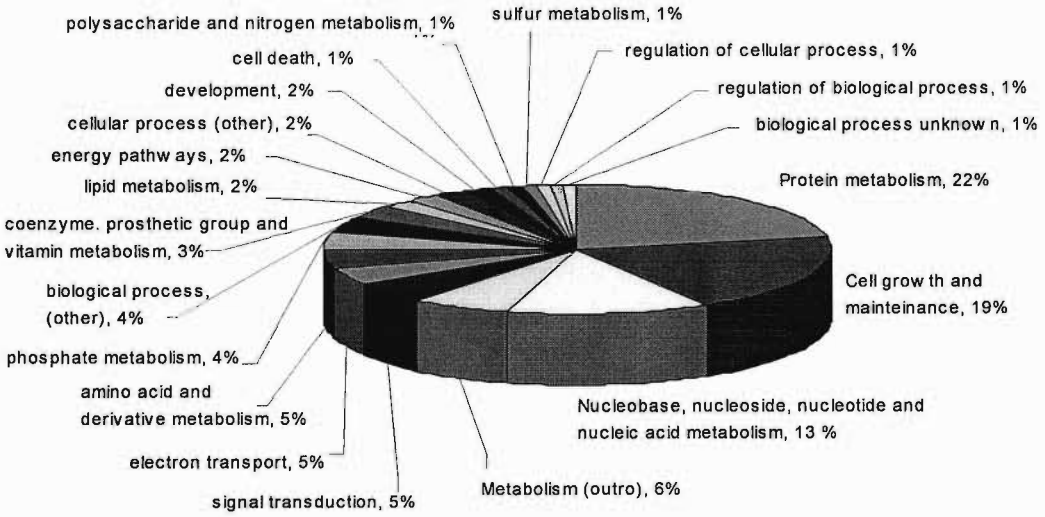


Figura 7. Classificação das seqüências expressas (1185) feita seguindo a categorização do consorcio *Gene Ontology.* O nome das categorias foi mantido na língua original para facilitar a análise.

Dentro destes processos principais, os processos mais representados foram os de síntese de proteínas (37%) (Figura 8a), transporte (54%) (Figura 8b), e transcrição (29%) (Figura 8c), respectivamente.

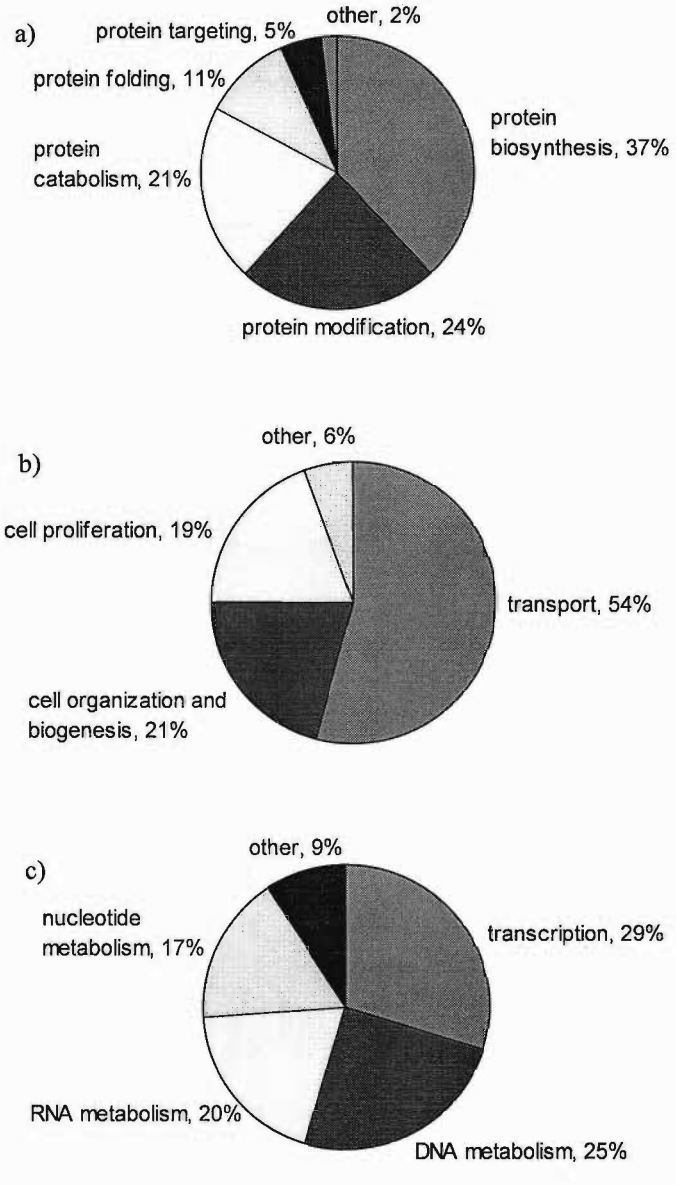


Figura 8. Classificação das seqüências expressas dentro dos processos biológicos mais representados seguindo a categorização do consorcio *Gene Ontology*. a) Metabolismo de proteínas, b) crescimento celular e manutenção, c) metabolismo de bases nitrogenadass, nucleosídeos, nucleotídeos e ácidos nucleicos O nome das categorias foi mantido na língua original para facilitar a análise.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Os *contigs* também foram organizados por seu tamanho, isto é, o número de ESTs presente em cada um deles (Figura 9), para avaliar quais seqüências expressas estavam mais representadas. A maioria dos dez *contigs* mais representados está envolvida no processo de biossíntese de proteínas, codificando especificamente proteínas ribossomais (Tabela 4). Outro dos *contigs* majoritários codifica poliubiqüitina que parece estar envolvida em processos diversos, e consequentemente não é categorizada em um processo específico pelo *GO*. Entretanto, um dos processos mais conhecidos do qual ela participa é o da poliubiqüitinação ou marcação de proteínas para a sua degradação, processo oposto ao de biossíntese. Dentro deste processo (incluído em *protein modification*) foram registrados 18 *contigs* ou *singletes* diretamente envolvidos com poliubiqüitinação, sendo provável que a poliubiqüitina esteja participando também deste processo.

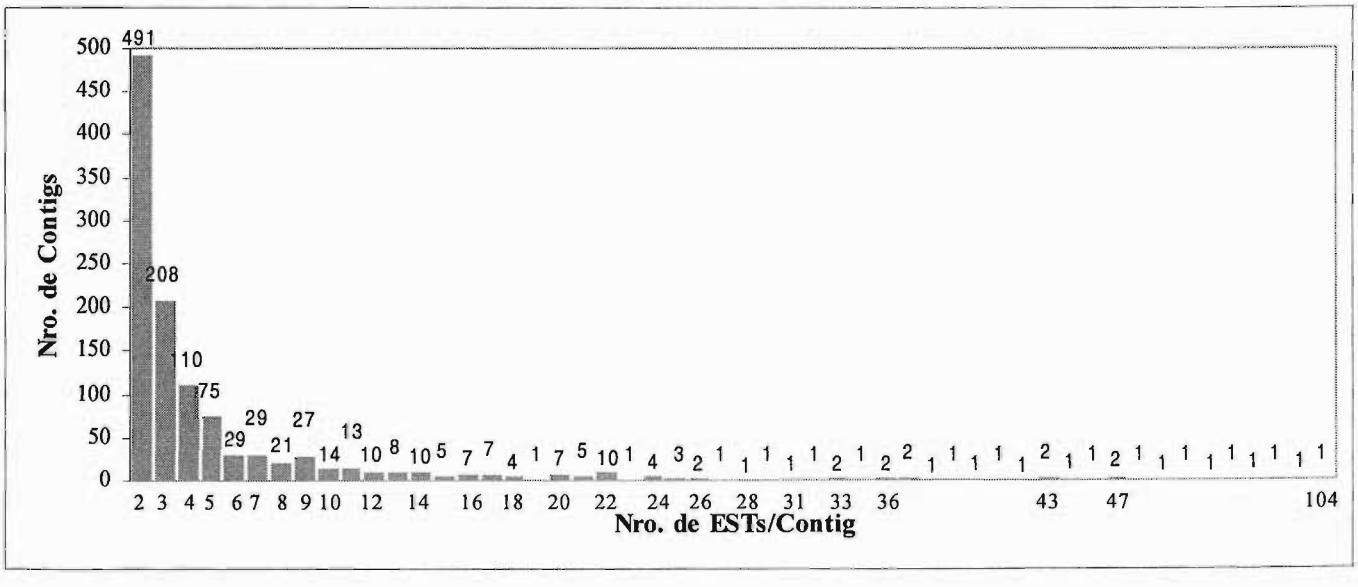


Figura 9. Distribuição dos *contigs* pelo número de seqüências expressas.

O perfil de expressão dos transcritos foi analisado pelo perfil de transcrição *in silico* (ou *Northern* digital) ao longo da fase de esporulação do fungo. A biblioteca NSV foi excluída da

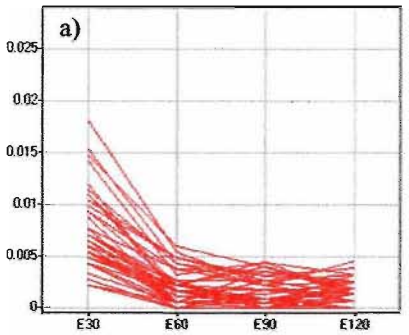
análise devido ao passo de PCR na sua construção. O método usado calcula intervalos de erro (ou intervalos de credibilidade) para os resultados de abundância de cada seqüência expressa em cada amostragem (neste caso para cada biblioteca) o que permite estabelecer um grau de confiança ao avaliar os perfis gerados. Dos 1185 *contigs* analisados, pelo menos 91 apresentaram um perfil de expressão regulado durante a esporulação, segundo os resultados do *Northern* digital e com base em um intervalo de credibilidade previamente adotado (vide item 3.8.4).

Tabela 4. ESTs mais abundantes durante a esporulação. O código GO:0006412 corresponde ao processo biossíntese de proteínas.

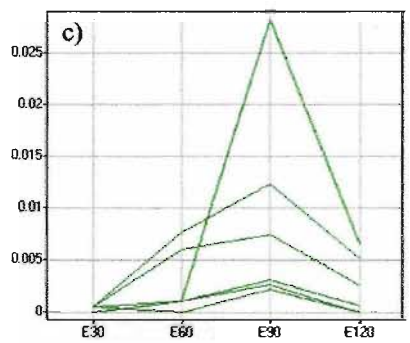
Nº de ESTs/ freqüência (%)	**Identificação putativa pelo BLASTX**	**Organismo**	**Código do SWISS-PROT/ TREmbl**	**Código do GO p/ processos biológicos**
104 (1.22)	Polyubiquitin	*Schyzosaccharomyces pombe*	O74819	
76 (0.90)	No match			
64 (0.75)	Ribosomal protein S4 Y isoform	*Monodelphis domestica*	O62739	GO:0006412
62 (0.73)	Ribosomal protein 22 of the small subunit	*Phafffia rhodozyma*	Q9UUP9	GO:0006412
60 (0.71)	ENSANGP00000014921 (Fragment)	*Anopheles gambiae str. PEST*	Q7PQZ6	GO:0006412
53 (0.62)	40S ribosomal protein S9	*Podospora anserina*	P52810	GO:0006412
52 (0.61	Hypothetical protein	*Neurospora crassa*	Q7RWD9	GO:0006412
51 (0.60)	Tubulin alpha-6 chain	*Mus musculus*	P05216	GO:0007010
48 (0.57)	60S ribosomal protein L1-B	*Schyzosaccharomyces pombe*	O74836	GO:0006412
47 (0.55)	40S ribosomal protein S29	*Neurospora crassa*	Q9C2P2	GO:0006412

Estes 91 *contigs* foram agrupados seguindo o algoritmo *K-means* de formação de grupos pelo perfil de expressão (*clusters*), usando correlação-cosseno (ou *cosine correlation*) como métrica para identificar transcritos co-regulados (Figura 10). Diferentemente da correlação, a média aritmética não é subtraída na correlação-cosseno. Isso traz como conseqüência que perfis com a mesma forma, mas com valores muito diferentes apresentem uma correlação menor e

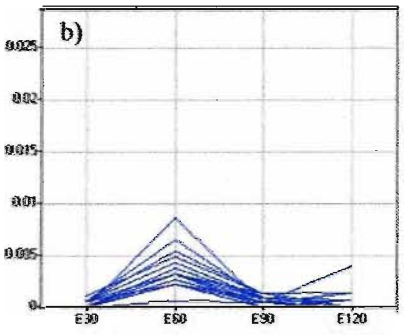
Figura 10. Perfis de expressão *in silico* (abundância) de 91 transcritos durante a fase de esporulação de *B. emersonii*. A abundância foi estimada considerando o número de ESTs seqüenciados para um dado transcrito dividido pelo número total de ESTs seqüenciados em cada biblioteca (E30, E60, E90, E120). Os perfis foram selecionados dos dados do *Northern* digital baseado em um intervalo de erro (ou intervalos de credibilidade) de 68%, e foram submetidos a agrupamento pelo perfil segundo o algoritmo *K-means*, estabelecendo 4 grupos *a priori* (a, b, c, d) e usando correlação cosseno como métrica. Os gráficos mostram os perfis de expressão agrupados nos grupos 1 (a), 2 (b), 3 (c) e 4 (d) do *K-means*. Sob cada gráfico são apresentados os melhores alinhamentos obtidos para cada *contig* do grupo usando a ferramenta BLASTX contra a base de dados *Swiss-Prot and TrEMBL* (*Evalue* $\leq 10^{-6}$). A ordem das identificações putativas no texto segue a ordem do aparecimento das curvas em cada gráfico. Em vermelho, os *contigs* incluídos dentro dos processos síntese de proteínas e componente estrutural do ribossomo; em azul claro e em violeta, os incluídos dentro do processo catabolismo de proteínas e em dobramento de proteínas, respectivamente; em marrom, os incluídos em atividade motora e movimento baseado em microtúbulos; realçado em cinza, os incluídos em metabolismo de carboidratos.



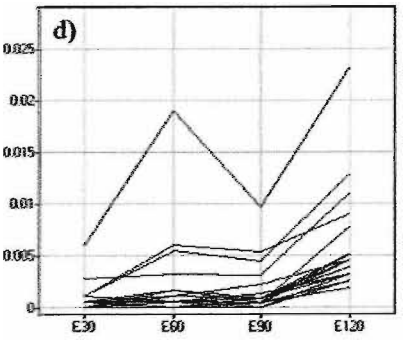
Contig1039	Q9SIP7 40S ribosomal protein, contains C-terminal domain
Contig1050	P49242 40S ribosomal protein S3a
Contig1060	O13614 40S ribosomal protein S10-B
Contig1076	Q8ISP0 40S ribosomal protein S18
Contig1081	Q7SZA4 Hypothetical protein
Contig1100	Q90YV5 60S ribosomal protein L13
Contig1115	P25388 Guanine nucleotide-binding protein beta subunit-like protein 12.3
Contig1136	Q9C3Z6 60S acidic ribosomal protein P0
Contig1145	Q93VC6 Putative 40S ribosomal protein S5
Contig1180	Q8TFM9 60S acidic ribosomal protein P2
Contig1228	no match
Contig1241	Q95UT9 Elongation factor 1 alpha long form
Contig1249	Q8WZP0 Serine protease 1
Contig1263	Q7QC42 AgCP1729 (Fragment)
Contig1277	Q07135 Histone H2A, orphon
Contig1292	O76190 60S ribosomal protein L5
Contig1300	P10659 S-adenosylmethionine synthetase 1
Contig1368	Q9P720 60S ribosomal protein L16
Contig1376	Q7PSW8 ENSANGP00000023750
Contig1393	Q7RWD9 Hypothetical protein
Contig1395	Q8MY15 Ubiquitin
Contig1400	Q969V7 Similar to ribosomal protein L8
Contig1412	Q8MUE5 Ribosomal protein S20
Contig1414	Q7SD62 Hypothetical protein
Contig1436	P52810 40S ribosomal protein S9
Contig1472	P50344 60S acidic ribosomal protein P1
Contig1481	Q8ISP4 Ribosomal protein S12
Contig1517	O75000 60S ribosomal protein L12
Contig1641	O62739 Ribosomal protein S4 Y isoform
Contig1678	Q7S2M9 Hypothetical protein
Contig512	Q7SBD5 Hypothetical protein
Contig566	Q9UUP9 Ribosomal protein 22 of the small subunit
Contig58	Q9P7J6 40S ribosomal protein S17-B
Contig647	Q9BMX5 40S ribosomal protein S6
Contig713	Q7RV88 Eukaryotic initiation factor 4A
Contig900	O74836 60S ribosomal protein L1-B
Contig941	O57592 60S ribosomal protein L7a
Contig968	P23821 40S ribosomal protein S7
Contig970	Q7PXS7 AgCP12166 (Fragment)
Contig98	Q7XMJ1 OSJNBb0006N15.8 protein
Contig990	Q9D8Q1 3100001N19Rik protein



Contig1869	no match
Contig1548	no match
Contig1606	P05216 Tubulin alpha-6 chain
Contig1670	P24032 Myosin regulatory light chain 2, smooth muscle minor isoform
Contig1596	P24487 ATP synthase alpha chain, mitochondrial precursor
Contig1661	no match
Contig1581	no match



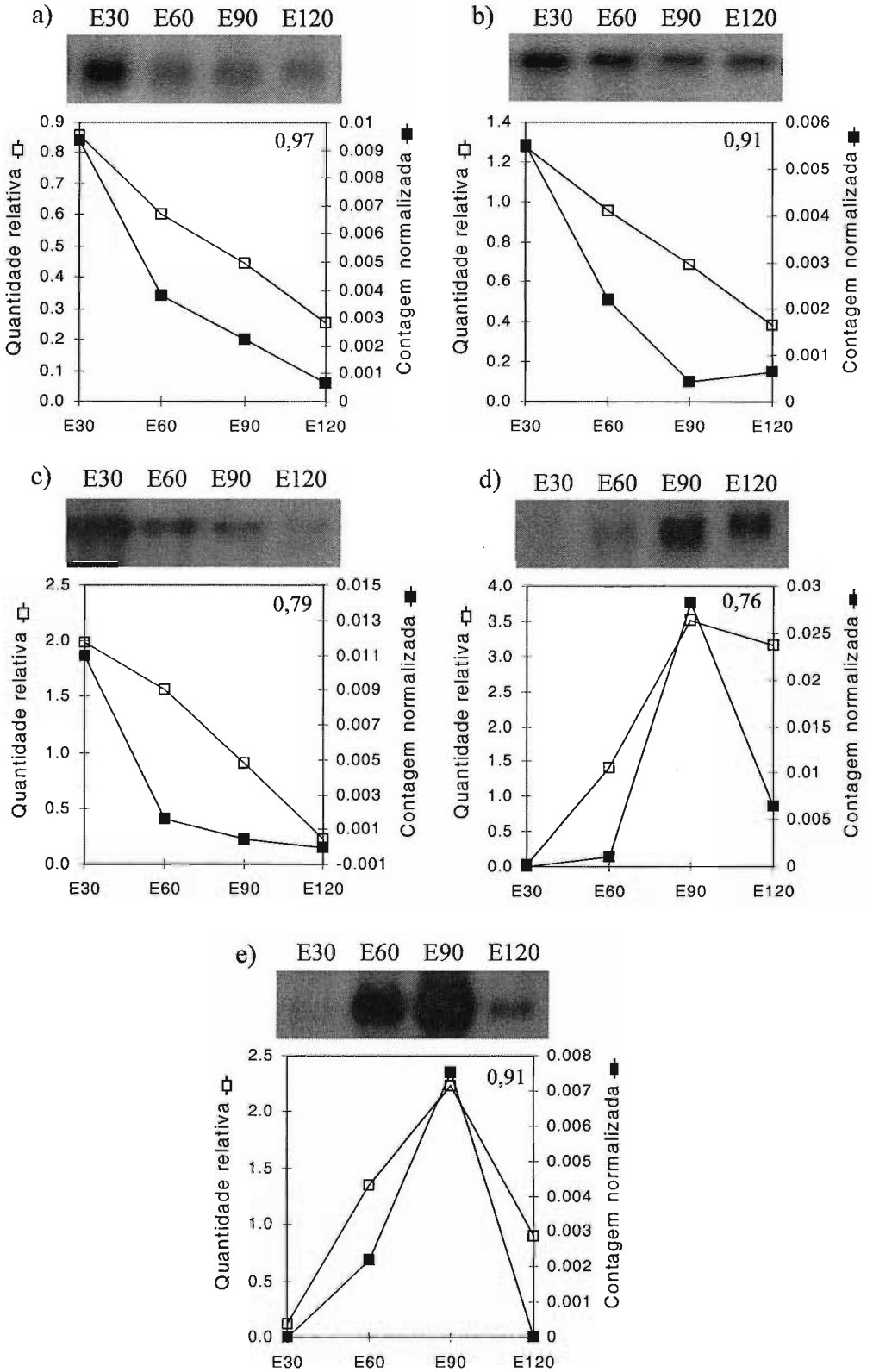
Contig1630	no match
Contig344	P40581 Glutathione peroxidase 3
Contig71	Q8QHI3 ADP-ribosylation factor-like protein 3
Contig384	no match
Contig1117	P32911 Protein translation factor SUI1
Contig426	P53659 Vacuolar ATP synthase subunit d
Contig408	Q8X077 Probable proteasome subunit alpha type 2
Contig361	O81340 26S proteasome regulatory subunit S5A
Contig238	Q9P602 ATP synthase oligomycin sensitivity conferral protein, mitochondrial precursor
Contig1202	Q7QFQ3 EbiP7334 (Fragment)
Contig1092	P33126 Heat shock protein 82
Contig1135	Q7S2D6 Hypothetical protein
Contig1835	Q7PR26 ENSANGP00000017585
Contig209	Q7NIJ8 Gll1135 protein
Contig226	Q9SEE4 Pirin-like protein
Contig211	Q7ZZ05 Slzc14A17.1
Contig1794	Q870G2 Proteinase A
Contig261	Q872J2 Probable clathrin-associated adaptor complex medium chain
Contig1327	P78921 Probable T-complex protein 1, theta subunit



Contig1643	O74819 POLYUBIQUITIN
Contig1797	P41340 Actin 3
Contig1387	Q9HFY6 Calmodulin
Contig452	P05216 Tubulin alpha-6 chain
Contig376	Q9FRD2 Putative vesicle soluble NSF attachment protein receptor
Contig92	Q9NFZ6 Tubulin beta-2 chain
Contig1270	P25349 Hypothetical 26.4 kDa protein in CDC10-CIT2 intergenic region
Contig124	no match
Contig606	no match
Contig221	Q12741 cAMP-dependent protein kinase catalytic subunit
Contig68	P34728 ADP-ribosylation factor
Contig1	P56205 Cytochrome c
Contig159	Q9D5P6 4930403C08Rik protein
Contig110	P34991 S-phase kinase-associated protein 1A
Contig39	no match
Contig1566	Q7PLC6 CG12449-PD
Contig37	no match
Contig49	no match
Contig75	no match
Contig1616	no match
Contig1867	Q96VN0 Chitin deacetylase
Contig91	no match
Contig1367	Q874N9 Ribosomal protein L37A
Contig1461	Q9HEM9 14-3-3-like protein

possam ser, eventualmente, agrupados em *clusters* diferentes. A maioria das seqüências com maior abundância (vide Tabela 4) foram incluídas dentro do conjunto de 92 perfis, o que indica a importância da regulação da expressão destas seqüências para a esporulação. Do total, 7 codificam proteínas hipotéticas, 15 não apresentam similaridade com nenhuma seqüência na base de dados e 23 codificam proteínas ribossomais, segundo a identificação putativa pelo primeiro alinhamento.

Sete dos perfis de expressão dos genes para os quais a abundância das seqüências expressas mudou ao longo da esporulação foram confirmados por *Northern-blot* (Figura 11), indicando que efetivamente possuem a sua expressão regulada durante esta fase.



Continua na página 65.

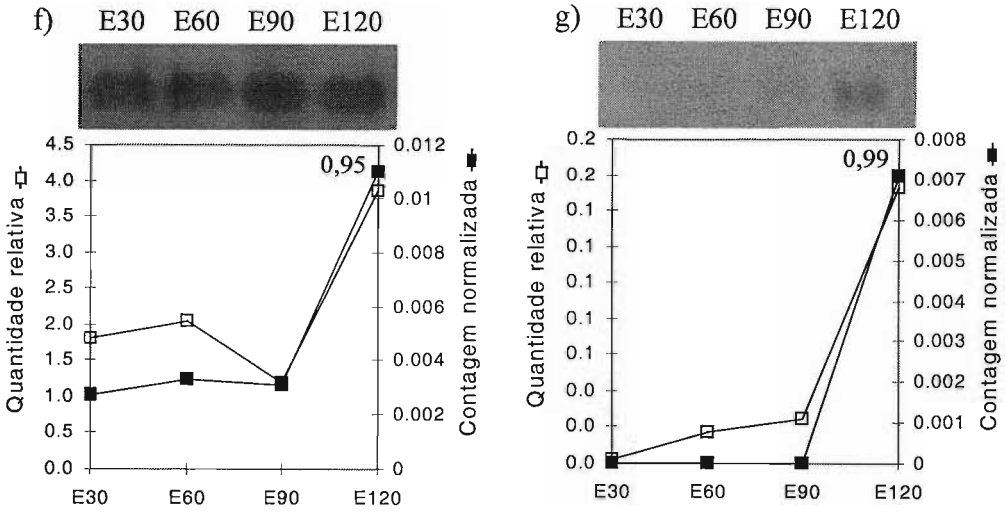


Figura 11. *Northern-blot* de genes cujos transcritos apresentaram expressão diferencial no *Northern* digital. A figura mostra os autorradiogramas de experimentos de *Northern-blot* usando RNA total isolado de células sincronizadas em diferentes tempos da fase de esporulação. Os gráficos mostram a comparação dos perfis obtidos por *Northern-blot* (□) com os obtidos por *Northern* digital (■). Os números colocados no canto superior direito dos gráficos correspondem ao coeficiente de correlação de Pearson. As proteínas putativas codificadas pelos transcritos são: a) Proteína ribossômica S9, subunidade 40 S, b) Histona H2A, c) EF 1 α, forma longa, d) Proteína desconhecida, e) Proteína desconhecida, f) Calmodulina, e g) Proteína desconhecida. As densitometrias são o resultado da razão entre a área da banda no *Northern-blot* e a soma das áreas das bandas dos RNAs ribossomais 28 S e 18 S corados com brometo de etídio e observados sob luz UV.

4.2) Caracterização das seqüências com possível papel na diferenciação celular.

Com o intuito de caracterizar seqüências potencialmente envolvidas com a esporulação ou o controle da esporulação fomos observar as seqüências anotadas na categoria ciclo celular do GO (Tabela 5) que está incluída dentro do processo crescimento celular e manutenção. Consideramos especificamente as seqüências envolvidas com a fase M do ciclo celular e com a citocinese de particular importância nesta fase do ciclo de vida de *B. emersonii.*

4.2.1. Centrinas de *B. emersonii*

Entre as seqüências identificadas foram incluídas duas centrinas pertencentes a subfamílias diferentes, cujo melhor alinhamento usando a ferramenta BLASTX contra a base de dado *SWISS/PROT and TREmbl* foi com a *caltractin* (ou caltractina) e contra a *Cell division control protein 31* (ou Cdc31) (Tabela 5). Ambas tem uma função importante durante a mitose em diferentes organismos, embora a primeira esteja também relacionada com a localização e o movimento flagelar. A primeira delas nunca tinha sido descrita em fungos. A seguir, fomos caracterizar as duas seqüências isoladas.

Tabela 5. Identidade putativa de 37 seqüências classificadas no processo ciclo celular do GO.

Identificação putativa pelo BLASTX	**Organismo**	**Código do *SWISS-PROT/TREmbl***	***Score***	***E-value***
Anaphase promoting complex subunit 11	*Mus musculus*	Q9CPX9	49	2e-13
Caltractin	*Scherffelia dúbia*	Q06827	227	7e-59
Cell division control protein 31	*Saccharomyces cerevisiae*	P06704	102	7e-22
Cell division control protein 4	*Cândida albicans*	P53699	159	2e-38
Cell division control protein 48 homolog A	*Arabidopsis thaliana*	P54609	241	3e-63
Chromatin assembly factor 1 subunit C	*Homo sapiens*	Q09028	297	1e-79
Chromosome segregation protein sudA	*Emericella nidulans*	Q00737	241	3e-63
CulB	*Dictyostelium discoideum*	Q9XZJ3	73	2e-12
Cullin 4	*Arabidopsis thaliana*	Q84LL5	134	6e-31
Cyclin pch1	*Schizosaccharomyces pombe*	Q74627	87	1e-16
DNA replication licensing factor mcm2	*Schizosaccharomyces pombe*	P40377	508	e-143
DNA replication licensing factor mcm6	*Schizosaccharomyces pombe*	P49731	142	1e-33
Extragenic suppressor of kinetochore protein 1	*Schizosaccharomyces pombe*	O74511	70	3e-11
G2/mitotic-specific cyclin cdc13	*Schizosaccharomyces pombe*	P10815	230	1e-59
Hsp90 co-chaperone Cdc37	*Saccharomyces cerevisiae*	P06101	84	1e-15
HYM1	*Saccharomyces cerevisiae*	P38285	59	4e-08
Hypothetical 62.7 kDa protein in CNS1-CDC28 intergenic region	*Saccharomyces cerevisiae*	P32464	105	1e-22
Hypothetical protein	*Neurospora crassa*	Q7VRY1	59	1e-08
Maintenance of ploidy protein MOB2	*Saccharomyces cerevisiae*	P43563	182	2e-45
Mitotic spindle assembly checkpoint protein MAD2B	*Homo sapiens*	Q9UI95	65	6e-10
Myosin regulatory light chain cdc4	*Schizosaccharomyces pombe*	QO9196	149	1e-35
Negative regulator of mitosis	*Emericella nidulans*	P24686	78	6e-14
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1	*Homo sapiens*	Q13526	176	1e-43
Probable cell division control protein CDC12	*Neurospora crassa*	Q9C271	201	4e-51
Protein hob3	*Schizosaccharomyces pombe*	Q9UUM7	221	6e-57
Protein kinase skp1	*Schizosaccharomyces pombe*	Q10452	65	1e-10
Psi protein	*Schizosaccharomyces pombe*	Q09912	127	1e-28
RE13747p	*Drosophila melanogaster*	Q8SZ87	236	5e-62
Septin	*Emericella nidulans*	Q9C1M3	105	3e-22
Septin	*Emericella nidulans*	Q9C1M1	239	1e-62
Septin	*Emericella nidulans*	Q9C1M3	259	2e-68
Septin B	*Emericella nidulans*	P78620	199	3e-50
Serine/threonine protein phosphatase PP1	*Emericella nidulans*	P20654	600	e-170
Serine/threonine-protein kinase CBK1	*Saccharomyces cerevisiae*	P53894	207	7e-53
Structural maintenance of chromosome 2	*Saccharomyces cerevisiae*	P38989	171	3e-42
Suppressor of G2 allele of SKP1 homolog	*Homo sapiens*	Q9Y2Z0	158	7e-38
Wos2 protein	*Schizosaccharomyces pombe*	Q11118	74	1e-12

As várias septinas e as duas *cdc4* indicadas constituem prováveis parálogos. Não foram incluídas as seqüências envolvidas com replicação do DNA.

4.2.1.1. Análise das seqüências dos cDNAs das centrinas de *B. emersonii.*

Em diferentes bibliotecas de cDNA de *B. emersonii* foram clonadas seqüências que codificam para duas isoformas da centrina: uma pertencente à família do tipo *Chlamydomonas reinhardtii* (Crcen, não descrita em fungos até este trabalho), que chamamos BeCen1, e outra pertencente à família do tipo *Saccharomyces cerevisiae* (ScCdc31, típica de fungos), que chamamos BeCen2. Quatro ESTs contendo o quadro de leitura completo da primeira isoforma (603 pb, 174 aas, 20 kDa) foram seqüenciadas nas bibliotecas de esporulação, e duas ESTs contendo a carboxila terminal da segunda isoforma (344 pb, 71 aa, 11 kDa) foram seqüenciadas na biblioteca NSV (aparentemente produtos de amplificação por PCR porque as seqüências isoladas tem o mesmo tamanho e são idênticas). Ambas foram identificadas e foram categorizadas no processo biológico ciclo celular, segundo a classificação do GO. Na identificação putativa da Tabela 5 ambas estão anotadas como *caltractin* e como *cell division control protein 31*, respectivamente.

O melhor alinhamento registrado com o *contig* pertencente à subfamília CrCen usando BLASTX contra a base de dados nr do NCBI foi com a centrina da alga dourada *Ochromonas danica* (Ochromonadaceae, Stramenopiles) com 77% de identidade e 87% de similaridade, enquanto o melhor alinhamento com a seqüência pertencente à família ScCdc31 foi a seqüência de *S. cerevisiae* com 68 % de identidade e 88% de similaridade.

A extremidade 5' do cDNA da BeCen2 foi amplificada usando como iniciador o oligonucleotídeo BeCen-left (vide item 3.16.), incorporando-se mais 234 bases (78 aa) de leitura às já obtidas. Como resultado desta amplificação foram conseguidos o primeiro e o segundo domínio *EF-hand* completos, porém não foi obtido o início da tradução da proteína. Com a seqüência amplificada, o melhor alinhamento foi obtido com a seqüência da centrina SpCdc31 de

S. pombe, também pertencente à família ScCdc31, com 59 % de identidade e 84% de similaridade (Figura 12a).

a)

```
     ctatacgcaatctcacccacc atg gtgtcctccaacaccacgttcaagaagccggcgtcg
BeCen1 ......................M  V  S  S  N  T  T  F  K  K  P  A  S
BeCen2 ............................................................
     ............................................................
   1---------+---------+---------+---------+---------+---------+60

     ggcggtgcgagcggcggggccaagaagccgcgcgcggagctgacgcccgagcagaagcag
BeCen1 G  G  A  S  G  G  A  K  K  P  R  A  E  L  T  P  E  Q  K  Q
BeCen2 ..............................S  S  G  N  N  A  E  Y  A  G
     ..............................taagcagtggtaacaacgcagagtacgcgggg
  61---------+---------+---------+---------+---------+---------+120

     gagatccgcgaggcgttcgacctgttcgacacggacgggtctgggtcgatcgacagcaag
BeCen1 E  I  R  E  A  F  D  L  F  D  T  D  G  S  G  S  I  D  S  K
BeCen2 K  Q  R  I  N  S  T  T  Y  H  V  I  R  V  P  R  L  D  Y  H
     aagcaacgcatcaactcaaccacttaccatgtcactcgcgttccccgtctcgactaccac
 121---------+---------+---------+---------+---------+---------+180

     gagctcaaggtggcgatgcgcgcgctcgggttcgagcccaagaaggaggagatcaagaag
BeCen1 E  L  K  V  A  M  R  A  L  G  F  E  P  K  K  E  E  I  K  K
BeCen2 E  V  K  V  A  M  R  A  L  G  I  E  A  K  K  A  E  V  L  K
     gaggtcaaggtggcgatgcgcgcgctcgggatcgaggccaagaaggccgaggtgctcaag
 181---------+---------+---------+---------+---------+---------+240

     atgatcaacgagattgaccgcgacgggtccgggtccattgatttcaacgagtttctcgag
BeCen1 M  I  N  E  I  D  R  D  G  S  G  S  I  D  F  N  E  F  L  E
BeCen2 W  L  K  D  Y  D  K  S  G  R  Q  V  L  E  F  D  D  F  M  R
     tggctcaaggactacgacaagtcgggccgccaggtgctcgagtttgacgactttatgcgc
 241---------+---------+---------+---------+---------+---------+300

     ctcatggccgggaaaatggccgagcgcgactcgcgcgaggagatcctcaaggctttcaag
BeCen1 L  M  A  G  K  M  A  E  R  D  S  R  E  E  I  L  K  A  F  K
BeCen2 I  V  A  E  K  I  L  A  R  D  P  I  D  E  L  R  K  A  F  T
     atcgtggccgagaagatcctcgcgcgcgacccgatcgacgagctgcgcaaggccttcacg
 301---------+---------+---------+---------+---------+---------+360
                                   ↑
```

```
     ctcttcgacgacgacagcacgggcaagatcaccttcaagaacctcaagcgtgtcgcgcgc
BeCen1 L  F  D  D  D  S  T  G  K  I  T  F  K  N  L  K  R  V  A  R
BeCen2 L  F  D  T  D  K  K  G  K  I  S  L  R  D  L  R  R  V  A  K
     ctgtttgacacggacaagaagggcaagatctcgctgcgcgacctgcggcgcgtggccaag
 361---------+---------+---------+---------+---------+---------+420

     gagctcggcgagaacctcaccgacgaggagctccaggagatgatcgacgaggccgaccgc
BeCen1 E  L  G  E  N  L  T  D  E  E  L  Q  E  M  I  D  E  A  D  R
BeCen2 E  V  G  E  T  L  D  D  D  E  L  A  A  M  I  E  E  F  D  V
     gaggtcggcgagacgctcgacgacgacgagctcgccgccatgatcgaggagtttgacgtc
 421---------+---------+---------+---------+---------+---------+480

     gacggcgacggcgagatcaacgaggacgacttcctgcgcatcatgaagaagaccaacctg
BeCen1 D  G  D  G  E  I  N  E  D  D  F  L  R  I  M  K  K  T  N  L
BeCen2 N  G  D  G  E  I  D  E  Q  E  F  L  S  I  M  T  D  D  Y  -
     aacggcgacggggagattgacgagcaagagtttctgagcatcatgacggacgactactga
 481---------+---------+---------+---------+---------+---------+540

     tactgaactatccatacacacacgatcacattg
BeCen1 Y  - .........................
BeCen2.....................................
     cgacgcaaacaccaatgtatatctgctttgcc.
 541---------+---------+---------+---
```

b)

Aminoácido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Consenso	D		D, N		D, N	G	X		D, E, N, S, T			E, D
BeCen1												
alça I	D		D		S	G	S		D			E
alça II	D		D		S	G	S		D			E
alça III	D		D		T	G	K		T			N
alça IV	D		D		D	G	E		N			D
BeCen2												
alça I	D		D		K	G	K		S			D
alça II	D		N		D	G	E		E			E

Figura 12. a) Alinhamento entre as duas seqüências codificadoras das centrinas de *B. emersonii* (BeCen1 e BeCen2) feito no Multialin. b) Comparação das alças ligantes de cálcio com a seqüência consenso segundo Marsden *et al.*, 1990 e Nakayama *et al.*, 1992. Os domínios EF-hand estão sublinhados, em cinza claro estão as alças ligantes de cálcio, em cinza escuro os aminoácidos que não seguem o consenso. Em negrito estão indicados o sítio de hibridização do oligonucleotídeo BeCen2-left usado para a amplificação da extremidade 5', o códon de início da tradução em BeCen1 (atg) e os códons de término da tradução em ambas as centrinas (tga). Também em negrito estão indicadas duas tirosinas conservadas na subfamília CrCen, no primeiro e no segundo domínio *EF-hand*. A seta indica o amino ácido conservado nas centrinas da subfamília CrCen (P) e nas centrinas da subfamília ScCdc31 (S ou T, sendo S na BeCen1).

Concordando com as diferenças de seqüência encontradas entre as duas subfamílias, o alinhamento entre as duas seqüências deduzidas de aminoácidos de *B. emersonii* registrou 45 % de identidade e 65 % de similaridade, menor do que o descrito para membros da mesma subfamília. O alinhamento também mostrou a conservação de alguns dos resíduos característicos da família ou de alguma das duas subfamílias em particular, como uma tirosina no primeiro e segundo domínio *EF-hand*, uma prolina (na subfamília CrCen) e uma serina (na subfamília ScCdc31) na região central entre o segundo e o terceiro domínio *EF-hand*, e dois resíduos na extremidade 3' (LY) característicos da subfamília CrCen. Também é possível observar alguns resíduos importantes para a função ligante de cálcio nos domínios *EF-hand*. O último domínio *EF-hand* é claramente divergente nas duas subfamílias (observe-se a substituição de glutamina e ácido glutâmico no começo do domínio e a presença de resíduos básicos na BeCen1 e de resíduos ácidos na BeCen2 no final do domínio) e, com base na seqüência consenso (Figura 12 b) apenas o último deles teria a capacidade de ligar cálcio em ambas centrinas.

Como modo de confirmar a que subfamílias as centrinas de *B. emersonii* pertecem, ambas as seqüências foram agrupadas pelo método de agrupamento de vizinhos (*Neighbor-joining*) junto com outros membros bem caracterizados das duas subfamílias de centrinas. Como resultado, as duas proteínas de *B. emersonii* foram resolvidas em ramos diferentes correspondentes a cada subfamília. A amostragem produzida pelo teste *bootstrap* gerou o ramo da subfamília CrCen em 64 % das vezes amostradas, enquanto o ramo da subfamília ScCdc31 ocorreu 77% das vezes amostradas. A árvore gerada está de acordo com o sugerido pelos alinhamentos locais obtidos pelo BLASTX (Figura 13).

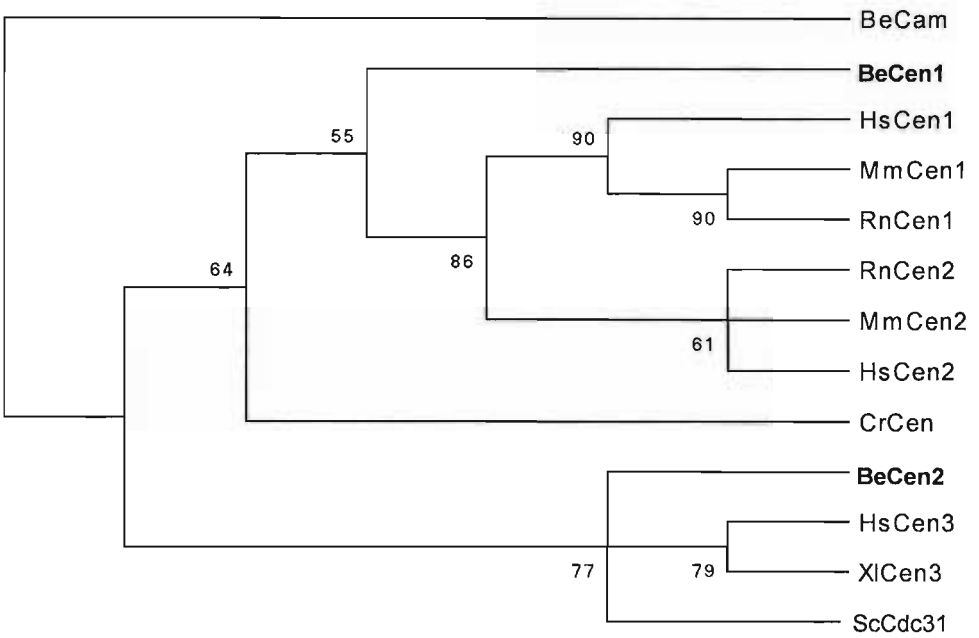


Figura 13. Árvore produzida com seqüências de centrinas pelo método de agrupamento de vizinhos usando o programa MEGA. Be: *B. emersonii*, Hs: *Homo sapiens*, Mm: *Mus musculus*, Rn: *Rattus norvegicus*, Cr: *C. reinhardtii*, XL: *Xenopus laevis*, Sc: *S. cerevisiae*, Os valores do teste *bootstrap* maiores o que 50 estão indicados em cada divergência. A seqüência da calmodulina de *B. emersonii* (BeCam) foi utilizada como grupo externo.

4.2.1.2. Expressão dos genes Becen1 e Becen2.

4.2.1.2.1. Becen1

O número de genes Becen1 de *B. emersonii* foi avaliado por *Southern-blot* (Figura 14) observando-se a presença provável de um único gene. O padrão de expressão observado no *Northern-blot* indicou que há variação nos níveis de expressão do mRNA (Figura 15) com um pico aos 90 minutos após a indução da esporulação.

Para obter soro imune contra a proteína BeCen1, o cDNA correspondente foi clonado no vetor de expressão p-MAL c-2, o qual foi usado para transformar bactérias competentes de *E. coli* DH5α. Como resultado foram obtidos clones expressando a proteína de fusão entre a proteína de interesse (centrina de PM = 20 kDa) e a proteína de ligação a maltose (MBP de PM = 42,698

kDa). Um desses clones foi selecionado para expressar e purificar a proteína de fusão, que foi então usada na inoculação de coelhos para a obtenção do soro específico. De posse do anti-soro anti-BeCen1, analisou-se o acúmulo da proteína durante a esporulação, que acompanhou a expressão do mRNA, conforme observado por *Western-blot* (Figura 16) com um deslocamento de 60 minutos no pico de expressão (aos 150 minutos). O soro heterólogo contra a proteína homóloga de *Homo sapiens*, HsCen1, reconheceu uma banda do mesmo peso molecular e padrão de expressão (Figura 16 a). Anti-soro anti-β-tubulina foi utilizado como controle, já que a expressão da β-tubulina não variou significativamente durante a esporulação.

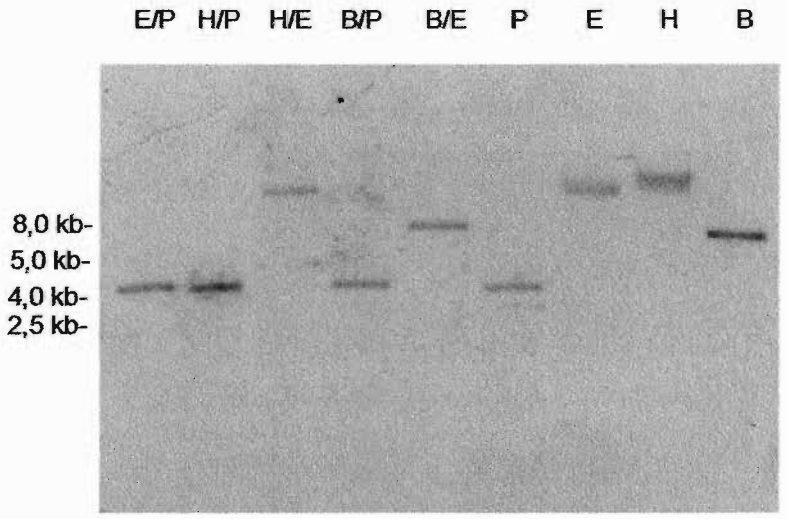


Figura 14. *Southern-blot* genômico de *B. emersonii* usando como sonda o cDNA Becen1. As enzimas de restrição usadas foram: E = *Eco*RI, P = *Pst*I, H = *Hind*III e B = *Bam*HI. Utilizou-se *GeneRuler* (Fermentas) como marcador de tamanho molecular.

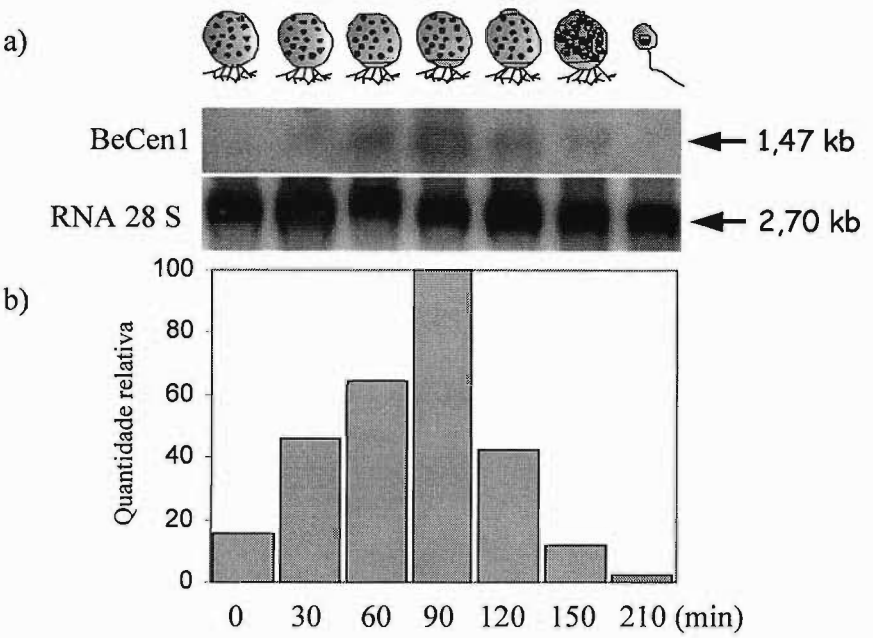


Figura 15. a) Análise dos níveis do mRNA da BeCen1 durante a esporulação por *Northern-blot*. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (210 minutos). O RNA ribosomal 28S foi usado como controle. b) Porcentagem relativa ao RNA 28S do mRNA da BeCen1 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em a.

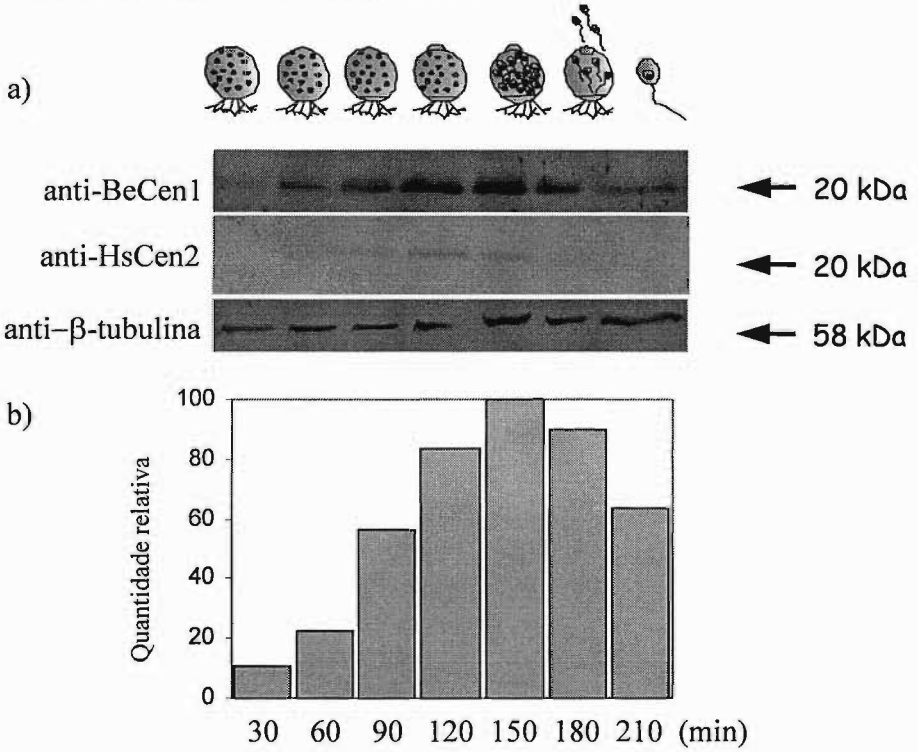


Figura 16. a) Análise dos níveis da proteína BeCen1 por Western-blot com soro homólogo (anti-BeCen1) e soro heterólogo (anti-HsCen2) durante a esporulação. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (210 minutos). O soro anti-β-tubulina foi usado como controle. b) Porcentagem relativa à b-tubulina da BeCen1 estimada através da densitometria das bandas apresentadas em a.

A centrina recombinante de *B. emersonii* produzida em *E. coli* foi também testada quanto à sua capacidade de ligar íons cálcio. Para isso uma alíquota da proteína de fusão foi eluída da resina amilose-agarose na presença de fator Xa, que separou a porção da centrina da porção da MBP. A ligação a cálcio foi investigada pela incubação da proteína na presença e ausência de Ca^{+2} ou EGTA seguindo-se SDS-PAGE e verificou-se um pequeno mas reprodutível aumento na velocidade de migração da proteína na presença de cálcio (Figura 17)

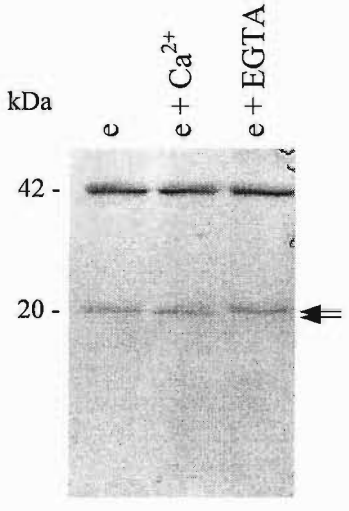
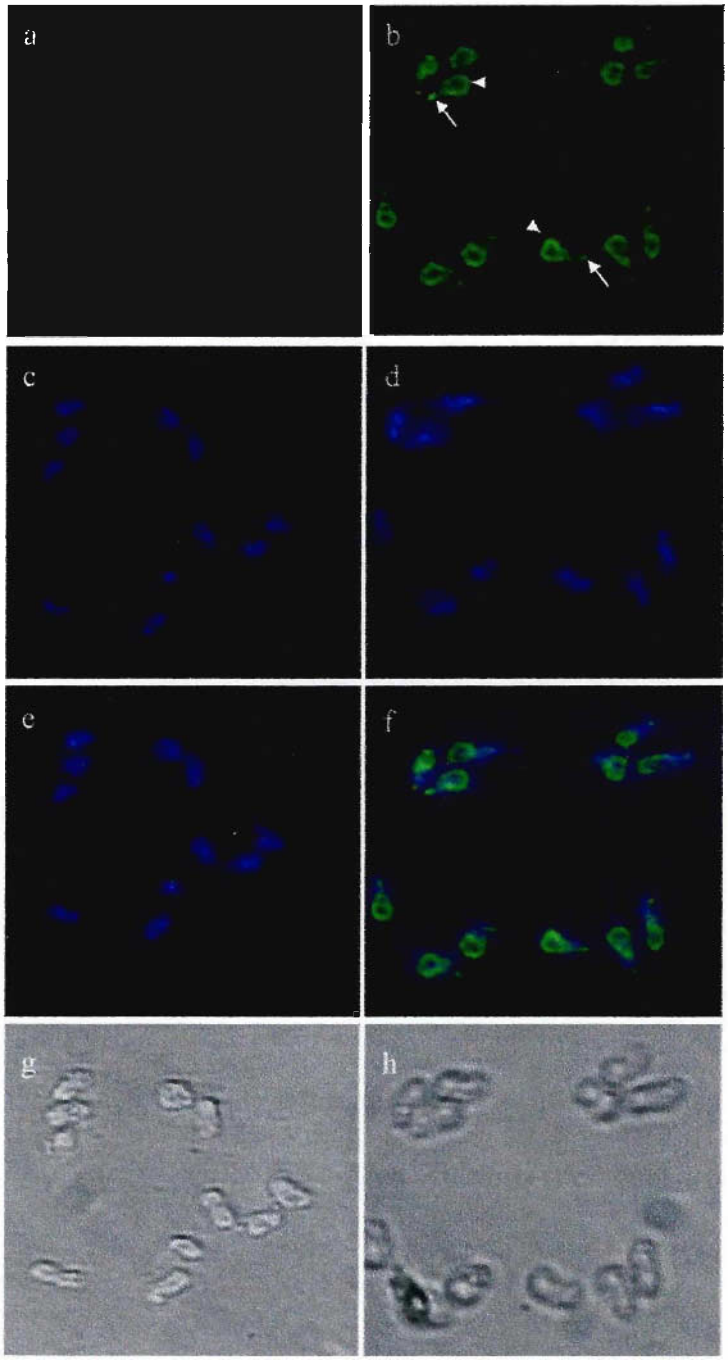
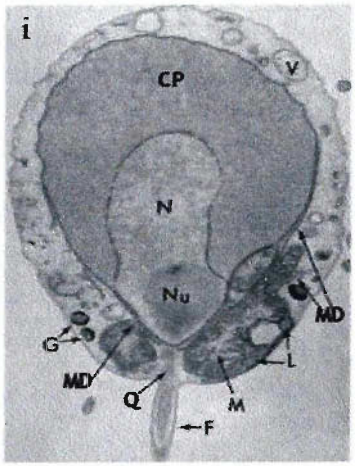


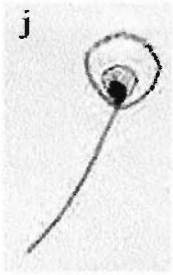
Figura 17. SDS-PAGE (15 % de poliacrilamida) da centrina recombinante na presença e na ausência de cálcio. e = eluato da resina; e + Ca^{2+} = eluato mais 2mM de $CaCl_2$; e + EGTA = eluato mais 5mM de EGTA. O eluato foi previamente clivado com fator Xa e concentrado por ultrafiltração. As setas indicam a mudança na mobilização da banda correspondente com a centrina. A figura mostra o gel corado com azul de Coomasie.

Foram realizadas também experimentos de imunolocalização por imunofluorescência indireta (IFI) utilizando anti-soro anti-BeCen1 e zoósporos fixados de *B. emersonii* (Figura 18). A fluorescência mostrou uma reação específica na região citoplasmática em torno do capacete nuclear e na região do corpo basal (chamado cinetoplasto) no zoósporo.

Figura 18. Imunolocalização da BeCen1 em zoósporos de *B. emersonii*. Os zoósporos foram fixados e incubados (vide MATERIAS E MÉTODOS) na presença (b, d, f, h) e na ausência (a, c, e, g) do anti-soro anti-BeCen1 seguindo-se incubação com o anticorpo secundário conjugado a *alexagreen*. Os mesmos campos foram observados por microscopia de fluorescência (a - f) para a observação da reação pré-imune (a) e imune (b) e a observação dos núcleos (c, d), ou por contraste de fase (g, h), utilizando-se microscopia óptica. Os núcleos foram observados por coração com DAPI colocado junto com o segundo anticorpo. As imagens e) e f) são o produto da superposição das imagens para a observação da reação imune e da coração com DAPI. As setas indicam o quinetoplasto (ou corpo basal) e as cabeças de setas indicam o citoplasma em torno do capacete nuclear. i-k) Diagramas do zoósporo de *B. emersonii*.i) Microgafía eletrônica de transmissão do zoósporo de *B. emersonii* mostrando o núcleo (N), nucléolo (Nu), capacete nuclear (CP), mitocondrion (M), partículas gama (G), vacuolo (V), lipídeos (L), regiões de membrana dupla (MD), o cinetoplasto (C) e o flagelo (F) (modificado de Reichle & Fuller, 1967, obtido de J. Deacon, http://helios.bto.ed.ac.uk/ bto/microbes/chytrid.htm); j, k) esquemas do zoósporo mostrando a forma natatória (j) e a forma amebóide (k) que o zoósporo dos quitrídios pode adotar (modificado de J. Deacon, http://helios.bto.ed.ac.uk/bto/microbes/chytrid.htm). O aumento é de 400X e o tamanho médio dos zóosporos é de 8 μm).


a
b
c
d
e
f
g
h


i
CP
V
N
Nu
MD
G
L
MD
Q
M
F


j

k

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

4.2.1.2. BeCen2

O número de genes Becen2 também foi avaliado por *Southern-blot* genômico (Figura 19) observando-se a presença provável de uma única cópia do gene. Os resultados obtidos por *Northern-blot* também indicaram uma variação nos níveis de expressão de Becen2 ao longo da esporulação, mas com um padrão diferente ao observado para Becen1 (Figura 20) que mostrou um máximo de acúmulo aos 90 minutos, diferentemente de Becen2 que mostrou um pico aos 120 minutos de esporulação.

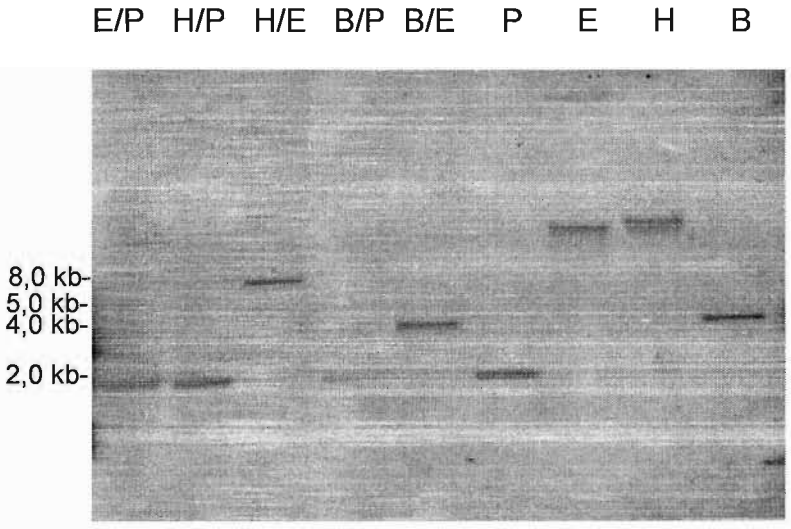


Figura 19. *Southern-blot* genômico de *B. emersonii* usando como sonda o fragmento do cDNA de Becen2. As enzimas de restrição usadas foram: E = *Eco* RI, P = *Pst* I, H = *Hind* III e B = *Bam* HI. Utilizou-se *GeneRuler* (Fermentas) como marcador de tamanho molecular.

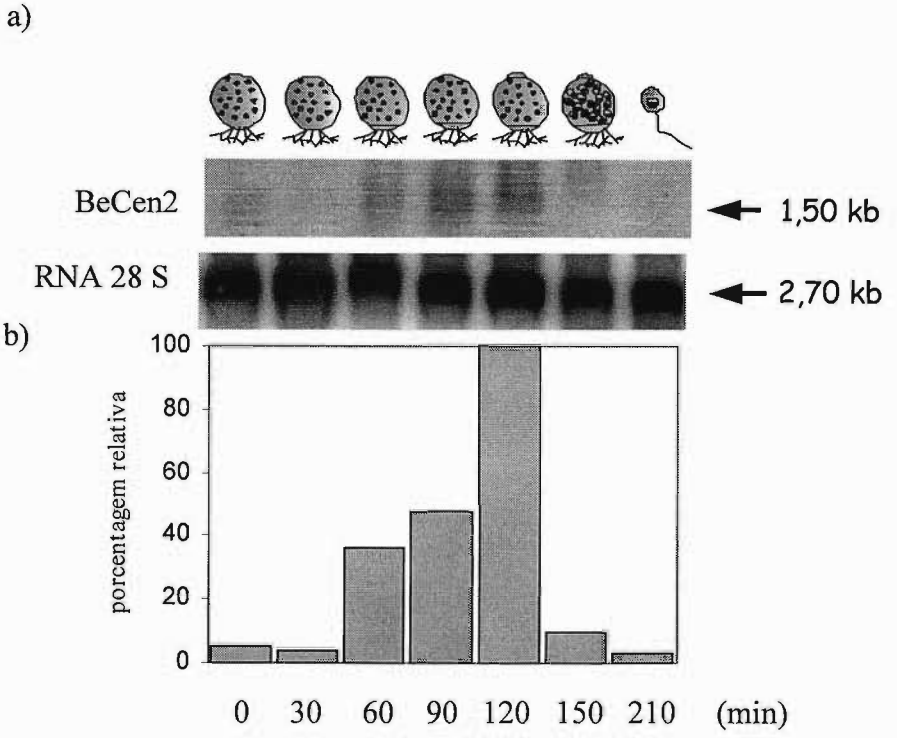


Figura 20. a) Análise dos níveis do mRNA da BeCen1 por *Northern-blot*. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (210 minutos). O RNA ribosomal 28S foi usado como controle. b) Porcentagem relativa ao RNA 28S do mRNA da BeCen2 estimado através da densitometria do autorradiograma mostrado em a.

Para avaliar os níveis da proteína BeCen2 foram realizados experimentos de *Western-blot* utilizando dois soros heterólogos contra a proteína homóloga de *S.cerevisiae*, ScCdc31 (M. Winey e M. Rose), e um soro heterólogo contra a proteína de Homo sapiens, HsCen3 (M. Bornens). Para a avaliar os soros, o fragmento isolado durante a amplificação da extremidade 5' do mRNA da BeCen2 (de 11 kDa de massa aparente) foi clonado conservando o seu quadro de leitura no vetor de expressão p-MAL c-2, usando o oligonucletídeo 4-4-BeCen2-MBP, entre os sítios *Eco*RI/*Hind*III do plasmídeo. Os três soros reconheceram a proteína de fusão gerada (Figura 21 a) de massa molecular esperada (53 kDa), mas um dos soros anti-ScCdc31 revelou múltiplas bandas além da proteína recombinante (Figura 21 a) e múltiplas bandas nos *Western-blots* feitos contra os extratos de *B. emersonii* (não mostrado). Dos outros dois soros apenas o soro anti-HsCen3 reconheceu de forma reprodutível uma banda de massa molecular de

aproximadamente 34 kDa. O tamanho observado é maior do que o esperado considerando que as massas moleculares das proteínas homólogas informadas na literatura encontram-se na faixa de 20-23 kDa e a própria BeCen1 possui também uma massa molecular aparente de aproximadamente 20 kDa (Figura 16a).

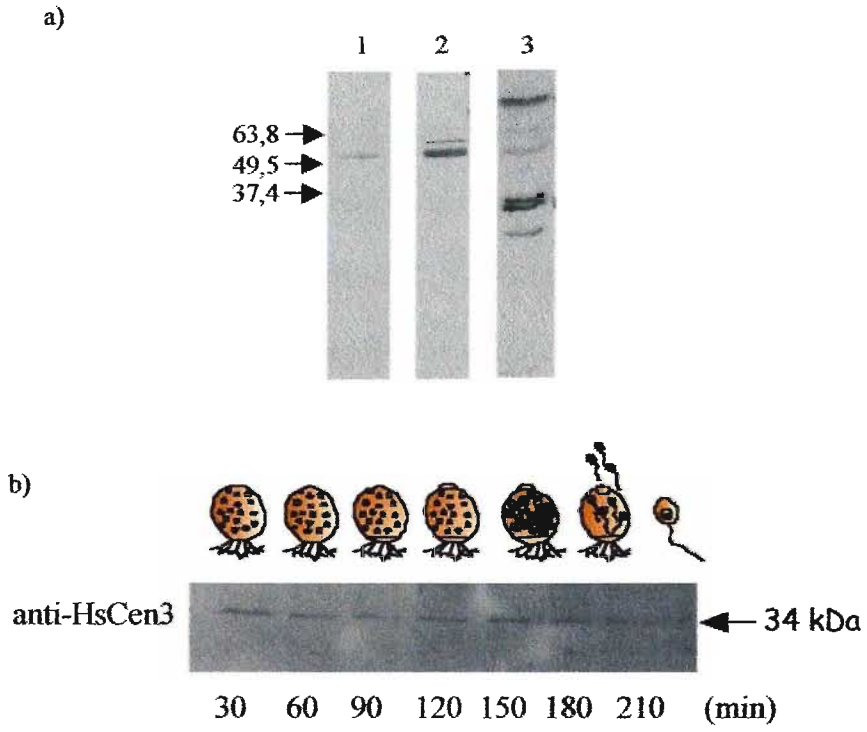


Figura 21. a) Análise da proteína recombinante BeCen2 (fragmento de 11 kDa) em fusão com a proteína ligante de maltose por *Western-blot* com soros heterólogos (1, anti-HsCen3; 2, anti-ScCdc31 (M. Winey); 3, anti-ScCdc31 (M. Rose). b)Análise dos níveis da proteína BeCen2 por *Western-blot* com soro heterólogo (anti-HsCen3) durante a esporulação. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (210 minutos). O soro anti-β-tubulina foi usado como controle.

Experimentos de imunolocalização da BeCen2 também foram realizados usando os soros heterólogos porém sem resultados confiáveis (dados não mostrados).

4.2.2. Quinases dependentes de ciclina de *B. emersonii.*

Dentro das seqüências anotadas na categoria ciclo celular do GO não foi registrada nenhuma quinase dependente de ciclina (Tabela 5). Visto que essas quinases são enzimas chaves na coordenação e no controle dos eventos que ocorrem durante o ciclo celular, a expressão de seqüências codificadoras de Cdks são um interessante objeto de estudo. Entretanto, entre as seqüências identificadas pelo GO dentro do processo fosforilação de proteínas foram incluídas seqüências codificadoras para duas Cdks putativas (BeCdk1 e BeCdk2). Os melhores alinhamentos obtidos com estas seqüências utilizando a base de dados *Swiss-Prot and TrEMBL* foram com a seqüência codificadora de uma Cdk da planta herbácea *Brassica napus* (Brassicaceae. Magnoliophyta), e com a seqüência codificadora da Cdk2 do ouriço de mar *Sphaerechinus gramularis* (Toxopneustidae, Echinodermata).

As duas seqüências obtidas como melhores alinhamentos na base de dados *Swiss-Prot and TrEMBL* estão apenas anotadas como atuando na fosforilação de proteínas e não estão descritas como envolvidas nos processos relacionadas com o ciclo celular. Isto aparentemente se deve à falta de estudos bioquímicos conclusivos sobre o papel destas Cdks nesses organismos. Entretanto, entre os cinco primeiros alinhamentos obtidos com a BeCdk1, quatro foram registrados com plantas, sendo que o terceiro alinhamento foi com a Cdc2A de *A. thaliana* (*Score* = 335, *Evalue* = 4E-91), o homólogo de Cdc2/Cdc28 de leveduras ou Cdk1, envolvida em citocinese. Por outro lado, pelo menos os cinco primeiros alinhamentos produzidos com a BeCdk2 foram com animais, sendo que o quarto alinhamento foi com a Cdk2 de *H. sapiens* (*Score* = 288, *Evalue* = 2E-77) claramente envolvida com vários pontos de controle e de regulação do ciclo nuclear, como regulação da replicação do DNA, regulação positiva da proliferação celular, passagem da fase G_1 para S e transição da fase G_2 para M.

4.2.2.1. Análise das seqüências de cDNA das quinases dependentes de ciclina de *B. emersonii.*

Cinco quadros de leitura abertos codificadores para quinases dependentes de ciclina putativas foram seqüenciadas em diferentes bibliotecas de cDNA de vários tempos da esporulação. As seqüências foram agrupadas em dois *contigs* pelo programa CAP3. O *contig* cujo melhor alinhamento foi com a seqüência de *B. napus* reúne três ESTs cobrindo a ORF completa de uma Cdk (999 pb, 295 aa, aproximadamente 34 kDa) que foi chamada de BeCdk1. O outro *contig* produziu o melhor alinhamento com a seqüência de *S. granularis* e reúne dois ESTs cobrindo grande parte de uma Cdk putativa exceto a extremidade carboxi-terminal (765 pb, 251 aa) que foi denominada BeCdk2.

Curiosamente, considerando os alinhamentos obtidos no *Swiss-Prot and TrEMBL*, não haveria seqüências de fungos caracterizadas como codificadoras de Cdks que alinhassem com as seqüências isoladas de *Blastocladiella*. Entretanto, os alinhamentos registrados na base de dados nr do NCBI indicaram resultados diferentes para BeCdk1. O *contig* correspondente a BeCdk1 foi similar a uma proteína hipotética da levedura *Yarrowia lipolytica* com 66% de identidade e 82% de similaridade. Os alinhamentos que seguiram incluíram outros dois fungos, Cdk 3 de humano, e depois as plantas. O outro *contig* manteve o mesmo perfil nos alinhamentos, sendo o melhor também com *S. granularis* com 65% de identidade e 80% de similaridade, seguido de seqüências de outros animais.

As duas seqüências de Cdks de *B. emersonii* possuem resíduos conservados envolvidos na fosforilação regulatória e regiões características das Cdks, mas ambas apresentam variações algumas das quais provavelmente sejam características de *B. emersonii* (Figura 22). Ambas possuem os resíduos TY que causam inibição por fosforilação na região de ligação do ATP (T19 e Y20 da BeCdk1, e T23 e Y24 da BeCdk2) e o resíduo T na alça T cuja fosforilação produz a

ativação da Cdk (T165 da BeCdk1 e T169 da BeCdk2). O motivo GDSEID também está conservado entre os homólogos de Cdc2/Cdc28 e as Cdks de *B. emersonii*, ao contrário de outros tipo de Cdks como Pho85, uma Cdk não essencial mas com um possível papel auxiliar no ciclo celular de *S. cerevisiae* (Takeo *et al.*, 2004). O motivo PSTAIRE, conservado em homólogos de Cdk1 tanto de fungos como de animais e de plantas, possui alterações em ambas as Cdks de *B. emersonii*. Este tipo de variantes foi descrito para algumas Cdks de plantas, que também estariam envolvidas com o controle do ciclo celular e pela primeira vez em fungos recentemente, no homólogo de Cdc2 de *C. neoformans* (Takeo *et al.*, 2004). Entretanto, em nenhum destes organismos observaram-se as substituições encontradas em *B. emersonii*.

Quando foram comparadas várias seqüências de amino ácidos de Cdks conhecidas, tanto BeCdk1 como BeCdk2 agruparam com as Cdks de plantas "não-PSTAIRE" (Figura 23), indicando que poderiam ser Cdks diferentes da Cdc2/Cdc28, descrita em fungos como única quinase responsável pelo controle do ciclo celular.

```
 gcaccaccgaccatgacg............gccgactcgattgacgcctacgcgcgcctc
 .............M  T  -  -  -  -  A  D  S  I  D  A  Y  A  R  L
 .............M  T  D  R  P  K  M  N  G  V  E  D  Y  Q  Y  I
 acccatgcatgcatgaccgaccgcccaaagatgaatggcgtcgaggactacccagtacat
1---------+---------+---------+---------+---------+---------+60

 aacaagctggcgagggcacctacggcgtcgtgtaccgcgcccgcgagaaggccacgggc
  N  K  L  G  E  G  T  Y  G  V  V  Y  R  A  R  E  K  A  T  G
  E  K  V  G  E  G  T  Y  G  V  V  Y  K  A  R  D  A  A  S  G
 tgaaaaggttggcgagggcacctacggcgtcgtgtacaaggcgcgcgacgccgcgtccgg
61---------+---------+---------+---------+---------+---------+120

 cggatcgttgccatcaagaagattaagctcgagcaggaggagaacggcatgccgtccacg
  R  I  V  A  I  K  K  I  K  L  E  Q  E  E  N  G  M  P  S  T
  R  I  V  A  L  K  K  I  R  F  E  N  E  D  D  G  V  P  A  T
 ccgcatcgtcgccctcaagaagatccgcttcgagaacgaggacgacggcgtccccgccac
21---------+---------+---------+---------+---------+---------+180
```

```
    tcgctgcgcgagatcaccgtcctcaaggagctgcgccaccccaacattgttcgcctgcac
     S  L  R  E  I  T  V  L  K  E  L  R  H  P  N  I  V  R  L  H
     A  L  R  E  V  A  L  L  L  D  L  H  H  P  N  I  V  K  L  E
    ggcgctgcgcgaggtcgccctgctgctagacctgcaccaccccaacatcgtcaaactgga
181---------+---------+---------+---------+---------+---------+240

    agcatcctgatgcacgacaccaccaacctgcagctcgtcttcgagttcctcgactacgac
     S  I  L  M  H  D  T  T  N  L  Q  L  V  F  E  F  L  D  Y  D
     Q  V  T  -  Y  L  T  K  Q  L  Y  L  V  F  E  F  L  D  Q  D
    gaggtgacc...tacctcaccaagcagctgtacctggtcttcgagttcctcgaccaggac
241---------+---------+---------+---------+---------+---------+300

    ctcaagaagcacatggagaacaccaaggagggc...atgtccattgacgtcatcaagagc
     L  K  K  H  M  E  N  T  K  E  G  -  M  S  I  D  V  I  K  S
     L  K  A  Y  M  D  A  R  K  S  A  P  L  P  E  D  L  T  R  S
    ctcaaggcgtacatggacgcgcgcaagagcgcgccgctgcccgaggacctgacgcgcagc
301---------+---------+---------+---------+---------+---------+360

    tacctgtaccagctactcagcggaatccggttctgccacgggcggcgcatcatccaccgt
     Y  L  Y  Q  L  L  S  G  I  R  F  C  H  G  R  R  I  I  H  R
     F  T  C  Q  L  L  R  A  L  E  F  C  H  T  H  R  V  L  H  R
    ttcacgtgccagctgctgcgcgcgctcgagttctgccacacgcaccgcgtgctgcaccgc
361---------+---------+---------+---------+---------+---------+420

    gacctgaagccgcagaacctgctcatcgaccagcgcgggcggctcaagatcgccgatttc
     D  L  K  P  Q  N  L  L  I  D  Q  R  G  R  L  K  I  A  D  F
     D  L  K  P  Q  N  I  L  I  D  A  H  N  N  L  K  L  A  D  F
    gacctcaagccgcagaacatcctcatcgacgcccacaacaacctcaagctcgccgacttt
421---------+---------+---------+---------+---------+---------+480

    gggctcgcgcggtgctttggcgtgcccctgcgcaactacacgcacgaggtggtgacgctg
     G  L  A  R  C  F  G  V  P  L  R  N  Y  T  H  E  V  V  T  L
     G  L  A  R  A  F  N  L  P  M  R  V  Y  T  H  E  V  V  T  L
    gggctagcgcgcgccttcaacctgccgatgcgcgtctacacgcacgaggtcgtgaccctg
481---------+---------+---------+---------+---------+---------+540

    tggtaccgcgcgcccgaggtgctcctcggcaccaagacgtacggcgtcgctctcgacatg
     W  Y  R  A  P  E  V  L  L  G  T  K  T  Y  G  V  A  L  D  M
     W  Y  R  P  P  E  I  L  L  G  S  K  N  Y  S  F  G  V  D  I
    tggtaccgcccgcccgagattttgctgggatcgaaaaactactcgttcggcgtcgacatc
541---------+---------+---------+---------+---------+---------+600

    tggagcatcgggtgcatctacggcgaaatggtcctgcacgcgcccatgttccccggggac
     W  S  I  G  C  I  Y  G  E  M  V  L  H  A  P  M  F  P  G  D
     W  S  A  G  C  I  F  L  E  M  M  V  G  K  A  V  F  P  G  D
    tggagcgccgggtgcatcttcctcgagatgatggtcggcaaggccgtgttccccggcgac
```

```
601---------+---------+---------+---------+---------+---------+660

   tcggagatcgaccagctctttcaaggtgttccaggtcctcggcaccccgaccgaggatac
    S  E  I  D  Q  L  F  Q  G  V  P  G  P  R  H  P  D  R  G  Y
    S  E  I  D  Q  L  F  K  I  F  Q  I  R  G  T  P  D  R  -  H
   tcggagatcgaccagctgttcaagatcttccagatccgcggaacgcccgaccga...cac
661---------+---------+---------+---------+---------+---------+720

   ctggcccggggtcagctccctgcccgattacaagccccacttcccgagctggcaccgggt
    L  A  R  G  Q  L  P  A  R  L  Q  A  P  L  P  E  L  A  P  G
    V  W  R  N  -  -  -  -  -  -  I  E  D  L  P  D  F  A  V  E
   Gtctggcgtaac.................atcgaggacctccccgactttgccgtcgag
721---------+---------+---------+---------+---------+---------+780

   ggacctcatgacccacatgcgggaccgtttcgacgattacggggtggagctgtttcacca
    G  P  H  D  P  H  A  G  P  F  R  R  L  R  G  G  A  V  S  P
    F  P  K  W  R  P  L  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -
   Ttccccaagtggcggccgctc.......................................
781---------+---------+---------+---------+---------+---------+840

   actgctcgcctatttccccggcaaccgcatttcggccaagaccgcgctcgcccacccgtt
    T  A  R  L  F  P  R  Q  P  H  F  G  Q  D  R  A  R  P  P  V
    -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -  -
   ............................................................
841---------+---------+---------+---------+---------+---------+900

   cctggccgacattgacccgtccctgtacacggacgacgactgaactgcctcgtggtcgct
    P  G  R  H  - ..............................................
    -  -  -  -  - ..............................................
901---------+---------+---------+---------+---------+---------+960

   gatcccgctttcatcccactgtaccacacaaaacacatgcgcatttttcccttc
   .......................................................
961---------+---------+---------+---------+---------+----
```

Figura 22. a) Alinhamento entre as duas seqüências codificadoras das Cdks de *B. emersonii* (BeCdk1 e BeCdk2) feito com o ClustalW. Nos retângulos estão contidos os motivos conservados: em seqüência eles são a região de ligação ao ATP, o motivo PSTAIRE (em negrito), o domínio catalítico e a região da alça T. Os resíduos conservados envolvidos na fosforilação regulatória estão sublinhados. Os códons de início da tadução em ambas Cdks BeCdk1 (atg), o códon de término da tradução em BeCdk1 (tga) e o motivo conservado GDSEID estão em negrito.

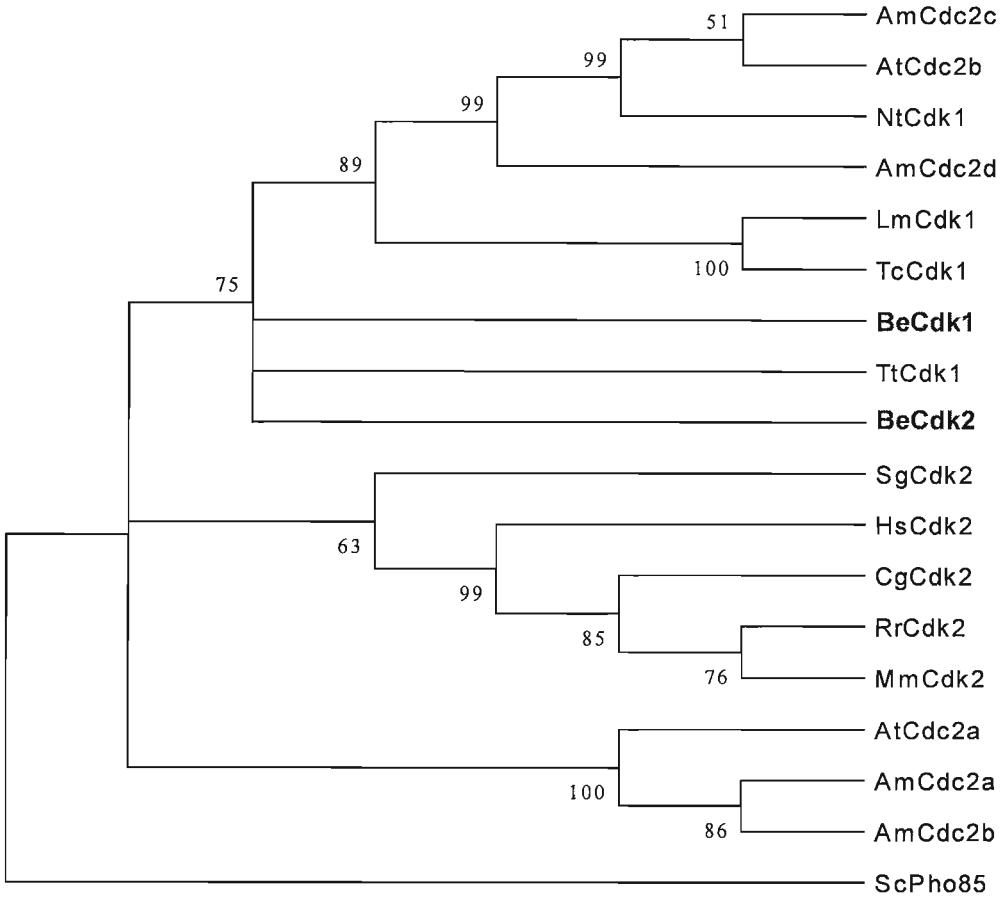


Figura 23. Árvore feita com seqüências de Cdks pelo método de agrupamento de vizinhos usando o programa MEGA. As seqüências de amino ácidos usadas no alinhamentos foram processados na carboxila terminal que não está presente no cDNA da BeCdk2. Os valores do teste *bootstrap* maiores do que 50 estão indicados em cada divergência. ScPho85 foi usado como grupo externo.Be: *B. emersonii*; Tc: *Trypanosoma cruzi*; Sg: *Sphaerechinus granularis*; Tt: *Tetrahymena termophila* Hs: *H. sapiens*; Mm: *Mus musculus*; Rn: *Rattus novergicus*; Xl: *Xenopus leavis*; Cg: *Cricetulus griseus*; Am: *Anthyrrinus majus*; At: *A. thaliana*; Lm: *Leishmania major*; Sc: *S. cerevisiae*.

4.2.2.2. Expressão dos genes BeCdk1 e BeCdk2.

4.2.2.2.1. BeCdk1

O número de genes codificadores da BeCdk1 de *B. emersonii* foi avaliado por *Southern-blot* observando-se a presença provável de um único gene (Figura 24).

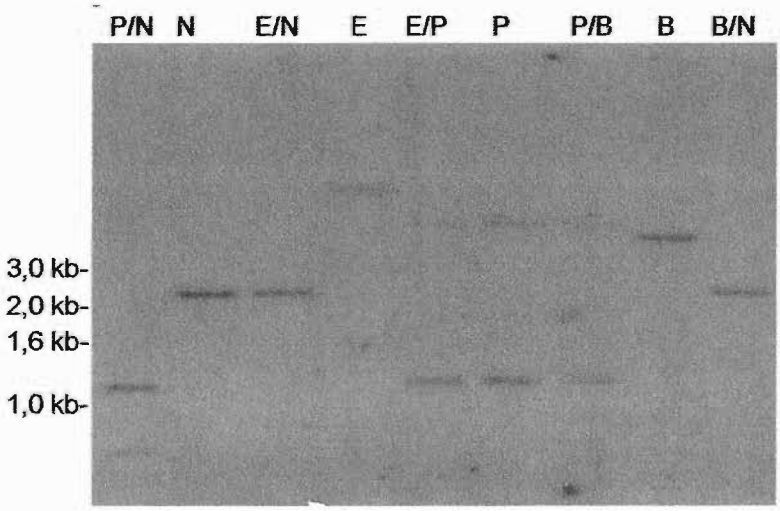


Figura 24. *Southern-blot* genômico de *B. emersonii* usando como sonda o cDNA codificador da BeCdk1. As enzimas de restrição usadas foram: E = *Eco*RI, P = *Pst*I, H = *Hind*III e B = *Bam*HI. Utilizou-se 1kb DNA *ladder* (Life Technologies) como marcador de peso molecular.

Os níveis do mRNA da BeCdk1 foram analisados ao longo do ciclo de vida do fungo, lembrando que a expressão das Cdks com região PSTAIRE conservada permanece constante ao longo do ciclo celular ao contrário das Cdks não PSTAIRE que mostram expressão regulada (vide INTRODUÇÃO). A BeCdk1 putativa de *B. emersonii* apresentou um aumento no nível de mRNA durante a esporulação, com um pico de acúmulo aos 90 minutos, para depois diminuir e aumentar novamente no final da esporulação e início da germinação, com um pico de expressão

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

no zoósporo e aos 30 minutos de germinação, e depois registrar um novo acúmulo na germinação tardia, aos 120 minutos após a indução da germinação (Figura 25).

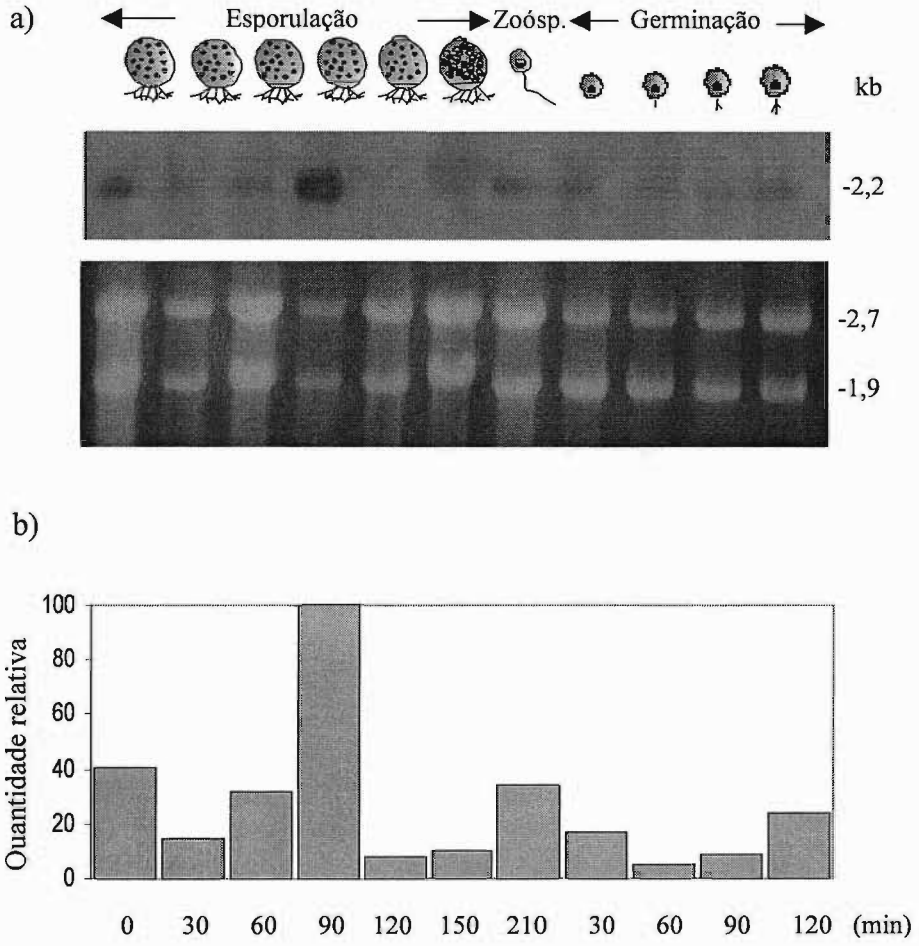


Figura 25. a) Análise dos níveis de mRNA da BeCdk1 durante a esporulaçao e a germinação por *Northern-blot*. As canaletas 1-6 correspondem a células de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 min após a indução da esporulação, respectivamente; as canaletas 7-11, correspondem a zoósporos e células em germinação de 30, 60, 90 e 120 min, respectivamente. As bandas dos RNA ribosomais 28S e 18S coradas com BrEt e visualizadas com luz UV foram usadas como controle da quantidade de RNA. b) Quantidade relativa do mRNA da BeCdk1 estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta.

Para determinar se o aumento nos níveis de mRNA era acompanhado por um aumento nos níveis da proteína correspondente, procedeu-se a subclonagem do cDNA no vetor de expressão pMAL c-2. Um fragmento de 811 pb (Pst I/ Hind III) do cDNA Becdk1 foi subclonado no vetor e a proteína recombinante obtida foi utilizada na imunização de coelhos O anti-soro anti-BeCdk1 obtido foi avaliado por *Western-blot* (Figura 26). Uma banda de aproximadamente 32 kDa (o tamanho estimado para a BeCdk1 é 32,5 kDa) e de expressão constitutiva foi observada (Figura 26). Esta banda poderia corresponder ao padrão de acúmulo da BeCdk1.

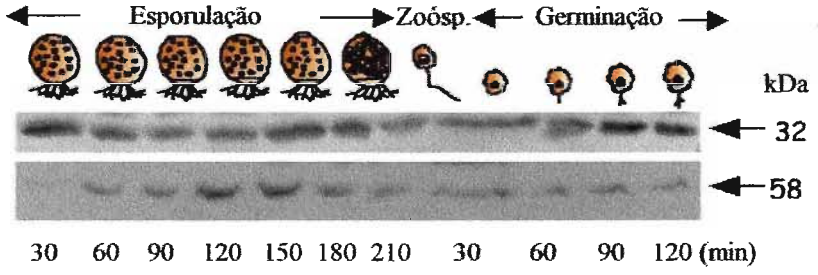


Figura 26. Análise dos níveis da BeCdk1 durante a esporulação e a germinação por *Western-blot*. As canaletas 1-6 correspondem a células de 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min após a indução da esporulação, respectivamente; as canaletas 7-11, correspondem a zoósporos e células em germinação de 30, 60, 90 e 120 min, respectivamente. A β-tubulina foi usada como controle da quantidade de proteína.

Foram realizadas também experimentos de imunolocalização utilizando anti-soro anti-BeCdk1 e zoósporos fixados de *B. emersonii* (Figura 27). A fluorescência mostrou uma reação específica na região do núcleo e na região do capacete nuclear do zoósporo.

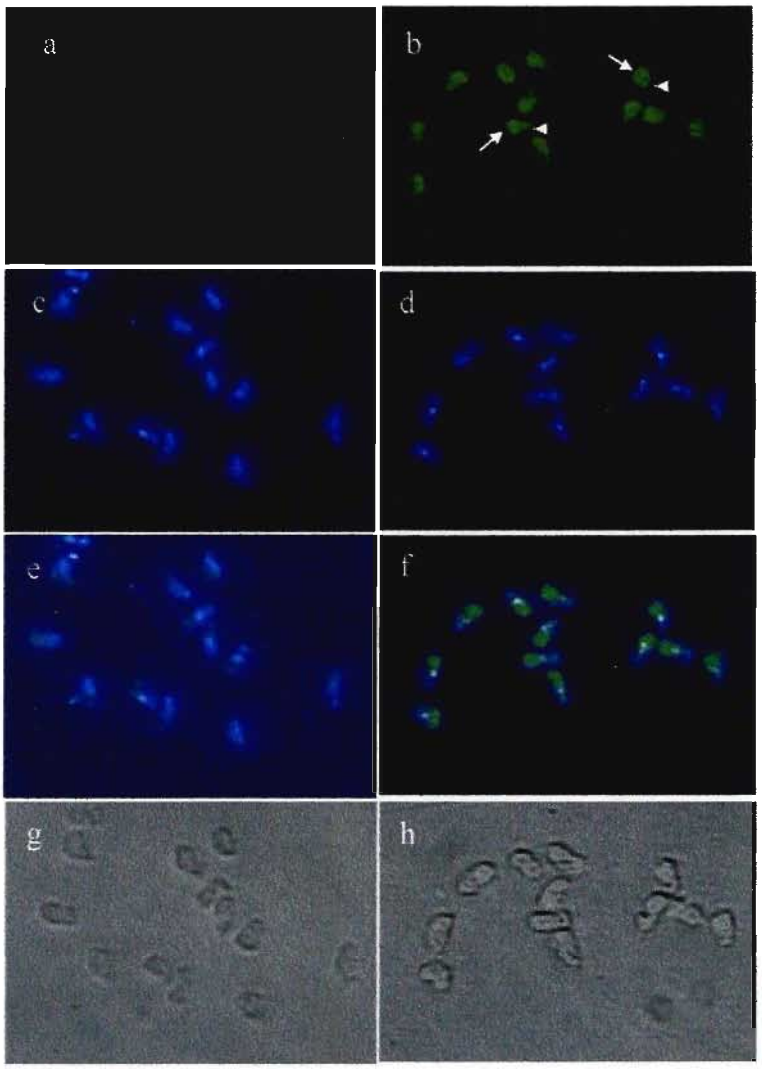


Figura 27. Imunolocalização da BeCdk1 em zoósporos de *B. emersonii*. Os zoósporos foram fixados e incubados na presença (b, d, f, h) e na ausência (a, c, e, g) do anti-soro anti-BeCdk1 seguindo-se incubação com o anticorpo secundário conjugado a *alexagreen*. Os mesmos campos foram observados por microscopia de fluorescência (a-f) para a observação da reação pré-imune (a) e imune (b) e a observação dos núcleos (c, d), ou por contraste de fase (g, h), utilizando-se microscopia óptica. Os núcleos foram observados por coração com DAPI colocado junto com o segundo anticorpo. As imagens e) e f) são o produto da superposição das imagens para a observação da reação imune e da coração com DAPI. As setas indicam o capacete nuclear e as cabeças de setas indicam o núcleo. O aumento é de 400X e o tamanho médio dos zóosporos é de 8 μm).

4.2.2.2.2. BeCdk2

O número de genes codificadores da BeCdk2 de *B. emersonii* também foi avaliado por *Southern-blot* (Figura 28) observando-se a presença provável de um único gene.

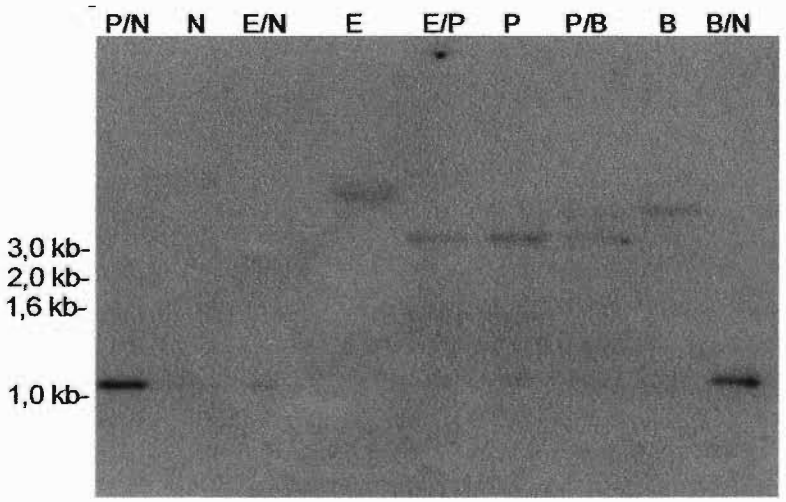


Figura 28. *Southern-blot* genômico de *B. emersonii* usando como sonda o cDNA codificador da BeCdk2. As enzimas de restrição usadas foram: E = *Eco*RI, P = *Pst*I, H = *Hind*III e B = *Bam*HI. Utilizou-se 1 kb DNA *ladder* (Life Technologies) como marcador de tamanho molecular.

Os níveis do mRNA da BeCdk2 foram analisados ao longo do ciclo de vida do fungo observando-se um aumento no acúmulo do mRNA entre os 60 e 120 minutos após da indução da esporulação, estando ausente nas demais etapas do ciclo de vida do fungo (Figura 29).

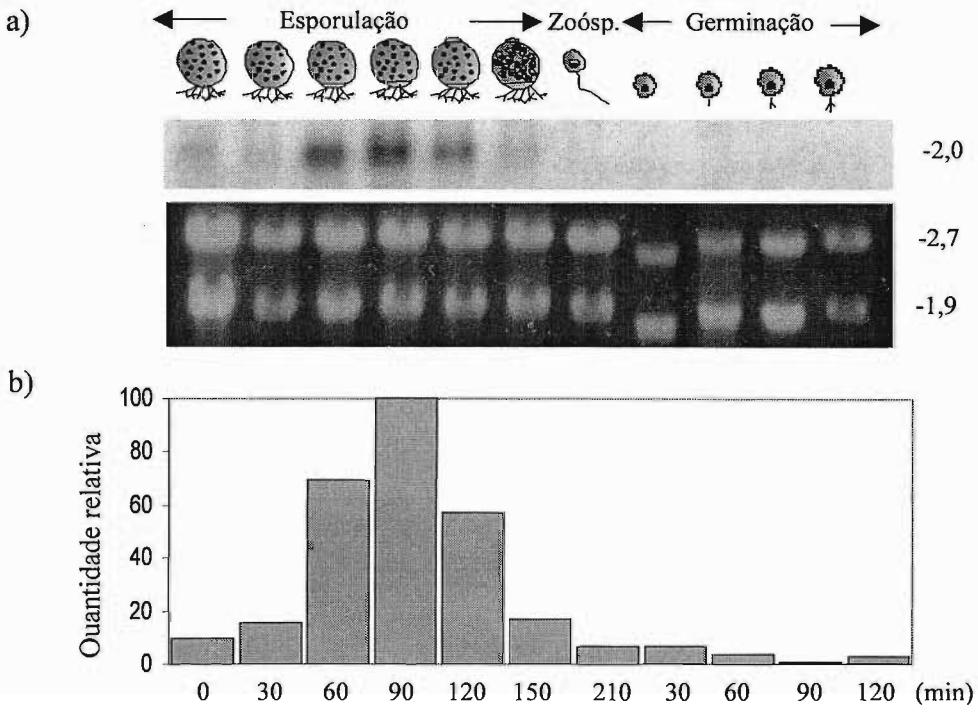


Figura 29. a) Análise dos níveis de mRNA da BeCdk2 durante a esporulaçao e a germinação de *B. emersonii* por *Northern-blot*. As canaletas 1-6 correspondem a células de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 min após a indução da esporulação, respectivamente; as canaletas 7-11, correspondem a zoósporos e células em germinação de 30, 60, 90 e 120 min, respectivamente. As bandas dos RNA ribosomais 28S e 18S coradas com BrEt e visualizadas com luz UV foram usadas como controle da quantidade de RNA. b) Quantidade relativa do mRNA da BeCdk2 estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta.

4.2.2. Transportador putativo de hexose de *B. emersonii.*

O fragmento correspondente à carboxila terminal de um transportador putativo de hexose (denominado Bemst) foi seqüenciado na biblioteca NSV. Nós consideramos o estudo desta seqüência dentro dos nossos objetivos visto que em vários organismos foi descrita a regulação da expressão de genes envolvidos no ciclo celular pela presença de nutrientes, em particular da glicose. Além disso, em *Blastocladiella* observou-se um bloqueio na esporulação na presença deste açúcar (Correa & Lodi, 1986). O cDNA seqüênciado possui 730 pb, incluindo o códon de parada, que codificariam 242 aminoácidos de uma proteína estimada por similaridade com proteinas dos bancos da dados em 520 aas (Figura 30).

```
     caaccgtctcgtcattggcgttatgctccagttcttccagcagtggaccgggatcaatgcg
        N  R  L  V  I  G  V  M  L  Q  F  F  Q  Q  W  T  G  I  N  A
   1---------+---------+---------+---------+---------+---------+60

     gtcatgtacttcagctcttcgctcttcatcgcaatgggtttctcgcgcaataccgctacg
      V  M  Y  F  S  S  S  L  F  I  A  M  G  F  S  R  N  T  A  T
  61---------+---------+---------+---------+---------+---------+120

     accgttaatgtcgttgtccaagcactcgtaaatgtgttcggcacgctccccggcatgtac
      T  V  N  V  V  V  Q  A  L  V  N  V  F  G  T  L  P  G  M  Y
 121---------+---------+---------+---------+---------+---------+180

     ctcatcgagcgcgcgggccgcacgcagctgctcaagtggggtggtatcggcatggcgacc
      L [I  E  R  A  G  R  T] Q  L  L  K  W  G  G  I  G  M  A  T
 181---------+---------+---------+---------+---------+---------+240

     ttcatgtggatcatctgcatcgcggtcaacctgttccagtcggcgtccgcgggcctgacg
      F  M  W  I  I  C  I  A  V  N  L  F  Q  S  A  S  A  G  L  T
 181---------+---------+---------+---------+---------+---------+240

     cccgacgcgtacccggcctcggcgaccgcctactcgctcatcggcctcgttgggatgtat
      P  D  A  Y  P  A  S  A  T  A  Y  S  L  I  G  L  V  G  M  Y
 241---------+---------+---------+---------+---------+---------+300

     ctttacgtcctctgcttcgcctcgacgtggggccccgtggtctggtcatacgtttccgaa
      L  Y  V  L  C  F  A  S  T  W  G  P  V  V  W  S  Y  V  S  E
 301---------+---------+---------+---------+---------+---------+360

     atcttcccggcccgtgtgcgcggcaagggcgtcgggatcgcgaccgcgagcaactggatc
      I  F  P  A  R  V  R  G  K  G  V  G  I  A  T  A  S  N  W  I
 361---------+---------+---------+---------+---------+---------+420

     aacaactacatcctctccgcggtctggccctacatcagcgaggctctgctcgccaaccag
      N  N  Y  I  L  S  A  V  W  P  Y  I  S  E  A  L  L  A  N  Q
 421---------+---------+---------+---------+---------+---------+480

     tacgcgatcttcggttgcaccggcctcgcgatggccgcctacgtccacttccaggtgccc
      Y  A  I  F  G  C  T  G  L  A  M  A  A  Y  V  H  F  Q [V  P]
 481---------+---------+---------+---------+---------+---------+540


     gaagaccagggcaagtcgctcgaggagatggacgaggtgttcgggttcaagtccggcgcg
     [E  D  Q  G  K  S  L  E  E  M] D  E  V  F  G  F  K  S  G  A
 541---------+---------+---------+---------+---------+---------+600

     gccgcttcggagctcaaggctgatcccccccccggcntctttcgtatggcgtgtcccat
      A  A  S  E  L  K  A  D  P  P  P  R  X  L  S  Y  G  V  S  H
 601---------+---------+---------+---------+---------+---------+660

     actctctag
      T  L  -
 661---------
```

Figura 30. Seqüência de nucleotídeos do cDNA parcial do gene que codifica um transportador putativo de hexose de *B. emersonii* e a seqüência deduzida de aminoácidos. Seis domínios transmembrana estão sublinhados e os domínios conservados em outros transportadores estão indicados por rectângulos.

O melhor alinhamento obtido pelo BLASTX contra a base nr do GenBank com uma seqüência bem caracterizada foi com o transportador de hexose do fungo *Amanita muscaria* (Agaricaceae, Basidiomycota), apresentando 36% de identidade e 55% de similaridade, correspondente ao segundo melhor alinhamento. O primeiro foi com a seqüência codificadora de uma proteína hipotética de *Neurospora crassa* que possui um domínio transportador de hexose.

O primeiro de nossos objetivos foi verificar o bloqueio da esporulação pela presença de glicose, conforme descrito por Correa e Lodi (1986). Para isso, alíquotas de uma cultura de *B. emersonii* de 6 h de crescimento a 27°C foram induzidas a esporular em SE na presença ou ausência de diferentes concentrações de glicose (vide MATERIAIS E MÉTODOS). As culturas foram capazes de esporular no período máximo de 240 min descrito para a fase de esporulação do fungo sob todas as concentrações de glicose testadas. A Figura 31b mostra apenas o resultado com glicose 2 %. Entretanto, foi observada uma diferença de fenótipo na presença de glicose 2%, isto é, a produção de zoosporângio vazios foi menor que a do controle sem glicose (5,3 % ± 1,5 contra 83,6 % ± 6,2 do controle), os zoósporos apresentaram-se arredondados, com menor capacidade de movimentação, e com dificuldades para saírem do esporângio pela papila de descarga, ficando na sua maioria dentro do mesmo (Figura 31b).

A seguir, estudou-se a influência de outros açucares no processo de esporulação. Novamente, alíquotas de uma cultura de *B. emersonii* de 6 hs de crescimento foram induzidas a esporular em SE na presença ou ausência de diferentes hexoses em concentração de 2%. Também foi testado glicerol na mesma concentração molar (glicerol 1%). Na presença de frutose 2%, os zoósporos desenvolveram-se também arredondados (Figura 31c) embora a movimentação e o número liberado ao meio após 240 minutos foram semelhantes aos das células na ausência do açúcar. Na presença de galactose 2%, a diferença entre os zóosporos

das células tratadas e os zoósporos controle foi novamente a forma (Figura 31d), sendo oblongos mas com maior largura que os da cultura controle. Com glicerol 1%, não houve diferenças comparando-se com a cultura controle (Figura 31e). Quando a esporulação foi induzida na presença de manose 2%, o processo foi totalmente inibido, ficando a célula na etapa de septo basal, que é atingida normalmente 60 minutos após a indução da esporulação (Figura 31f). Foram também testadas concentrações menores de manose para estabelecer a concentração mínima na qual se podia observar o fenótipo. O bloqueio da esporulação na etapa de septo basal manteve-se ainda sob uma concentração de 0,1% (não mostrado), a mesma concentração descrita anteriormente como inibitória da esporulação para glicose (Correa e Lodi, 1986).

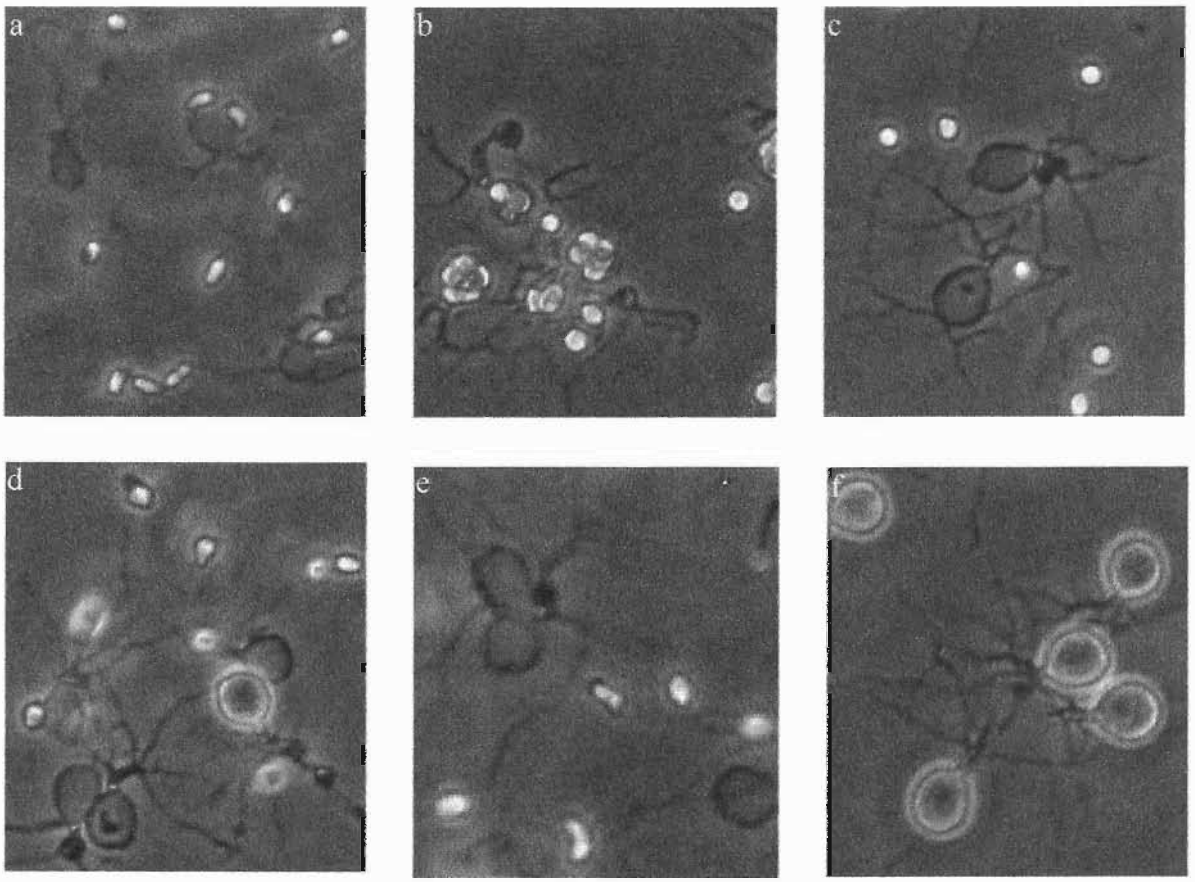


Figura 31. Fenótipos observados em culturas de *B. emersonii* 4 h após a indução da esporulação na presença de diferentes açúcares. a) SE (controle); b) SE + glicose 2%; c) SE + frutose 2%; d) SE + galactose 2%; e) SE + glicerol 1%; f) SE + manose 2%.

A esporulação também foi avaliada na presença de análogos não metabolizáveis de glicose. Os análogos de glicose usados foram a 2-desoxi-glicose, a qual é transportada e fosforilada mas não continua a ser degradada, e a 3-O-metil-glicose, a qual é apenas transportada mas não é sustrato da hexoquinase, e portanto também não é metabolizada. A cultura não progrediu ao longo da esporulação na presença de 2-desoxi-glicose, mostrando um fenótipo semelhante ao observado com manose (Figura 32b) e diferente do controle (Figura 32a). A 3-O-metil-glicose não teve efeito sobre a diferenciação e aos 210 minutos a maioria dos zoósporos tinham sido liberados para o meio (Figura 32c), como na esporulação do controle.

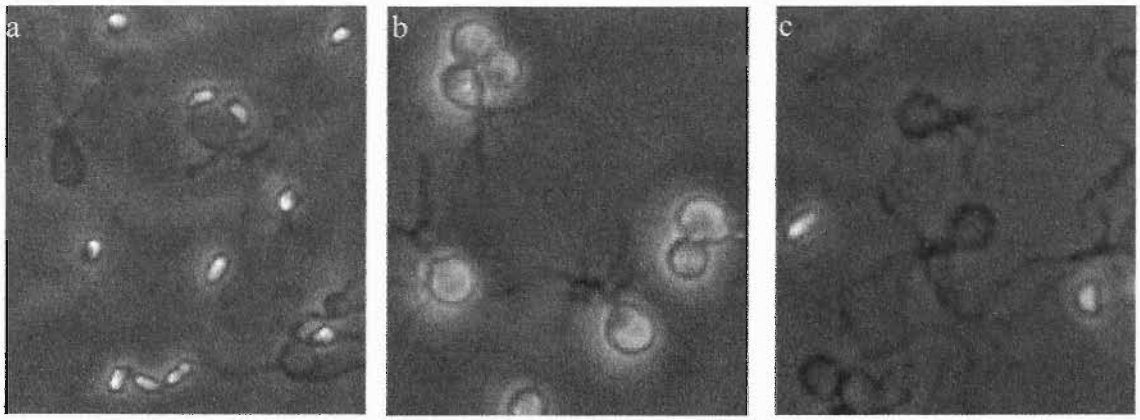


Figura 32. Fenótipos observados em culturas de *B. emersonii* 4 h após a indução da esporulação na presença de análogos não metabolizáveis de glicose. a) SE (controle); b) SE + 2-desoxi-glicose; c) SE + 3-O-metil-glicose.

A expressão do mRNA do gene que codifica o transportador putativo de hexose de *B. emersonii* foi analisada durante a esporulação na ausência e na presença de glicose 2% para estabelecer se apresentava alguma diferença, embora o fenótipo não tivesse sido o esperado. O padrão de expressão manteve-se muito semelhante nas duas condições (Figura 33 a, b).

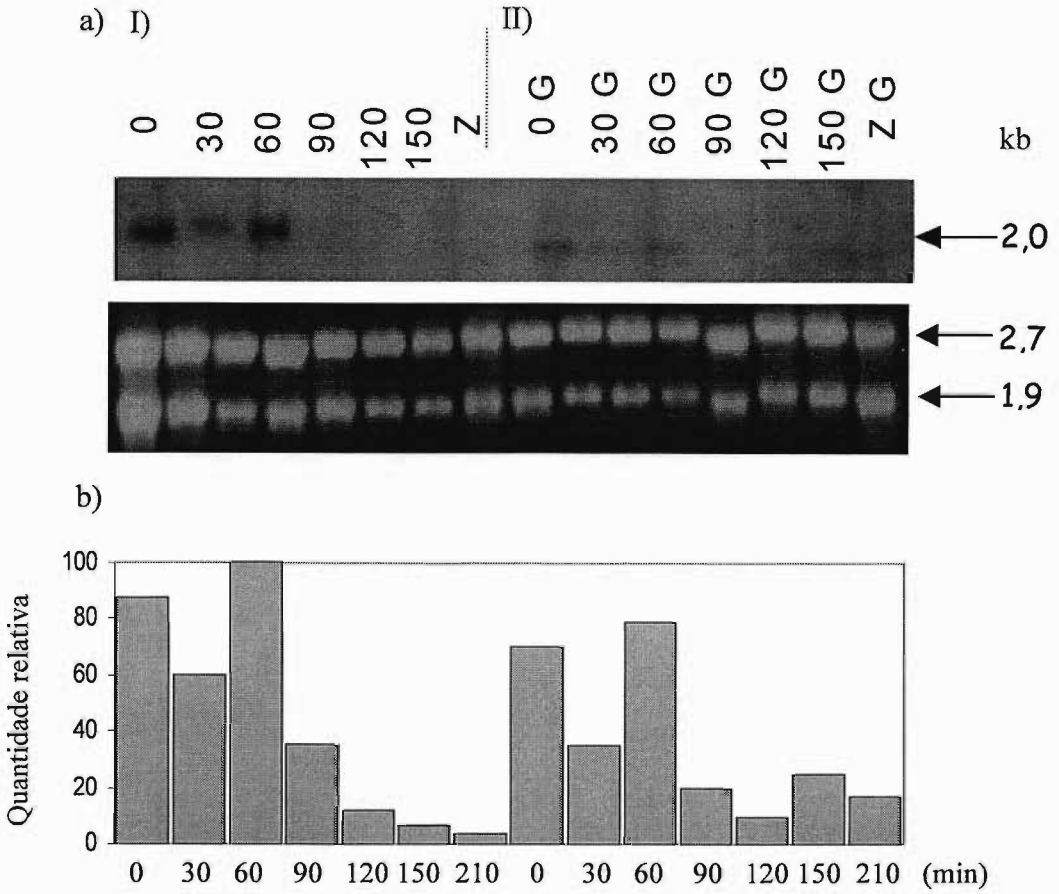


Figura 33. a) Análise dos níveis de mRNA da BeMst durante a esporulação de *B. emersonii* por *Northern-blot*. I) na presença de SE; II) na presença de SE + glicose 2%. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (Z). A letra *G* ao lado dos tempos indica a presença de glicose. As bandas dos RNA ribosomais 28S e 18S coradas com BrEt e visualizadas com luz UV foram usadas como controle da quantidade de RNA. b) Quantidade relativa do mRNA da Bemst estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta.

Entretanto, quando se analisou o padrão de expressão na presença de manose 0,1% (Figura 34 a,b), verificou-se que houve uma variação, indicando a influência das condições testadas nos níveis do mRNA. Com o objetivo de avaliar a expressão de outros genes na presença de manose fomos estudar o padrão de expressão do mRNA que codifica a Hsp70 de *B. emersonii* na ausência e na presença de manose (Figura 34). O padrão de variação deste mRNA também foi afetado, sugerindo um efeito geral na esporulação.

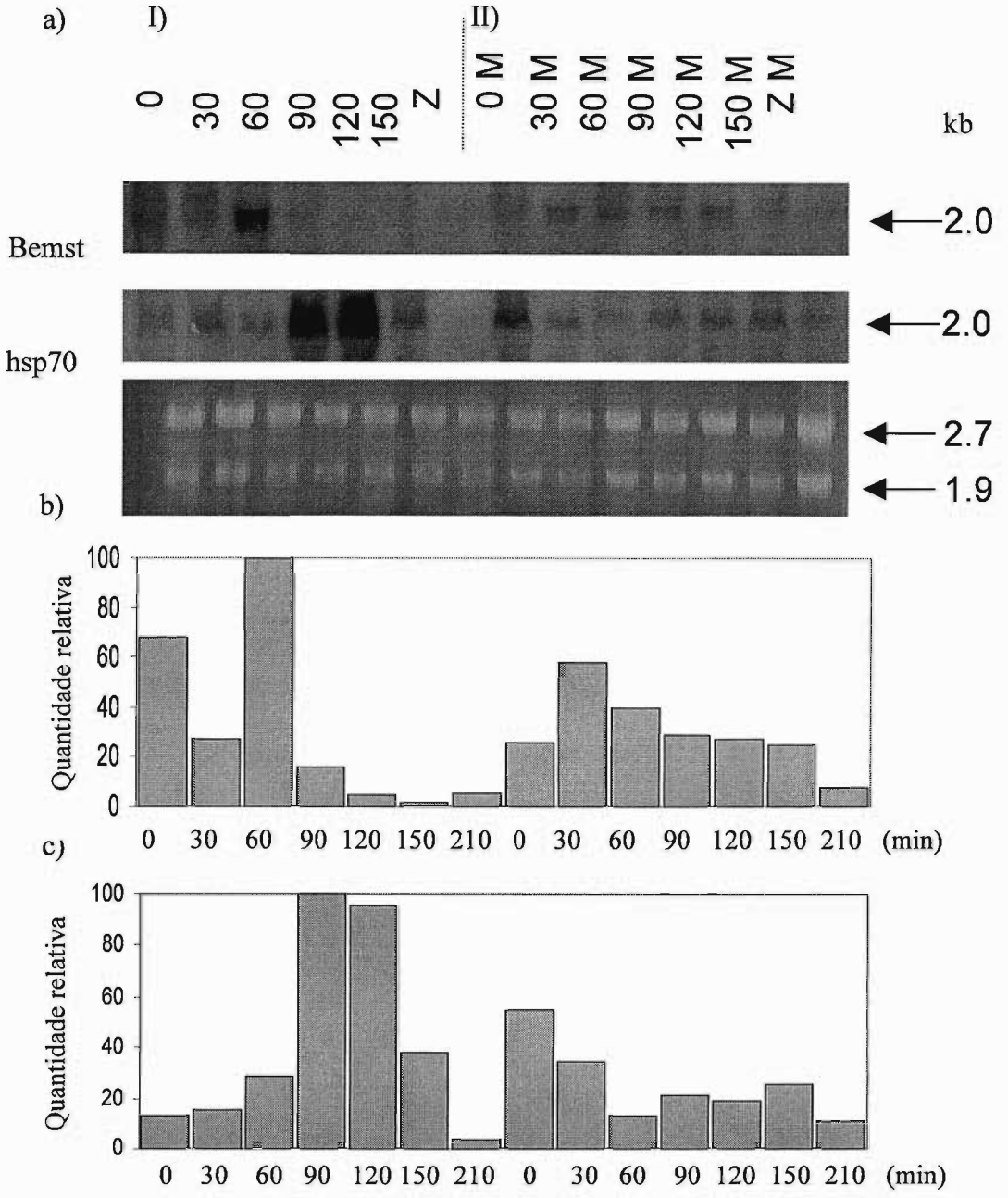


Figura 34. a) Análise dos níveis de mRNA da BeMst e da Hsp70 durante a esporulação de *B. emersonii* . I) na presença de SE; b) na presença de SE + manose 0,1%. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (Z). A letra *M* ao lado dos tempos indica a presença de manose. As bandas dos RNA ribosomais 28S e 18S coradas com BrEt e visualizadas com luz UV foram usadas como controle da quantidade de RNA. b) Quantidade relativa do mRNA da Bemst estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta. c) Quantidade relativa do mRNA da Hsp70 estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta.

Na tentativa de separar o efeito da presença da manose do efeito do bloqueio da esporulação, provavelmente um efeito pleiotrópico, fomos estudar o padrão de expressão de ambos mRNAs (Bemst e hsp70) em uma outra condição que bloqueasse a esporulação e que não tivesse relação conhecida com a/s via/s regulada/s pela manose. O bloqueio da esporulação pela presença de alguns aminoácidos tinha sido observado anteriormente (Correa and Lodi, 1986), então escolhemos alguns aminoácidos para confirmar o bloqueio. O triptofano (trp) em uma concentração de 0,4 mM foi suficiente para bloquear a esporulação, e então fomos testar o padrão de expressão de ambos os mRNAs ao longo da fase de esporulação na presença ou na ausência de trp.

Os ensaios indicaram que ambos os padrões estão alterados, mostrando um perfil de expressão semelhante ao observado na presença de manose, com um acúmulo dos mRNAs maior na presença de triptofano que na presença de manose tanto para a Bemst como para a hsp70 (Figura 35 a,b)

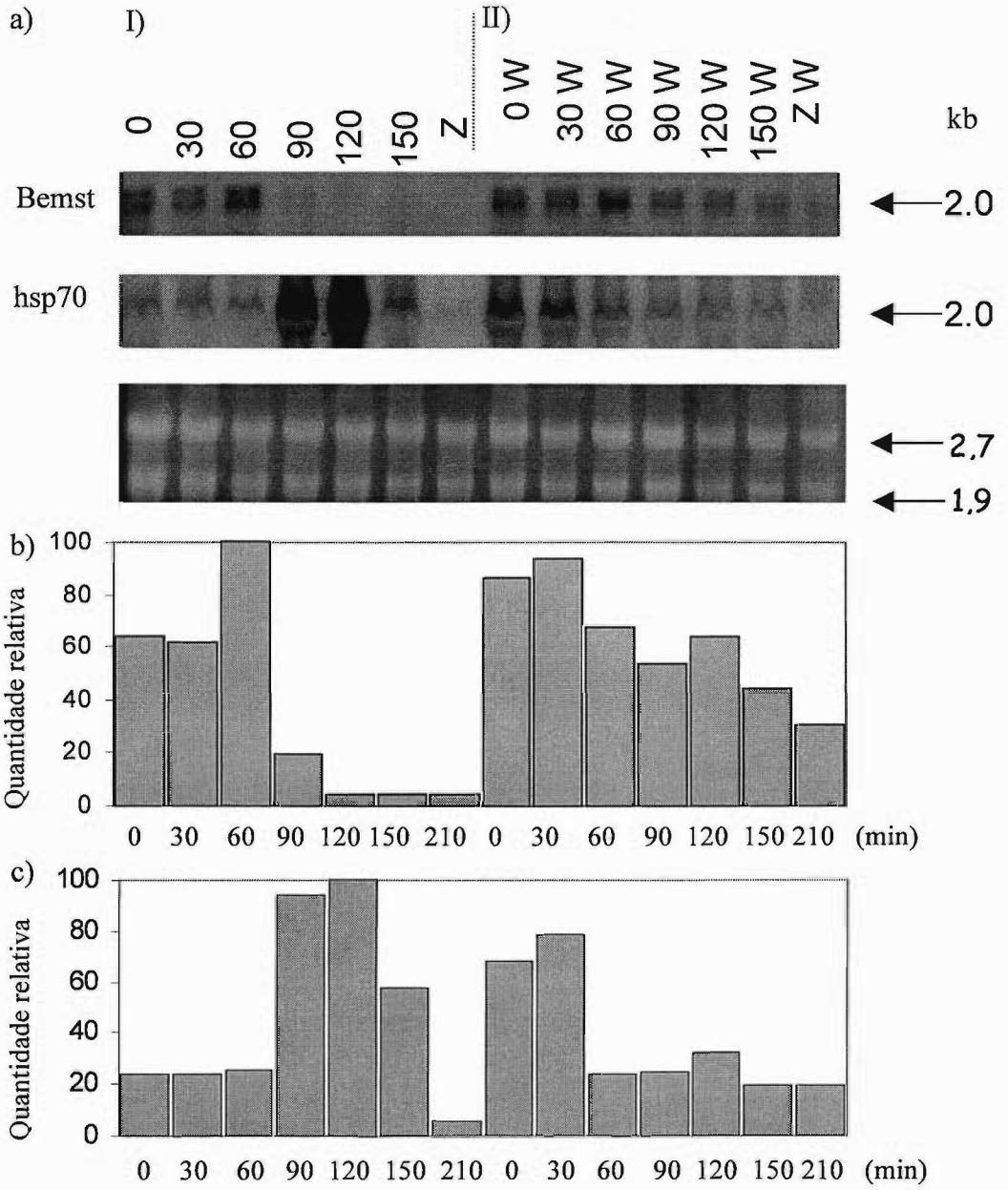


Figura 35. a) Análise dos níveis de mRNA da BeMst e da Hsp70 durante a esporulação de *B. emersonii* . I) na presença de SE; b) na presença de SE + triptofano 0,4 mM. Os tempos indicados (em minutos) correspondem a tempos após a indução da esporulação até a liberação de zoósporos (Z). A letra *W* ao lado dos tempos indica a presença de triptofano. As bandas dos RNA ribosomais 28S e 18S coradas com BrEt e visualizadas com luz UV foram usadas como controle da quantidade de RNA. b) Quantidade relativa do mRNA da Bemst estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta. c) Quantidade relativa do mRNA da Hsp70 estimado através da densitometria do autorradiograma, corrigindo-se pela quantidade de RNA em cada canaleta.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

5) DISCUSSÃO

5.1) Obtenção, processamento e anotação das seqüências expressas, e avaliação *in silico* dos perfis de expressão.

Desde os primeiros trabalhos descrevendo o seqüenciamento em grande escala de seqüências expressas ou ESTs (Adams et al., 1991; Waterston et al., 1992) numerosos estudos foram realizados apresentando análises das *ESTs* geradas por organismos em diferentes estágios de desenvolvimento (Nelson *et al.*, 1997; Kamoun *et al.*, 1999; Porcel *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Felipe *et al.*, 2003; Verjovski-Almeida *et al.*, 2003 Sacadura & Saville, 2003; Nugent *et al.*, 2004), em diferentes tempos do ciclo de vida (Zhu *et al.*, 2001), ou em diferentes tecidos (Adams *et al.*, 1995; Sterky *et al.*, 1998; Sterky *et al.*, 2004).

A informação proveniente do seqüenciamento das ESTs tem oferecido assim a possibilidade de analisar o espectro de genes que estão sendo expressos em determinado 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 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 análise posterior destas seqüências também tem fornecido informação adicional do ponto de vista funcional, evolutivo e estrutural (Torto *et al.*, 2003; Gard *et al.*, 2004; Philippe *et al.*, 2004; Bagga *et al.*, 2004)

As seqüências de *B. emersonii* geradas neste estudo constituem mais um aporte ao conhecimento da diversidade gênica de um organismo muito estudado em vários aspectos

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

bioquímicos, e produzem uma contribuição singular por se tratar de um quitridiomiceto, grupo de fungos dos quais se possui pouca informação em nível gênico.

Neste projeto foram geradas 8.495 ESTs com seqüência de boa qualidade que constituem 3.226 unigenes putativos que foram anotados em ontologias (The Gene Ontology Consortium, 2001), sistema que está sendo cada vez mais adotado pelos pesquisadores. Estes dados somaram-se aos quase 17.000 ESTs gerados no total do programa de seqüênciamento de ESTs das fases de esporulação, germinação e célula vegetativa deste fungo, para produzir um primeiro trabalho que foi submetido a publicação (Ribichich *et al.*, submetido). O número de seqüências únicas putativas do projeto global ficou perto de 4.890, uma porcentagem de informação importante para o que poderia ser o transcriptoma de *B. emersonii*.

Com o número crescente de dados em termos de seqüências geradas, chegou a ser clara a necessidade do aumento da precisão na *trimagem* (remoção de regiões indesejadas) e na formação de grupos de seqüências redundantes (ou *contigs*) para produzir seqüências consenso de alta qualidade e do maior tamanho possível. Nós fizemos a remoção de segmentos de vetores e de adaptadores, de caudas de poliA+, de seqüências de baixa qualidade, e filtramos as seqüências contaminantes (RNA ribosomal, mitocondrial, e de bactérias) como processo prévio à formação de *contigs* entre as seqüências geradas. Após a *trimagem* das seqüências usamos o programa CAP3 (Huang & Madan, 1999) para a formação de grupos de transcritos similares. Comparado com outros programas de agrupamento de fragmentos de seqüências, o CAP3 mostrou ter um índice menor de leituras com bases discrepantes em cada *contig* formado, menor influência dos erros do seqüenciamento tanto no agrupamento das seqüências como na formação do consenso, e menor produção de *contigs* redundantes (ou seja, *contigs* que provavelmente deveriam estar agrupados) (Liang *et al.*, 2000; Telles & Silva, 2001). No nosso estudo, também observamos a

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

diminuição no número de *contigs* gerados ao comparar o programa de agrupamento PHRAP (Green, 1996) com o CAP3 (Huang & Madan, 1999). Portanto, temos tentado minimizar a introdução de similaridade externa entre as *ESTs* que pudesse resultar em um agrupamento incorreto, mediante o uso de *trimagem* exaustiva, e temos tentado minimizar a formação de *contigs* redundantes usando o programa de agrupamento CAP3. Devido a estes procedimentos adotados, nós consideramos cada *contig* como proveniente da superposição de seqüências provavelmente transcritas do mesmo gene, e a soma de *contigs* e *singletes* como unigenes putativos, embora não seja possível descartar a existência de seqüências transcritas de parálogos (genes que são o resultado de um evento de duplicação) reunidas no mesmo *contig*, e de seqüências provenientes de diferentes regiões de um mesmo tipo de mRNA separadas em dois ou mais *contigs*.

As seqüências consenso provenientes dos contigs e as seqüências dos singletes foram comparadas com as seqüências existentes na base de dado não redundante do GenBank e a base de dados curada do SWISS-PROT and TREmbl. Entretanto, as seqüências foram identificadas putativamente em ontologias de acordo com os melhores alinhamentos obtidos contra esta última base. O objetivo desta dupla comparação foi, por um lado, informar uma identificação putativa por seqüências melhor caracterizadas no SWISS-PROT and TREmbl que as depositadas no GenBank e, ao mesmo tempo, manter a referência das seqüências recentemente geradas na hora de estabelecer a porcentagem das ESTs de *B. emersonii* com similaridade com outras seqüências e estabelecer quais organismos encontram-se entre os primeiros alinhamentos.

A porcentagem de seqüências não identificadas no GenBank foi de 43 %. Esta porcentagem está de acordo com os resultados obtidos para outros organismos (Kamoun *et al.*, 1999; Porcel *et al.*, 2000; Nugent *et al.*, 2004). Uma taxa de evolução das seqüências maior que a

de outros fungos poderia ser um dos fatores influindo nesta porcentagem. Nós avaliamos essa possibilidade para 20-25 ortólogos e determinamos que isso não parece ser um fator preponderante. Estes resultados concordam com os obtidos para 390 seqüências de *B. emersonii* em um estudo comparativo de ESTs que está sendo desenvolvido (Georg *et al.*, em preparação). A tendência não parece ser uma diminuição significativa das porcentagens dos não identificados na medida em que o número de genomas seqüenciados aumenta, visto que não se incrementa na mesma proporção a caracterização bioquímica dessas seqüências. Contrariamente, pode se esperar um aumento das seqüências expressas conservadas e das proteínas hipotéticas conservadas. Entretanto, considerando que os organismos modelos seqüenciados até agora não abrangem o espectro evolutivo, é provável que, no caso de um fungo primitivo como *B. emersonii*, uma grande porcentagem de seqüências expressas fique sem identidade putativa por maior tempo. Isto reflete também os limites do uso de dados de sequenciamento para identificar algumas proteínas homólogas distantes evolutivamente e que possam ter a estrutura mais conservada que a seqüência de amino ácidos.

A regulação da síntese de proteínas durante a esporulação de *B. emersonii* envolve controles transcricionais, traducionais e pós-traducionais (Lodi & Sonneborn, 1974; Correa *et al.*, 1978; Silva *et al.*, 1986). Conseguimos associar as seqüências geradas neste trabalho a diferentes processos biológicos usando o sistema GO e encontramos entre os processos biológicos mais representados a síntese de proteínas, a transcrição, e o transporte (Figura 8). Além disso, as ESTs mais freqüentes corresponderam a seqüências codificadoras de proteínas ribossomais putativas, ou seja, proteínas diretamente relacionadas com a maquinaria de biossíntese de proteínas (Tabela 4). Os perfis de expressão dos mRNAs para estas proteínas indicaram que a transcrição das proteínas ribossômicas está sendo reprimida durante a esporulação (Figura 10), o que foi

corroborado para uma delas por *Northern-blot* (Figura 11). Esta diminuição na transcrição está de acordo com a diminuição drástica na taxa de acúmulo do RNA (92 %) e com a redução em 60% da taxa de acúmulo de proteína que acompanha a indução da esporulação (Lovettt, 1975), e que após uma recuperação declina significativamente até o final deste estágio de diferenciação. Ao mesmo tempo, nós observamos *contigs* associados com o processo de proteólise/peptidólise com perfis correlacionados de expressão que mostram a sua indução durante a esporulação (Figura 10) o que também está em concordância com o aumento da proteólise observada nesta fase por Lodi e Sonneborn (1974), principalmente no final da esporulação. O significado biológico provável para esta degradação poderia ser a necessidade de prover amino ácidos para a síntese *de novo* de proteínas e para remover proteínas que poderiam bloquear o progresso de diferenciação celular (Lodi & Sonneborn, 1974)

Também em relação à degradação de proteínas, dentro do processo de transporte destacaram-se várias seqüências codificadoras possivelmente relacionadas com o transporte de proteínas através de retículo endoplasmático (RE) e das vesículas do Golgi para a reciclagem e excreção (Tabela 6). Além disso, também foi identificada pelo menos uma proteína envolvida em fusão de membranas vesiculares (Cdc48), a qual poderia participar diretamente do processo de celularização ou divisão celular. A citocinese envolve inicialmente a formação de vesículas de clivagem que se fundem e envolvem o flagelo (Lessie & Lovett, 1968; Lovett, 1975), e a fusão progressiva desse tipo de vesículas forma uma rede tridimensional de planos de clivagem em torno de cada núcleo. Foram também observadas estruturas parecidas com anéis de clivagem em algumas células (Lima, 1999). Estes mRNAs foram isolados apenas na esporulação, exceto por dois ESTs isolados na biblioteca de zoósporo (S. Salem-Izaac) que provavelmente foram

transcritos na esporulação, considerando-se que o zósporo é uma célula quiescente tanto para transcrição como para tradução (Lovett, 1975).

Tabela 6. Identidade putativa de 12 seqüências classificadas no processo transporte.

Identificação putativa	**Função**
Vacuolar import and degradation protein VID24 (*S. cerevisiae*)	Envolvida na degradação da frutose-1,6-bisfosfatase (FBPase). Provavelmente, regula o endereçamento das vesículas contendo FBPase ao vacúolo.
SED5-binding protein 2 (*S. cerevisiae*)	Reveste as vesículas derivadas do RE envolvidas no transporte do RE ao aparelho de Golgi.
Secretory carrier-associated membrane protein 1 (*H. sapiens*)	Age nas rotas de reciclagem pós-Golgi.
Syntaxin 22 (*A. thaliana*)	Pode prover um sítio de ligação (t-SNARE) para a fusão vacuolar.
Syntaxin 6 (*R. novergicus*)	Envolvida em tráfego vesicular intracelular.
Syntaxin 71 (*A. thaliana*)	Envolvida em tráfego vesicular na rota de secreção.
Vesicle transport v-SNARE 13	Pode prover um sítio de ligação (v-SNARE) responsável pelo endereçamento das vesículas envolvidas na secreção.
Adapter-related protein complex 1 sigma 1B subunit (*H. sapiens*)	Age na distribuição proteica na rede Golgi-tardía/trans-Golgi e/ou endossomas
Adapter-related protein complex 3 sigma 2 subunit (*M. musculus*)	Facilita a formação de vesículas do Golgi e pode estar envolvida no tráfego para os lisossomas.
Exocyst complex component 7 (*M. musculus*)	Envolvida na ligação de vesículas exocíticas com sítios de fusão na membrana plasmática.
Exocyst complex component sec6 (*S. pombe*)	Envolvida na ligação de vesículas exocíticas com sítios de fusão na membrana plasmática.
Transport protein particle 22 kDa subunit (*S. cerevisiae*)	Participa do tráfego RE/Golgi.

O fato das seqüências mais expressas durante esta fase estarem reprimidas logo aos 60 minutos após a indução do processo, nos fez pensar que a maioria das seqüências reguladas positivamente nesta etapa não deveriam ser muito expressas e que a maioria dos 3226 unigenes putativos deveriam corresponder a mRNAs também pouco expressos. Isso é efetivamente corroborado quando se observa que 80 % dos *unigenes* correspondem a *singletes* ou *contigs* que reúnem apenas duas ESTs (Tabela 3 e Figura 9). Além disso, uma comparação bidirecional feita com um número equivalente de seqüências da fase de germinação (seqüências do projeto da aluna Silvia Salem-Izaac) indicou que aproximadamente 75 % das seqüências agrupadas na fase de esporulação (incluindo algumas poucas seqüências das células vegetativas seqüenciadas) tinham sido observadas apenas nesta fase. Embora, não seja possível considerar essa porcentagem como representativa das seqüências exclusivas desta fase devido às limitações intrínsecas da amostragem (frente a um maior número de ESTs seqüenciadas algumas seqüências únicas poderiam ter se transformado em comuns a ambas fases), esta diferença resulta da grande variação na expressão gênica que ocorre durante a esporulação.

Além dos perfis de expressão relacionados com a síntese de proteínas e com a degradação destas, nós observamos outros padrões de expressão correlacionados (Figura 10), produzidos sobre *contigs* que foram previamente escolhidos considerando os intervalos de credibilidade (intervalos de erro) gerados na contagem normalizada de ESTs. O agrupamento de genes pelo perfil de expressão pode contribuir na identificação de marcadores substitutos, de elementos reguladores, e de seqüências sem identificação putativa (Ewing *et al.*, 1999). Neste sentido, vários *contigs* sem similaridade com seqüências nas bases de dados mostraram expressão correlacionada (Figura 10 d).

5.2) Estudo sobre as centrinas.

Seis ESTs foram isolados e agrupados em dois contigs, um correspondendo a seqüência codificadora completa de uma centrina relacionada à subfamília das CrCen (tipo *Chlamydomonas reinhardtii*), não descrita anteriormente em fungos, e outro correspondendo à porção carboxila terminal de uma centrina da subfamília das ScCdc31 (tipo *Saccharomyces cerevisiae*). A centrina (ou caltractina) é um membro da superfamília das proteínas tipo calmodulina contendo o motivo *EF-hand* de ligação a cálcio, com um papel no ciclo celular.

Em relação à caracterização da centrina tipo CrCen (chamada BeCen1), verificou-se que a transcrição do seu mRNA é aparentemente regulada durante a esporulação com um pico de acúmulo dos mensageiros aos 90 minutos desta fase. O aumento nos níveis da proteína entre os 120 e os 150 minutos da esporulação acompanhou o perfil do seu mRNA com uma defasagem de uma hora no tempo. Entre os 60 e os 120 minutos após indução da esporulação por carenciamento nutricional foram observadas divisões nucleares freqüentes e é possível que todos os núcleos dividam-se uma vez após a indução (Lovett, 1975). Como é regulada a passagem de cariocinese para citocinese em um organismo cenocítico ainda é desconhecido, mas o acúmulo da centrina após a indução da esporulação poderia estar relacionado com a mudança de programa no ciclo de vida, de crescimento para diferenciação.

Para caracterizar melhor a proteína, foi analisada a sua capacidade de união a cálcio. Para isso a proteína foi incubada em presença e ausência de cálcio, seguindo-se eletroforese em condições desnaturantes. A proteína na presença de cálcio mostrou uma pequena mudança na migração em relação à proteína em presença de EGTA, embora menor do já relatado para outros membros da superfamília, como calmodulina (Simão & Gomes, 2001). A ScCdc31p (a homóloga

da centrina em *S. cerevisiae*) possui quatro domínios *EF-hand*, porém apenas o primeiro e o quarto ligam cálcio (Geier *et al.*, 1996). Considerando a seqüência consenso de amino ácidos nas alças ligantes de cálcio (Figura 12 b; Marsden *et al.*, 1990; Gavet *et al.*, 2003) apenas o último domínio da BeCen1 teria a capacidade de ligar o cátion; isso poderia explicar a diferença no padrão de migração.

Finalmente, procedeu-se à imunolocalização da proteína por imunofluorescência em zoósporos fixados e usando soro pré-imune na mesma diluição do soro imune como controle (Figura 17). A BeCen1 localizou-se no citoplasma em torno do capacete nuclear, e na região do corpo basal (ou quinetoplasto no zoósporo, um tipo de centro organizador de microtúbulos ou MTOC). A localização da centrina nos eucariotos é de um modo geral nos MTOCs (Salisbury *et al.*, 1984; Baum *et al.*, 1986; Meng *et al.*, 1996; Klink & Wolniak, 2001; Ohta *et al.*, 1990 entre outros), e neste sentido parte dos nossos resultados estão de acordo com o esperado. O significado da localização da centrina no citoplasma é mais obscuro. Paoletti e colaboradores (1996) observaram que 90 % da centrina detectada em células linfoblásticas, onde descobriram a existência de pelo menos dez diferentes isoformas, localizava-se no citoplasma. Segundo os autores, a centrina não localizada no centrossoma poderia representar uma quantidade necessária para a biogênese do centrossoma ou para a reciclagem da centrina centrossomal. Como evidência da primeira possibilidade, Uzawa e colaboradores (1995 apud Paoletti *et al.*, 1996) observaram a presença de complexos contendo centrina e Hsp70 ou Hsp90 em extratos de ovócitos bloqueados de rã. Entretanto, o motivo pelo qual a célula precisaria de um armazenamento tão grande de centrina permanece pouco claro. Recentemente, foi descrito o envolvimento da centrina com a maquinaria de exportação do mRNA nuclear (Fischer *et al.*, 2004) em concordância com resultados prévios que indicavam que a centrina co-purificava com complexos relacionados com

os poros nucleares e que formava parte do complexo de exportação do mRNA nuclear associado a membrana nuclear (Rout *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2004). Os mesmos autores conseguiram observar a localização da centrina nos poros da membrana nuclear, o que não se tinha conseguido anteriormente. Isto indica que a centrina pode ter ainda funções específicas e desconhecidas no citoplasma e no núcleo.

Em relação à caracterização da BeCen2, centrina pertencente a uma outra família divergente da anterior, a do tipo ScCdc31p, característica de fungos, tentou-se primeiramente clonar a porção 5' do mRNA que não foi isolado nas bibliotecas. Para isso foram feitas várias tentativas (envolvendo o uso dos oligonucleotídeos Becen2-left e Becen2-left2) e se conseguiu estender o fragmento clonado em 234 pb usando o oligonucleotídeo Becen2-left. Enquanto os níveis do mRNA apresentaram um pico aos 120 min da esporulação, a proteína não apresentou variação nos seus níveis. Os níveis da proteína foram investigados utilizando anti-soros heterólogos e verificou-se que estes não acompanharam os níveis do mRNA. Isto é possível dado que nem sempre um aumento nos níveis de mRNA (por indução da transcrição ou aumento da estabilidade do mensageiro) ocasiona em um aumento nos níveis da proteína que pode sofrer outro tipo de regulação, como proteólise. O processo de proteólise/peptidólise ocorre durante a esporulação como já indicamos (Lodi & Sonneborn, 1974) e, coincidentemente, os *contigs* relacionados com este processo mostraram perfis de expressão regulados durante esta fase. Outra questão é a massa molecular obtida no *Western-blot* (aproximadamente 34 kDa), muito maior da esperada (20 kDa). A HsCen3 possui uma massa molecular aparente levemente maior do que outras centrina (23 kDa), mas ainda bem menor que o observado por nós para uma possível BeCen2. A falta da seqüência completa do cDNA também dificulta a discussão sobre este ponto. Tentativas de imunolocalizar a BeCen2 usando o soro específico contra HsCen3 foram feitas sem

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

resultados conclusivos. Middendorp e colaboradores (1997) sugeriram que as centrinas relacionadas com ScCdc31 poderiam ser bem menos abundantes nas células, com base na baixa abundância do mRNAs detectada para a HsCen3. Isso, somado ao uso de soro heterólogo, poderia explicar porque não foi conseguida a localização.

A presença de dois genes codificando centrinas em *B. emersonii*, pertencentes às duas subfamílias divergentes não é surpreendente se considerarmos que os quitridiomicetos possuem centríolos e formas flagelares que foram perdidas em fungos superiores. Portanto, *Blastocladiella* teria ambos os genes que poderiam exercer funções diferentes: orientação do aparelho flagelar (Becen1) e divisão dos MTOCs (Becen2). Em concordância com esta idéia, duas seqüências divergentes foram identificadas em duas espécies de *Giardia* (Meng *et al.*, 1996; e número de acceso no GenBank U59300).

5.3) Estudo sobre quinases dependentes de ciclinas.

Ao longo dos fila eucarióticos, a atividade quinase dependente de ciclina parece estar envolvida tanto no controle da progressão entre as fases que ocorrem no núcleo durante a sua divisão, como na coordenação entre a citocinese e a divisão nuclear (Broek *et al.*, 1991; Morgan, 1997; Mironov *et al.*, 1999; Balasubramanian *et al.*, 2000; John *et al.*, 2001; Nanninga, 2001).

A falta de acoplamento entre as fases leva à morte celular pela geração de células que não completaram a replicação do seu DNA ou à poliploidia. Em *S. pombe*, a destruição da Cdk1 na fase G_2 pode levar a uma re-programação do ciclo celular; na restauração da Cdk1, a célula desenvolve uma nova fase S sem haver completado a mitose, gerando células poliploides (Broek *et al.*, 1991).

Os níveis das Cdks parecem permanecer constantes ao longo do ciclo de vida, exceto para a HsCdk1 (McGowan *et al.*, 1990), entretanto os níveis de ciclinas oscilam. As atividades dos complexos Cdk/ciclina são controladas principalmente pós-traducionalmente ((Moser & Rusell, 2000; Zhang *et al.*, 2002; Santori *et al.*, 2002).

Em fungos foi descrita apenas uma Cdk (Cdk1) envolvida diretamente com o controle do ciclo celular, enquanto que a regulação em metazoários, incluindo plantas, parece ser mais complexa que em fungos, visto que envolve múltiplos complexos Cdk/ciclina.

Em *B. emersonii* foram isolados cinco cDNAs que foram reunidos em dois *contigs* distintos, cujos consensos foram identificados putativamente como seqüências codificadoras de Cdks relacionadas com o controle do ciclo celular. Considerando que nossa caracterização compreendeu apenas a avaliação dos níveis dos mRNAs por *Northern-blot* e dos níveis da proteína por *Western-blot* para uma das Cdks putativas, a discussão em torno da identidade destas Cdks e as implicações da sua presença em um fungo não pretende enunciar conclusões mas sim mostrar as possibilidades que se abrem na continuação da caracterização destas enzimas.

As seqüências deduzidas de amino ácidos destas Cdks mostram a presença dos motivos conservados descritos para este tipo de enzimas (Figura 22). Os melhores alinhamentos obtidos usando o BLASTX contra a base não redundante do *GenBank* foram com uma proteína hipotética de um fungo (para BeCdk1) e com a Cdk2 de um ouriço de mar (para BeCdk2). No caso da BeCdk1, os três primeiros melhores alinhamentos foram com fungos, mas apenas o terceiro dos alinhamentos foi com uma proteína que possui evidências de ser um homólogo da Cdc28, a Cdk1 de *C. neoformans* (Takeo *et al.*, 2004); o restante dos alinhamentos foram com a Cdk de um vertebrado, e com as Cdks de várias plantas. No caso da BeCdk2, pelo menos os dez primeiros melhores alinhamentos foram com proteínas de animais. Isto parece indicar que a BeCdk1 não

seria tão próxima às prototípicas Cdc2/Cdc28 de leveduras mas sim às Cdks de outros fungos recentemente descobertas e ainda não bem caracterizadas, e que a BeCdk2 seria diferente das Cdks descritas até o momento em fungos.

Curiosamente, pelo menos uma forma de regulação das Cdks de *Blastocladiella* ao longo do ciclo de vida parece ser transcricional (Figuras 25 e 29), o que também não foi observado anteriormente para as Cdks descritas em fungos e animais, diretamente envolvidas no controle do ciclo celular. Ao contrário destes organismos, em plantas descreveram-se dois grandes grupos: o das Cdks que se comportam como as de fungos e animais, as quais não apresentam regulação transcricional, complementam mutantes de cdc2/cdc28 e possuem o motivo PSTAIRE conservado na sua seqüência, e o grupo das que possuem regulação transcricional, não complementam mutantes de cdc2/cdc28 e apresentam variantes no motivo PSTAIRE. As Cdks putativas de *B. emersonii* apresentaram variações no padrão de expressão do mRNA e possuem variantes no motivo PSTAIRE. Embora nenhuma das duas Cdks possua uma variante do motivo PSTAIRE igual aos já descritos em plantas, e não haja evidências da interação com ciclinas, os resultados sugerem que *B. emersonii* apresenta Cdks semelhantes às descritas em plantas. O agrupamento das Cdks de *B. emersonii* junto com as Cdks "não-PSTAIRE" contribui para sustentar esta hipótese (Figura 23).

Entretanto, a recente descrição da Cdk1 de *C. neoformans* (CnCdk1) com uma hélice PSTSIRE e capacidade de complementar um mutante termosensível em cdc28 de *S. cerevisiae* (Takeo *et al.*, 2004) introduz novos elementos a serem considerados. Os autores não analisaram outros elementos além da conservação dos motivos de amino ácidos e a complementação, portanto não podemos saber se há ou não uma variação nos níveis do mRNA desta Cdk. A substituição de uma alanina, um resíduo hidrofóbico, por uma serina, um resíduo hidrofílico,

poderia influir na função enzimática significativamente, e ao mesmo tempo indicar que as ciclinas de *C. neoformans* são marcadamente diferentes das de *S. cerevisiae*, já que é este o motivo de ligação às ciclinas (Takeo *et al.*, 2004). Entretanto, a CnCdk1 complementou um mutante de cdc28 pelo que teria a capacidade de ligar pelo menos algumas das ciclinas de *Saccharomyces*.

Contrariamente à hipótese da proximidade das BeCdks às Cdks de plantas e a favor da sua proximidade à Cdc2/Cdc28, a expressão da BeCdk1 observada por experimentos de *Western-blot* pareceu ser constitutiva (Figura 26). Esta observação indica a ação de algum tipo de regulação pós-transcricional, visto que o acúmulo da proteína não acompanhou a expressão do mRNA. A ausência de outros elementos, como os níveis da BeCdk2 durante o ciclo de vida e as medidas de atividade destas quinases, nos impede de avançar muito mais nesta discussão. O fato de que os níveis do mRNA da BeCdk2 aumentam durante a passagem da divisão nuclear para a citocinese, enquanto os da BeCdk1 aumentam também na germinação poderia refletir diferenças na atividade destas quinases e, portanto, na função das mesmas em diferentes etapas do ciclo de vida de *Blastocladiella*. A atividade quinase durante a citocinese já foi descrita em plantas (com Cdks "não PSTAIRE") (John *et al.*, 2001), em *C. elegans* e em *S. pombe* (com as chamadas quinases Polo, não dependentes de ciclina), sendo que em *S. pombe* estão envolvidas na localização do ponto de clivagem da citocinese (Schumacher *et al.*, 1998, Bähler *et al.*, 1998 apud John *et al.*, 2001), e em *A. nidulans* onde a atividade da Cdk1 é necessária e limitante na velocidade da formação do septo na hifa (Harris & Krauss, 1998)

Finalmente, segundo os ensaios de imunolocalização por IFI, a BeCdk1 pareceu localizar-se no núcleo e no capacete nuclear de zoósporos de *B. emersonii* (Figura 27). A localização das Cdks parece variar conforme as fases do ciclo celular e sua associação com diferentes ciclinas.

Assim por exemplo, a Cdc2 de *S. pombe* e a Cdc2a em plantas (o homólogo da Cdc2) estão localizadas no citoplasma ao longo do ciclo celular, mas a Cdc2 acumula no núcleo durante a transição G_1/S e a Cdc2a é predominantemente nuclear durante as etapas nas quais a membrana nuclear está intacta (Decottignies *et al.*, 2001; John *et al.*, 2001). Portanto, a localização nuclear da BeCdk1 em zoósporos estaria de acordo com as observações feitas em outros organismos. A localização no capacete nuclear (uma organela não descrita em outros organismos nem em outras etapas do ciclo de vida além dos zoósporos dos quitridiomicetos) poderia indicar outras funções específicas desta Cdk1 no zóosporo. No elegante trabalho de Ubersax e colaboradores (2003) foram identificados mais de 200 substratos para a Cdk1. Portanto, não seria estranho que alguns desses substratos ou outros ainda não caracterizados pudessem encontrar-se no capacete nuclear, cuja fosforilação pela Cdk estivesse envolvida com os eventos posteriores de encistamento e germinação, que são acompanhados pela desorganização desta organela.

5.4) Estudo sobre um transportador putativo de hexose.

A regulação da expressão de genes por glicose é um fenômeno geral em eucariotos. Exemplos deste controle foram observados em microorganismos como *S. cerevisiae* (Rolland *et al.*, 2001), plantas (Graham *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 2003) e animais (Zinke *et al.*, 2002; Vaulont *et al.*, 2000), particularmente em relação a genes envolvidos na fermentação, respiração e metabolismo de fontes alternativas de carbono. O papel da glicose como regulador da expressão gênica também abrange genes relacionados direta ou indiretamente com o ciclo celular tanto em levedura (Newcomb *et al.*, 2003), plantas (Rolland *et al.*, 2002) como em animais (Zinke *et al.*, 2002; Vaulont *et al.*, 2000). Ao mesmo tempo, tem-se descrito genes que funcionariam

especificamente como sensores de glicose (Ozcan *et al.*, 1996; Coons *et al.*, 1997; Madi *et al.*, 1997).

O bloqueio da esporulação de *B. emersonii* pela presença de glicose nos levou a pensar que genes envolvidos com o metabolismo de glicose pudessem ter a capacidade de detectar a presença desta hexose, fazendo parte de um caminho de sinalização com efeitos no desenvolvimento.

Dois fragmentos correspondentes à porção carboxi-terminal de um transportador de hexose putativo foram clonados em duas bibliotecas de cDNA (NSV e E60). O melhor alinhamento do fragmento proteico deduzido da seqüência do cDNA com uma proteína bem caracterizada foi obtido com o transportador de glicose da micorriza *Amanita muscaria* (*mst-1*). Na comparação com as seqüências de outros transportadores de monosacarídeo (Nehls *et al.*, 1998), a seqüência de amino ácidos deduzida do *mst-1* (AmMst1) ficou mais próxima do Rco3 de *N. crassa* e do Snf3 e Rgt2 de *S. cerevisiae* descritos como sensores, embora o AmMst1 (como também o nosso fragmento) não tivesse um domínio citoplasmático expandido, como sim tem o S Snf3 e o Rgt2.

A expressão do *mst-1* de *Amanita muscaria* aumenta na presença de alta concentração de glicose, o que sugeriu a possibilidade de que o transporte de glicose, a sua fosforilação, ou outros mecanismos pudessem estar envolvidos na detecção de glicose. É freqüente o uso de análogos de glicose não metabolizáveis para separar o efeito que a glicose possa ter, do efeito causado por algum intermediário metabólico. A 3-O-metil-glicose é apenas transportada para o interior da célula, entanto a 2-desoxiglicose é transportada e fosforilada subseqüentemente, sem continuar no caminho catabólico. Nenhum dos dois análogos utilizados foi capaz de induzir a expressão do *mst-1* (Nehls *et al.*, 1998), concluindo-se que nem o transporte, nem a fosforilação por uma

hexoquinase, foram suficientes para disparar a resposta descrita. Assumiu-se então que o metabolismo após a etapa da glicose-6-fosfato poderia estar atuando como sensor.

A resposta obtida em *Blastocladiella* precisa de uma outra análise. A esporulação não foi totalmente bloqueada pela presença de glicose em concentração tão alta quanto 100 mM. O fenótipo mudou, já que os zoósporos ficaram arredondados, com pouca movimentação e dificuldade para sair do zoosporângio, mas eles eram viáveis como foi comprovado re-inoculando-os em médio PYG fresco (dados não mostrados). Outros açúcares testados também não tiveram efeito, sendo o mesmo o resultado obtido com glicerol usado na mesma concentração molar. Curiosamente, manose causou o bloqueio total da esporulação em concentração de 5,5 mM, bem menor que as testadas com outros azúcares.

Manose é uma das hexoses mais freqüentes na natureza, formando parte da hemicelulose das plantas e dos glicoconjugados de eucariotos. Em fungos é encontrada formando parte de substâncias de reserva (Duncan *et al.*, 2002), de polisacarídeos e glicoconjugados estruturais (Jigami & Odani, 1999; McFadden & Casadevall, 2001; Ahrazem *et al.*, 2001) e extracelulares (Khondkar *et al.*, 2002). Entretanto, a capacidade de crescimento com manose como fonte de carbono e outras hexoses, como galactose ou frutose, diferentemente de glicose, varia dependendo do fungo (Moore, 1981). A manose é um epímero da glicose no carbono 2, predominando o α-anômero em soluções aquosas no caso da manose, sendo o β-anômero no caso da glicose. Portanto, a manose é um análogo metabolizável ou não, da glicose. A manose reprime vários genes de plantas na via da hexoquinase (Graham *et al.*, 1994) com maior eficiência que a glicose. Alguns processos como a fotossíntese (Harris *et al.*, 1986), e a germinação (Pego *et al.*, 1999) são inibidas, mas as causas desse efeito não parecem ser as mesmas. Após a entrada na célula, a manose é fosforilada a manose-6-P. Se a célula carece da

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

capacidade de metabolizar o análogo fosforilado ou ele é processado lentamente, seu acúmulo crescente pode diminuir o fosfato intracelular levando a uma variedade de distúrbios (Moore *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 1986). Nos exemplos citados em plantas, a inibição da fotossíntese foi parcialmente revertida pela adição de ortofosfato, no entanto a ausência de germinação não foi causada pela depleção de fosfato ou ATP.

A capacidade de crescer de *B. emersonii* na presença de manose como fonte de carbono foi testada substituindo-se a glicose do meio DM4 pela manose na mesma concentração (18,6 mM). Em culturas de 6 h as células cresceram, mas desenvolveram um tamanho menor se comparadas às crescidas em DM4 com ou sem glicose. Já em culturas de 16 h, as células morreram. Portanto, os resultados sugerem que a manose é um análogo não metabolizável em *B. emersonii*, e que em culturas de poucas horas apenas estaria exercendo um efeito retardatário no crescimento, visto que o efeito tóxico da manose seria contraposto pela metabolização de aminoácidos do meio.

As bases bioquímicas da inibição causada pela 2-deoxiglicose são bem conhecidas (Moore *et al.*, 2003), sendo a fosforilação do análogo pela hexoquinase a via utilizada, como foi descrito para manose. Portanto, é coerente que a esporulação tenha sido bloqueada tanto pela manose como pela 2-deoxiglicose. Ao contrário, a 3-O-metil-glicose não teve o mesmo efeito, indicando a necessidade do intermediário fosforilado. Portanto, o bloqueio produzido por manose poderia atribuir-se a uma queda nos níveis de fosfato e ATP intracelular.

Ao mesmo tempo, a glicose não atuou como seus análogos, indicando que ela é metabolizada durante a diferenciação. O zoósporo de *B. emersonii* acumula glicogênio provavelmente usado na germinação. Portanto, o excesso de glicose poderia estar sendo desviado para a síntese de glicogênio, o que concorda com o aparente aumento de tamanho e perda de

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

movimento do zoósporo. Nós tentamos visualizar o acúmulo de glicogênio por microscopia, na presença de KIO_4/I_2 (lugol) sem resultados satisfatórios. Uma das dificuldades para tentar avaliar esse acúmulo seria a normalização dos dados obtidos, visto que zoósporos obtidos na presença de glicose demoram mais tempo em ser produzidos e em sair do zoosporângio.

A diferença observada entre os efeitos de glicose e manose na esporulação concorda com os resultados de expressão do transportador putativo de hexose. A expressão não foi afetada pela presença de glicose, mas sim pela de manose. Porém, a presença de triptofano, outro agente que bloqueia a esporulação, teve um efeito semelhante ao da manose sobre o gene, indicando que a regulação deve estar sendo causada por um outro efeito, secundário ao da manose ou ao do triptofano. O padrão de expressão do gene hsp70, usado como controle, também foi afetado durante a inibição da diferenciação, tanto na presença de manose como de triptofano.

O efeito do triptofano no bloqueio da esporulação não está claro e não pode descartar-se a hipótese de que o acúmulo do intermediário fosforilado estaria sendo detectado, mediante algum mecanismo, regulando a expressão do transportador, e garantindo assim o fluxo de hexose. Alternativamente, a diminuição nos níveis de ATP, ou da relação ATP/AMP poderia funcionar como regulador.

Um mecanismo de regulação poderia ser a fosforilação. Em *S. cerevisiae*, Rgt1 funciona como repressor da transcrição de alguns dos transportadores como HXT1 na ausência de glicose; quando a glicose está presente, ele é fosforilado, desligando-se dos promotores (Mosley *et al.*, 2003). Por outro lado, não se sabe se os transportadores de hexose de levedura são glicosilados, fosforilados ou modificados de outra forma, apesar de possuírem seqüências consenso para N-glicosilação e fosforilação pela protein quinase A, a caseína quinase II e a quinase dependente de ciclina CDC28 (Boles & Hollenberg, 1997). O domínio citoplasmático do fragmento clonado

neste trabalho, predito pelo programa TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/), possui dois sítios potenciais de fosforilação nas serinas 186 e 215, detectado pelo programa NetPhos (http://www.cbs.dtu.dk/ services/NetPhos/).

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

5) CONCLUSÕES

- Isolamos 8.495 seqüências expressas do fungo *B. emersonii*, representando 3.226 potenciais *unigenes*, dos quais 1.591 foram classificados segundo o GO em processos biológicos, funções moleculares e compartimentos celulares.
- Analisamos os perfis de expressão *in silico* das seqüências expressas, sete dos quais foram validados por *Northern-blot*. Observamos correlação entre alguns desses padrões e processos biológicos.
- *B. emersonii* possui pelo menos dois genes distintos que codificam centrinas pertencentes a duas famílias divergentes: tipo *C. reinhardtii* (Becen1) e tipo *S.cerevisiae* (Becen2), o primeiro dos quais não tinha sido descrito em fungos até o momento. Ambos os genes apresentam expressão diferencial durante a esporulação. Os níveis da proteína BeCen1 acompanharam as variações do seu mRNA, BeCen1 foi capaz de ligar cálcio *in vitro*, embora provavelmente não possua os quatro domínios ligantes de cálcio funcionais, e foi localizada por imunofluorescência no citoplasma e no corpo basal do zoósporo.
- *B. emersonii* possui pelo menos dois genes que codificam quinases dependentes de ciclina putativas (BeCdk1 e BeCdk2), semelhantes a Cdk1 e Cdk2 de outros eucariotos, respectivamente, sendo que em fungos apenas uma quinase (Cdk1) tem sido descrita com diretamente envolvida no controle do ciclo celular. Ambos genes apresentam expressão diferencial durante a esporulação, e contêm variações na hélice PSTAIRE (PSTSLRE em BeCdk1 e PATALRE em BeCdk2).
- O gene Becdk1 é provavelmente regulado tanto transcricionalmente como pós-transcricionalmente visto que a variação nos níveis da proteína não acompanharam a

variação nos níveis do seu mRNA. A proteína BeCdk1 foi imunolocalizada no núcleo e no capacete nuclear no zoósporo, o que está de acordo com o observado em outros eucariotos.

- Os genes das Cdks putativas de *B. emersonii* parecem estar mais próximos de algumas das isoformas descritas em plantas que apresentaram regulação transcricional dos genes e variações no motivo PSTAIRE .
- O gene Bemst que codifica um transportador putativo de hexose apresentou expressão diferencial durante a esporulação. A presença de glicose (2%), que inibe apenas parcialmente a esporulação, não mudou o padrão de expressão de Bemst. Por sua vez, a manose (0,1%), que inibe totalmente a esporulação, modificou o padrão de expressão de Bemst. Entretanto, como o triptofano, que também bloqueia a esporulação, produziu o mesmo efeito sobre Bemst, conclui-se que a mudança no perfil de expressão é conseqüência da inibição da esporulação.

8) BIBLIOGRAFIA

Adams M.D., Kelly 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.

Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fleischmann, R. D., Fuldner, R. A., Bult, C. J., Lee, N. H., Kirkness, E. F., Weinstock, K. G., Gocayne, J. D., White, O., *et al.* 1995 Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* **377**(6547 Suppl): 3-174.

Ahrazem, O., Prieto, A., Gomez-Miranda, B., Bernabe, M., & Leal, J. A. 2001. Comparison of cell-wall polysaccharydes form Nectria cinnabarina with those from the group of Nectria withy Sesquicillium anamorphs. *Microbiology* **147** (7): 1839-49.

Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., & Blackwell M. 1996. *Introductory mycology.* John Wiley & Sons, New York, 869 pp.

Altschul, S. F., Gish, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**(3): 403-410.

Araki M, Masutani C, Takemura M, Uchida A, Sugasawa K, Kondoh J, Ohkuma Y, Hanaoka F. 2001. Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol Chem.* **276**(22):18665-72.

Arlot-Bonnemains, Y. & Prigent, C. 2002. A trigger for centrosome duplication. *Science* **295**: 455-456.

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.

Balasubramanian, M. K., McCollum, D., Surana, U. 2000. Tying the knot: linking cytokinesis to the nuclear cycle. *J. Cell Sc.* **113**: 1503-1513.

Barker, L., Kuhn, C., Weise, A., Schulz, A., Gebhardt, C., Hirner, B., Hellmann, H., Schulze, W., Ward, J. M., & Frommer WB. 2000. SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant cell* **12** (7): 1153-64.

Baum, P., Furlong, C., & Byers, B. 1986. Yeast gene required for spindle pole body duplication: homology of its product with Ca2+-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**(15): 5512-6.

Beach, D., Durkacz, B., & Nurse, P. 1982. Functionally homologues cell cycle controls genes in budding and fission yeast. *Nature* **400**: 706-709.

Behrens, M. M., & Maia, J. C. C. 1986. Differentiation-specific activation of cyclic AMP-dependent protein quinase in *Blastocladiella emersonii*. *Biochem. Intern.* **12**: 503-512.

Blackman, L. M., Harper, J. D., & Overall, R. L. 1999. Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur. J. Cell Biol.* **78**(5):297-304.

Boles, E., & Hollenberg, C. P. 1997. The molecular genetics of hexose transport in yeast. *FEMS Microbiol. Reviews* **21**: 85-111.

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., & Juliani, M.H. 1987. Differential expression of heat-shock proteins and spontaneuous synthesis of HSP70 during the life cycle of *Blastocladiella emersonii*. *Eur. J. Biochem.* **163**: 211-220.

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., *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.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* **7**(72): 248-54.

Brandenberger, R.. Wei, H.. Zhang, S., Lei, S., Murage, J., Fisk, G.J., Li, Y., Xu, C., Fang, R., Guegler, K., Rao, M.S., Mandalam, R., Lebkowski, J., & Stanton, L.W. 2004. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol.* **22**(6):707-16.

Braun, E. L., Halpern, A. L., Nelson, M. A., & Natvig, D. O. 2000. Large-scale comparison of fungal sequence information: mechanisms of innovation in *Neurospora crassa* and gene loss in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Res.* **10**: 416-430.

Brentani, H., Caballero, O.L., Camargo, A.A., *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.

Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K., & Nurse, P. 1991. Involvement of $p34^{cdc2}$ in establishing the dependency of S phase on mitosis. *Nature* **349**: 388-393.

Camargo, A. A., Samaia, H. P., Dias-Neto, E., Simão, D. F., Migotto, I. A., Briones, M. R., Costa, F. F., Nagai, M. A., Verjovski-Almeida, S., Zago, M. A., *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. 1951. Metabolism and morphogenesis in a new Blastocladiella. *A. v. Leeuwenhoek* **17**: 325-362.

Cantino, E. C., & Hyatt, M. T. 1953. Phenotypic "sex" determination in the life history of a new species of *Blastocladiella, B. emersonii* . *A. v. Leeuwenhoek* **19**: 25-70.

Cantino, E. C., Lovett, J. S., Leak, L. V., & Lythgoe, J. 1963. The single mitochondrion, fine structure, and germination of the spore of *Blastocladiella emersonii. J. Gen. Microbiol.* **31**: 393-404.

Carninci, P., Waki, K., Shiraki, T., Konno, H., Shibata, K., Itoh, M., Aizawa, K., Arakawa, T., Ishii, Y., Sasaki, D., *et al.* 2003. Targeting a complex transcriptome: the construction of the mouse full-length cDNA encyclopedia. *Genome Res.* **13**(6B):1273-89.

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.

Correa, J. L., Lemos, E. M., & Lodi, W. R. 1978. Inhibition of sporulation in the water mold *Blastocladiella emersonii* by antipain. *Dev. Biol.* **66**: 470-479.

Correa, L. C., & Lodi, W. R. 1986. Induction of sporulation in *Blastocladiella emersonii*: Influence of nutritional variables. *Exp. Mycol.* **10**: 270-280.

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.

Damagnez, V., & Cottarel, G. 1996. *Candida albicans* CDK1 and CYB1: cDNA homologues of the cdc2/CDC28 and cdc13/CLB1/CLB2 cell cycle control genes. *Gene* **172**(1):137-41.

de Oliveira, J. C., Borges, A. C., Marques, M. 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.* **219**: 555-562.

de 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.* **1383**: 183-187.

Decottignies, A., Zarzov, P., Nurse, P. 2001. In vivo localisation of fission yeast cyclin-dependent kinase cdc2p and cyclin B cdc13p during mitosis and meiosis. *J. Cell Sci.* **114**(14): 2627-40.

Dias Neto, E., Correa, R. G., Verjovski-Almeida, S., Briones, M. R., Nagai, M. A., da Silva, W. Jr., Zago, M. A., Bordin, S., Costa, F. F., Goldman, G. H., *et al.* 2000. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000 **97**(7):3491-6.

Diatchenko, L., Lukyanov, S., Lau, Y. F., Siebert, P. D. 1999. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol.* **303**: 349-80.

Duncan, C. J., Pugh, N., Pasco, D. S., & Ross, S. A. 2002. Isolation of a galactomannan that enhances macrophage activation from the edible fungus *Morchella esculenta*. *J. Agric. Food Chem.* **50**(20): 5683-5685.

Errabolu, R., Sanders, M. A., & Salisbury, J. L. 1994. Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J. Cell Sci.* **107**(1): 9-16.

Etchebehere, L. C., Simon, M. N., Campanha, R. B., Zapella, P. D., Veron, M., & Maia, J. C. C. 1993. Developmental regulation of hexosamine biosynthesis by protein phosphatases 2A and 2C in *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.* **175**(16): 5022-7.

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.

Ewing, R. M., Kahla, A. B., Poirot, O., Lopez, F., Audic, S., & Claverie, J. M. 1999. Large-scale statistical analyses of rice ESTs reveal correlated patterns of gene expression. *Genome Res.* **9**: 950-959.

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.* **137**(1):266-7.

Felipe, M. S. S., Andrade, R. V., Petrofeza, S. S., Maranhao, A. Q., Torres, F. A., Albuquerque, P., Arraes, F. B., Arruda, M., Azevedo, M. O., Baptista, A. J., *et al.* 2003. Transcriptome characterization of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* by EST analysis. *Yeast* **20**: 263-271.

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

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. **1576**: 59-69.

Fischer, T., Rodriguez-Navarro, S., Pereira, G., Racz, A., Schiebel, E., & Hurt, E. 2004. Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat. Cell Biol.* **6**(9):840-8.

Fobert, P. R., Gaudin, V., Lunness, Coen, E., & Doonan, J. H. 1996. Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**: 1465-1476.

Forster, H., Coffey, M. D., Elwood, H., & Sogin, M. L. 1990. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia* **82**: 306-312.

Frank, W., Ratnadewi, D., & Reski, R. 2004. *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. *Planta.* Aug 18, http://springerlink.metapress.com/.

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.

Gavet, O., Alvarez, C., Gaspar, P., & Bornens, M. 2003. Centrin4p, a novel mammalian centrin specifically expressed in ciliated cells. *Mol. Biol. Cell* **14**(5): 1818-1834.

Geier, B. M., Wiech, H., & Schiebel, E. 1996. Binding of centrins and yeast calmodulin to synthetic peptides corresponding to binding sites in the spindle pole body components Kar1p and Spc110p. *J Biol Chem.* **271**(45): 28366-74.

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., *et al.* 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, 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.

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

Graham, I. A., Denby, K. J., Leaver, C. J. 1994. Carbon catabolite repression regulates glyoxylate cycle expression in cucumber. *Plant Cell* **6**: 761-772.

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

Harris, G. C., Gibbs, P. B., Ludwig, G., Un, A., Sprengnether, M., Kolodny, N. 1986. Mannose metabolism in corn and its impact on leaf metabolites, photosynthetic gas exchange, and chlorophyll fluorescence. *Plant Physiol.* **82**: 1081-1089.

Harris, S. D., Kraus, P. R. 1998. Regulation of septum formation in *Aspergillus nidulans* by a DNA damage checkpoint pathway. *Genetics.* **148**(3):1055-67.

Heckman, D. S., D. M. Geiser, B. R. Eidell, R. L. Stauffer, N. L. Kardos, and S. B. Hedges. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. Science **293**: 1129-1133.

Heese, M., Mayer, U., Jurgens, G. 1998. Cytokinesis in flowering plants: cellular process and developmental integration. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1** (6): 486-91.

Hillier, L. D., Lennon, G., Becker, M., Bonaldo, M. F., Chiapelli, B., Chissoe, S., Dietrich, N., DuBuque, T., Favello, A., Gish, W., *et al.* 1996. Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags. *Genome Res.* **6**(9):807-28.

Huang, X., & Madan, A. 1999. CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **9**: 868-877.

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.

Iranfar, N., Fuller, D., & Loomis, W. F. 2003. Genome-wide expression analyses of gene regulation during early development of *Dictyostelium discoideum. Eukaryot Cell.* **2**(4):664-70.

Ivanovska, I., & Rose, M. D. 2001. Fine structure analysis of the yeast centrin, Cdc31p, identifies residues specific for cell morphology and spindle pole body duplication. *Genetics* **157**: 503-518.

Jaworski, A. J., & Stumhofer, P. 1981. Stage-specific synthesis of proteins complexed to ribonucleoprotein particles and ribosomes in zoospores of *Blastocladiella emersonii. Mol. Cel. Biol.* **1**(4): 310-320.

Jaworski, A. J., & Stumhofer, P. 1984. Dormant ribosomes in *Blastocladiella emersonii* zoospores are arrested at elongation. *Exp. Mycol.* **8**: 13-24.

Jaworski, A. J., & Thomson, K. 1980. A temporal analysis of the synthesis of the mRNA sequestered in zoospores of Fungi. *Genet. Biol.* **21**: 348-363.

Jaworski, A. J., & Wilson, J. B. 1989. Decreased activity of *Blastocladiella emersonii* zoospore ribosomes: correlation with developmental changes in ribosome-associated proteins. *Dev. Biol.* **135**: 340-348.

Jigami, Y., & Odani, T. 1999. Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochim. Biophys. Acta* **1426** (2): 335-45.

John, P. C. L., Sek, F. J., Lee, M. G. 1989. A homologue of the cell cycle control protein $p34^{cdc2}$ participates in the cell division cycle of *Chlamydomonas* and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1**: 1185-1193.

Kamoun, S., Kraber, P., Sobral, B., Nuss, D., & Govers, F. 1999. Initial assessment of gene diversity for the comycete pathogen *Phytophtora infestants* based on expressed sequences. *Fung. Genet. Biol.* **28**: 94-106.

Kappe, S. H., Gardner, M. J., Brown, S. M., Ross, J., Matuschewski, K., Ribeiro, J. M., Adams, J. H., Quackenbush, J., Cho, J., Carucci, D. J., *et al.* 2001. Exploring the

transcriptome of the malaria sporozoite stage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**(17):9895-900.

Khondkar, P., Aidoo, K. E., & Tester, R. F. 2002. Sugar profile of extracellular polysaccharides from different *Tremella* species. *Int. J. Food Microbiol.* **79**(1-2): 121-9.

Kilmartin, J. V. 2003. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J. Cell Biol.* **162**(7):1211-21.

Kim, S., Ahn, I. P., & Lee, Y. H. 2001. Analysis of genes expressed during rice-*Magnaporthe grisea* interactions. *Mol. Plant, Microbe Interact.* **14**(11):1340-6.

Klink, V. P., & Wolniak, S. M. 2001. Centrin is necessary for the formation of the motile apparatus in spermatids of *Marsilea. Mol Biol Cell.* **12**(3):761-76.

Kropf, D. L. & Harold, F. M. 1982. Selective transport of nutrients via the rhizoids of the water mold *Blastocladiella emersonii. J. Bacteriol.* **151**(1): 429-437.

Kumar S., Tamura, K., Jakobsen, I. B., & Nei, M. 2001. MEGA 2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software. *Bioinformatics* **17**: 1244-1245.

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

Laoukili, J., Perret, E., Middendorp, S., Houcine, O., Guennou, C., Marano, F., Bornens, M., & Tournier, F. 2000. Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. **J. Cell Sci. 113**(8):1355-64.

Lee, S. H., Kim, B. G., Kim, K. J., Lee, J. S., Yun, D. W., Hahn, J. H., Kim, G. H., Lee, K. H., Suh, D. S., Kwon, S. T., Lee, C. S., Yoo, Y. B. 2002. Comparative analysis of sequences expressed during the liquid-cultured mycelia and fruit body stages of *Pleurotus ostreatus. Fungal Genet Biol.* **35**(2):115-34.

Lessie, P. E. & Lovett, J. S. 1968. Ultrastructural changes during sporangium formation and zoospore differentiation in Blastocladiella emersonii. *Amer. J. Bot.* **55**(2): 220-236.

Li, R., Rimmer, R., Buchwaldt, L., Sharpe, A. G., Seguin-Swartz, G., Coutu, C., & Hegedus, D. D. .2004. Interaction of *Sclerotinia sclerotiorum* with a resistant *Brassica napus* cultivar: expressed sequence tag analysis identifies genes associated with fungal pathogenesis. *Fungal Genet Biol.* **41**(8): 735-53.

Liang, F., Holt, I., Pertea, G., Karamycheva, S., Salzberg, S. L., & Quackenbush, J. 2000. An optimized protocol for analysis of EST sequences. *Nucleic Acids Res.* **28**(18):3657-65.

Lima, A. A. *Organização dos microfilamentos e microtúbulos durante o desenvolvimento da Blastocladiella emersonii.* Tesis de doutorado, Ribeirão Preto, 1999, 98 pp.

BIBLIOTECA
INSTITUTO DE QUÍMICA
Universidade de São Paulo

Lodi, W. R., & Sonneborn, S. 1974. Protein degradation and protease activity during the late cycle of *Blastocladiella emersonii. J. Bacteriol.* **117**(3): 1035-1042.

Lovett, J. S. 1968. Reactivation of ribonucleic acid and protein synthesis during germination of Blastocladiella zoospores and the role of the ribosomal nuclear cap. *J. Bacteriol.* **96**: 962-969.

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.

Lutz, W., Lingle, W. L., McCormick, D., Greenwood, T. M., & Salisbury, J. L. 2001. Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J. Biol. Chem.* **276**(23): 20774-20780.

Madeddu, L., Klotz, C., Le Caer, J. P., Beisson, J. 1996. Characterization of centrin genes in *Paramecium. Eur J Biochem.* **238**(1):121-8.

Madi, L., Mc Bride, S. A., Bailey, L. A., & Ebbole, D. J. 1997. *rco-3*, a gene involved in glucose transport and conidiation in *Neurospora crassa. Genetics* **146**: 499-508.
dependent response. *EMBO J.* **21** (22): 6162-6173.

Magyar, Z., Mészàros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C., Dudits, D. 1997. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**: 223- 235.

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

Marques, M. 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.* **267**: 17201-17207.

Marques, M. V., Borges, A. C., de Oliveira, J. C., & Gomes, S. L. 1992. Coordinate pretranslational control of cAMP-dependent protein kinase subunit expression during development in the water mold *Blastocladiella emersonii. Dev.Biol.* **149**(2): 432-9.

Marsden, B. J., Shaw, G. S., Sykes, B. D. 1990. Calcium binding proteins. Elucidating the contributions to calcium affinity from an analysis of species variants and peptide fragments. *Biochem. Cell Biol.* **68**: 587-601.

Martindale VE, Salisbury JL. 1990. Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to changes in the external milieu. J. Cell Sci. **96** (3): 395-402.

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.

McFadden, D. C., & Casadevall, A. 2001. Capsule and melanin synthesis em Cryptococcus neoformans. *Med. Mycol.* **39** (S1): 19-30.

McFadden, G. I., Schulze, D., Surek, B., Salisbury, J. L., Melkonian, M. 1987. Basal body reorientation mediated by a Ca2+-modulated contractile protein. *J. Cell Biol.* **105**(2):903-12.

Meng, T. C., Aley, S. B., Svard, S. G., Smith, M. W., Huang, B., Kim, J., Gillin, F. D. 1996. Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote Giardia lamblia. *Mol Biochem Parasitol.* **79**(1):103-8.

Mews, M., Sek, F. J., Moore, R., Volkmann, D., Gunning, B. E. S., John, P. C. L. 1997. Mitotic cyclin distribution during maize cell division: implications for the sequence diversity and function of cyclins in plants. *Protoplasma* **200**: 128-145.

Middendorp, S., Kuntziger, T., Abraham, Y., Holmes, S., Bordes, N., Paintrand, M., Paoletti, A., & Bornens, M. 2000. A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J. Cell Biol.* **148**(3): 405-16.

Middendorp, S., Paoletti, A., Schiebel, E., Bornens, M. 1997. Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 9141-9146.

Mironov, V., De Veylder, L., Van Montagu, M., & Inzé, D. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell* **11**: 509-521.

Moncrief, N. D., Kretsinger, R. H., Goodman, M. 1990. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J. Mol. Evol.* **30**(6):522-62.

Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W. H., Hwang, I., Jones, T., Sheen, J. 2003. Role of the *Arabidopsis* glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **300**: 332-336.

Moore, D. 1981. Effects of hexose analogues on fungi: mechanisms of inhibition and of resistance. *New Phytologist* 487-515.

Moreau, J. L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J. C., Peaucellier, G., Picard, A., & Geneviere, A. M. 1998. Cdk2 activitry is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the Sea Urchin Early embryo. *Develop. biol.* **200**(2): 182-197.

Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**: 261-291.

Moser, B. A., & Russell, P. 2000. Cell cycle regulation in Schizosaccharomyces pombe. *Current Opinion in Microbiol.* **3**: 631-636.

Mosley, A. L., Lakshmanan, J., Aryal, B. K., & Ozcan, S. 2003. Glucose-mediated phosphorylation converts the transcription factor Rgt1 from a repressor to an activator. *J. Biol. Chem* **278**(12): 10322-7.

Nakayama, S., Moncrief, N. D., & Kretsinger, R. H. 1992. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *J. Mol. Evol.* **34**(5):416-48.

Nanninga, N. 2001. Cytokinesis in prokaryotes and eukaryotes: common principles and different solutions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**(2):319-33.

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., *et al.* 1997. Expressed sequences from conidial, mycelial, and sexual stages of *Neurospora crassa*. *Fung. Genet Biol.* **21**: 348-363.

Newcomb, L. L., Diderich, J. A., Slattery, M. G., & Heideman, W. 2003. Glucose regulation of Saccharomyces cerevisiae cell cycle genes. *Eucaryotic cell* **2**(1): 143-149.

Newman, T., de Bruijn, F. J., Green, P., Keegstra, K., Kende, H., McIntosh, L., Ohlrogge, J., Raikhel, N., Somerville, S., Thomashow, M., *et al.* 1994. Genes galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol.* **106**(4):1241-55.

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.

Nurse, P. 1990. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**: 503-508.

Nurse, P., & Bissett, Y. 1981. Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**(5823):558-60.

Ogawa, K., & Shimizu, T. 1993. cDNA sequence for mouse caltractin. *Biochim Biophys Acta.* ***1216***(1):126-8.

Osmani, A. H., McGuire, S. L., & Osmani, S. A. 1991. Parallel activation of the NIMA and

p34^{cdc2} cell cycle-regulated protein kinases is required to initiate mitosis in *A. nidulans*. *Cell* **67**: 283-291.

Paoletti, A., Bordes, N., Haddad, R., Schwartz, C. L., Chang, F., & Bornens, M. 2003. Fission yeast cdc31p is a component of the half-bridge and controls SPB duplication. *Mol Biol Cell.* **14**(7):2793-808.

Paoletti, A., Moudjou, M., Paintrans, M., Salisbury, J. L., & Bornens M. 1996. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J. Cell Sci.* **109**: 3089-3102.

Paquola, A., Nishiyama, M. Jr., Reis, E. M., da Silva, A. M. & Verjovski-Almeida, S. . 2003. ESTWeb: bioinformatics services for EST sequencing projects. Bioinformatics **19**: 1587-1588.

Pego, J. V., Weisbeek, P. J., & Smeekens, S. C. M. 1999. Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol.* **119**: 1017-1023.

Peralta, R., & Lodi, W. R. 1988. An analysis of developmental timing in *Blastocladiella emersonii* sporulation. *Dev. Biol.* **128**: 78-85.

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.

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.

Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J. P., Segers, G., De Veylder, L., De Pinho Barrôco, R., Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., & Mironov, V. 2001. A plant-specific cyclin-dependent kinase is involved in the control of G_2/M progression in plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 36354-36360.

Porcel, B. M., Tran, A. N., Tammi, M., Nyarady, Z., Rydaker, M., Urmenyi, T. P., Rondinelli, E., Pettersson, U., Andersson, B., Aslund, L. 2000. Gene survey of the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi. Genome Res.* **10** (8): 1103-7.

Powell, M. J. 1993. Looking at micology with a janus face: a glimpse at chytridiomycetes active in the environment. Mycologia **85**: 1-20.

Price, D. H. 2000. P-TEF^{b}, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell Biol.* **20**: 2629-2634.

Pulvermuller, A., Giessl, A., Heck, M., Wottrich, R., Schmitt, A., Ernst, O. P., Choe, H. W., Hofmann, K. P., & Wolfrum, U. 2002. Calcium-dependent assembly of centrin-G-protein complex in photoreceptor cells. *Mol. Cell Biol.* **22**(7):2194-203.

Putta, S., Smith, J. J., Walker, J. A., Rondet, M., Weisrock, D. W., Monaghan, J., Samuels, A. K., Kump, K., King, D. C., Maness, N. J., *et al.* 2004. From biomedicine to natural history research: EST resources for ambystomatid salamanders. *BMC Genomics* **5**(1):54.

Ribichich, K. F., Salem-Izacc, S. M., Georg, R. C., Vêncio, R. Z. N., Navarro, L. D., Gomes, S. L. Gene discovery and expression profile analysis through EST sequencing from different developmental stages of the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii. Submetido.*

Rocha, C. R. C., & 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.* **15**: 3967-3972.

Rocha, C. R. C., & 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**: 4257-4265.

Rolland, F., Winderickx, J., & Thevelein, J. M. 2001. Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells. *Trends Biochem. Sci.* **26**(5): 310-317.

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.

Rubin-Bejerano, I., Sagee, S., Friedman, O., Pnueli, L., & Kassir, Y. 2004. The in vivo activity of Ime1, the key transcriptional activator of meiosis-specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is inhibited by the cyclic AMP/protein kinase A signal pathway through the glycogen synthase kinase 3-beta homolog Rim11. *Mol Cell Biol.* **24**(16): 6967-79.

Sacadura, N. T., & Saville, B. J. 2003. Gene expression and EST analyses of *Ustilago maydis* germinating teliospores. *Fungal Genet. Biol.* **40**(1): 47-64.

Saitou, N., & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.

Salisbury JL, Sanders MA, & Harpst L. 1987. Flagellar root contraction and nuclear movement during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii. J. Cell Biol.* **105**(4):1799-805.

Salisbury, J. L. 2004. Centrosomes: Sfi1p and centrin unravel a structural riddle. *Curr Biol.* **14**(1):R27-9.

Salisbury, J. L., Baron, A. T., & Sanders, M. A. 1988. The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: distribution in interphase and mitotic cells. *J. Cell Biol.* **107**(2):635-41.

Salisbury, J. L., Baron, A., Surek, B., Melkonian, M. 1984. Striated flagellar roots: isolation and partial characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J. Cell Biol.* **99**(3):962-

70.

Salisbury, J. L., Suino, K. M., Busby, R., Springett, M. 2002. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol.* **12**(15):1287-92.

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

Sanders, M. A., & Salisbury, J. L. 1989. Centrin-mediated microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii. J. Cell Biol.* **108**(5):1751-60.

Sanders, M. A., & Salisbury, J. L. 1994. Centrin plays and essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii. J. Cell Biol.* **124**(5): 795-805.

Santori, M. I., Laría, S., Gómez, E. B., Espinosa, I., Galanti, N., & Téllez-Iñón MT. 2002. Evidence for CRK3 participation in the cell division cycle of *Trypanosoma cruzi. Mol. Biol. Parasitol.* **121**: 225-232.

Sauer, K., Weigmann, K., Sigrist, S., Lehner, C. F. 1996. Novel members of the cdc2-related kinase family in Drosophila: cdk4/6, cdk5, PFTAIRE, and PITSLRE kinase. *Mol Biol Cell.* **7**(11):1759-69.

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.

Schiebel, E., & Bornens, M. 1995. In search of a function for centrins. *Trends Cell Biol.* **5**(5):197-201.

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.

Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., de Almeida Engler, J., Jacqmard, A., Van Montagu, M., & Inze D. 1996. The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene cdc2bAt is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant J.* **10**(4):601-12.

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.

Shenhar, G., & Kassir, Y. 2001. A positive regulator of mitosis, Sok2, functions as a negative regulator of meiosis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Cell Biol.* **21**(5):1603-12.

Sherr, C. J. 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274 (5293): 1672-1677.

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**(4): 263-274.

Silva, A. M., Maia, J. C. C., & Juliani, M. H. 1987. Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in *Blastocladiella emersonii. J. of Bacteriol.* **169**(5): 2069-2078.

Simão, R. de C. G., & Gomes, S. L. 2001. Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii. J. Bacteriol.* **183**(7): 72280–2288.

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.

Soares, M. B., Bonaldo, M. F., Jelene, P., Su, L., Lawton, L., & Efstratiadis, A. 1994. Construction and characterization of a normalized cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **91**(20):9228-32.

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.

Soll, D. R. & Sonneborn, D. R. 1971a. Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. Cell differentiation without protein synthesis?. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **68**: 459-463.

Soll, D. R. & Sonneborn, D. R. 1971b. Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. III. Structural changes in relation to proteun and RNA synthesis. *J. Cell Sci.* **9**: 315-333.

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.

Sorrell, D. A., Menges, M., Healy, J. M., Deveaux, Y., Amano, C., Su, Y., Nakagami, H., Shinmyo, A., Doonan, J. H., Sekine, M., & Murray, J. A. 2001. Cell cycle regulation of cyclin-dependent kinases in tobacco cultivar Bright Yellow-2 cells. *Plant Physiol.* **126**(3):1214-23.

Spang, A., Courtney, I., Fackler, U., Matzner, M., & Schiebel, E. 1993. The calcium-binding protein cell division cycle 31 of Saccharomyces cerevisiae is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J. Cell Biol.* **123**(2):405-16.

Stefani, R. M., & 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.

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., *et al.* 2004. A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**(38):13951-6.

Sterky, F., Regan, S., Karlsson, J., Hertzberg, M., Rohde, A., Holmberg, A., Amini, B., Bhalerao, R., Larsson, M., Villarroel, R., *et al.* 1998. Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13330-13335.

Taillon, B. E., Adler, S. A., Suhan, J. P., & Jarvik, J. W. 1992. Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas. J. Cell Biol.* **119**(6):1613-24.

Takeo, K., Ogura, Y., Virtudazo, E., Raclavsky, V., & Kawamoto, S. 2004. Isolation of a *CDC28* homologue from *Cryptococcus neoformans* that is able to complement *cdc28* temperature-sensitive mutants of *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Yeast Res.* **4**: 737-744.

Tavazoie, S., Hughes, J. D., Campbell, M. J., Cho, R. J., & Church, G. M. 1999. Systematic determination of genetic network architecture. *Nat Genet.* **22**(3):281-5.

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

The Gene Ontology Consortium. 2001. Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome Res.* **11**: 1425-1433.

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.

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.

Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocelulose sheets: procedures and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.

Trail, F., Xu, J. R., San Miguel, P., Halgren, R. G., & Kistler, H. C. 2003. Analysis of expressed sequence tags from *Gibberella zeae* (anamorph *Fusarium graminearum*). *Fungal Genet. Biol.* 2003 **38**(2):187-97.

Tsai, C. W., & Wolniak, S. M. 2001. Cell cycle arrest allows centrin translation but not basal body formation during spermiogenesis in *Marsilea. J. Cell Sci.* **114**(Pt 23): 4265-72.

Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M., & Morgan, D. O. 2003. Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* **23**: 425(6960): 859-64.

Umeda, M., Umeda-Hara, C., Yamaguchi, M., Hashimoto, J., & Uchimiya, H. 1999. Differential expression of genes for cyclin-dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiol.* **119**(1):31-40.

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.

Van Brunt, J. & Harold, F. M. 1980. Ionic control of germination of Blastocladiella emersonii zoospores. *J. Bacteriol.* **141**(2): 735-744.

Van der Auwera, G., and R. De Wachter. 1996. Large-subunit rRNA sequence of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, and implications for the evolution of zoosporic fungi. J. Mol. Evol. **43**: 476-83.

Vaulont, S., Vasseur-Cognet, M., & Kahn, A. 2000. Glucose regulation of gene transcription. *J. Biol. Chem.* **275** (41): 31555-31558.

Vêncio, R. Z. N., Brentani, H., & Pereira, C. A. B. 2003. Using credibility intervals instead of hypothesis tests in SAGE analyses. *Bioinformatics* **19**: 2461-2464.

Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A., Guimaraes, P. E., Ojopi, E. P., Paquola, A. C., Piazza, J. P., Nishiyama, M. Y. Jr,, Kitajima, J. P., Adamson, R. E., *et al.* 2003. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat. Genet.* **35**(2):148-57.

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., *et al.* 2003. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. *Genome Res.* **13**(12):2725-35.

Waterston, R., Martin, C., Craxton, M., Hunyh, C., Coulson, A., Hillier, L., Durbin, R., Green, P., Shownkeen, R., Halloran, N., *et al.* 1992. A survey of expressed genes in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet.* 1(2):114-123.

Wright, R. L., Salisbury, J., Jarvik, J. W. 1985. A nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas reinhardtii* that may function in basal body localization or segregation. *J. Cell Biol.* **101**(5 Pt 1):1903-12.

Wu, M., Newcomb, L., & Heideman, W. 1999. Regulation of gene expression by glucose in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for ADA2 and ADA3/NGG1. *J. Bacteriol.* **181**: 4755-

4760.

Zhang, H., Xuequin, H., Tang, L., Zhang, Q., Frankel, J., & Berger, J. D. 2002. A cyclin-dependent protein kinase homologue associated with the basal body domains in the ciliate *Tetrahymena thermophila. Biochim. Biophys. Acta* **1591**: 119-128.

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.

Zinke, I., Schütz, C. S., Katzenberg, J. D., Bauer, M., & Pankratz, M. J. 2002. Nutrient control of gene expression in Drosophila: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* **21** (22): 6162-6173.