ALINE MARIA DA SILVA

EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DURANTE O
DESENVOLVIMENTO E NA RESPOSTA AO CHOQUE
TÉRMICO EM *Blastocladiella emersonii*

Tese de Doutorado apresentada ao
Departamento de Bioquímica, Instituto
de Química, Universidade de São Paulo

Orientadora:

Dra. MARIA HELENA JULIANI

SÃO PAULO

1987

Aos meus pais, Célia e
Wanderley, porque me ensinaram
que "...é preciso ter força
 é preciso ter raça
 é preciso ter manha
 é preciso ter graça
é preciso ter sonho sempre..."

(M. Nascimento e F. Brant)

Agradeço à Dra. Maria Helena Juliani pela segurança e dedicação com que desempenhou seu papel de orientadora e, principalmente, pelo incentivo amizade tão constantes nestes quatro anos de convívio.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Maria Christina M. Bonato, que participou, direta e intensamente (aqui ou lá na UFPb), dos estudos sobre a resposta ao choque térmico apresentados nesta tese, agradeço pelas estimulantes discussões envolvendo "desde a bactéria até o homem".

A Dra. Suely Lopes Gomes, pela ajuda com as imunoprecipitações e "Northern blots" e, também, pela revisão minuciosa do manuscrito desta tese.

Ao Dr. José Carlos da Costa Maia, pelo apoio e sugestões, científicas ou não, durante a realização deste trabalho e também pela leitura crítica do manuscrito.

Ao J. Janduí da Costa Araújo, estudante da UFPb que sob orientação da Dra. M.C.M. Bonato, realizou vários experimentos sobre a sobrevivência celular após indução de termotolerância.

A Lilian C. Etchebehere, Marilis do Vale Marques, Maria Margarita Behrens, Marcelo Avedissian, Marcelo Briones, Gláucia M. Souza, Fátima P.R. de Melo, Dr. Bayardo B. Torres e Dra. Lélia Mennucci, pela agradável convivência e pelas divertidas conversas.

A Maria Alves e ao Mário Lopes, pelo eficiente auxílio técnico. A Marli Cunha da Silva, pelo cuidado com a limpeza do material e principalmente pelos bons conselhos.

Aos Drs. Cecilia L.S. Santos e Ricardo R. Brentani pelo fornecimento do lisado de reticulócitos e ao Dr. Samuel Goldenberg pela ajuda nos experimentos iniciais de tradução "in vitro".

A Dra. Maria Júlia Manso Alves pela orientação no estabelecimento da técnica de "immunoblotting" bem como pela colaboração na nossa tentativa de obtenção de anticorpo contra Hsp70.

A Dra. Annamaria S. Stolf por ter colocado o seu laboratório a nossa disposição quando fizemos nossa primeira detecção imunoenzimática.

A Margareth L.C. Guimarães, pela boa vontade com que nos ajudou a imunizar os coelhos. Afinal nós tentamos, os coelhos é que foram os culpados...

Ao Dr. J. Daniel Lopes por ter nos cedido o anticorpo anti-IgG de rato e à Glaucia S. Paranhos pela gentileza em nos ceder anticorpo anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase além do reagente diaminobenzidina.

Ao Juan J. Lafaille por ter conseguido anticorpo anti-IgG de camundongo e ao Dr. Renato Mortara por ter nos cedido actina purificada.

Um agradecimento especial aos Drs. C.P. Georgopoulos, S. Lindquist e E. A. Craig que gentilmente atenderam nosso pedido enviando os anticorpos anti-DnaK, anti-Hsp70 e o plasmídeo B8, respectivamente.

Ao Onofre Custodio da Silva, mais conhecido como Célio fotógrafo, pela paciência com que "documentou" nossos preciosos resultados.

Ao Leonardo Van Halsema por ter me ensinado a operar o microcomputador facilitando assim meu propósito de "bater a tese no computador".

Ao Dr. Isaias Raw por permitir que eu terminasse a tese sem ter que me preocupar, por hora, com o meu novo e futuro compromisso com o Laboratório Especial de Biotecnologia do Instituto Butantan, onde fui recentemente contratada no cargo de Pesquisador Científico.

Aos professores e colegas do Departamento de Bioquímica, em especial ao pessoal do 12, pelas diversas sugestões, pelas cervejas quando possível e sobretudo pela convivência dialética nesses corredores.

Ao Armando M. Ventura, por tudo e mais um pouco, mas principalmente porque me mostrou essa alternativa profissional.

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro da FAPESP, FINEP e CNPq aos Drs. Maria Helena Juliani, Suely Lopes Gomes e José Carlos da Costa Maia. A autora foi bolsista da FAPESP de agosto de 1983 à março de 1987.

INDICE

	pág.
ABREVIATURAS.....	1
RESUMO.....	2
SUMMARY.....	7
I. INTRODUÇÃO.....	11
II. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	41
1. Condições de cultivo e obtenção das células.....	41
1.1. Manutenção das culturas e obtenção dos zoósporos de primeira geração.....	41
1.2. Cultivo em meio líquido PYG-P para obten- ção de grandes quantidades de zoósporos.....	42
1.3. Indução da esporulação e germinação sincrônicas.....	42
1.4. Condições para o tratamento térmico das células.....	45
1.5. Incorporação "in vivo" de [³⁵ S]metionina.....	46
1.6. Incorporação "in vivo" de ³² Pi.....	47
2. Extração das proteínas totais das células para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida....	47
3. Determinação da radioatividade incorporada em proteínas.....	48
4. Extração e purificação de RNA.....	49
4.1. Obtenção de RNA total.....	49
4.2. Purificação de RNA poli(A) ⁺	51
5. Tradução do mRNA em lisado de reticulócitos de coelho.....	52
6. Eletroforese de proteínas em gel de poli- acrilamida contendo SDS.....	53
6.1. Eletroforese unidimensional.....	53
6.2. Eletroforese bidimensional.....	54
7. Procedimento para obtenção de mapa peptídico da Hsp70.....	59
8. Eletroforese de RNA em gel de agarose.....	59
9. Transferência do RNA para filtros de nitrocelulose e hibridização RNA/DNA.....	60
10. Ensaio de imunoprecipitação.....	61

11. Detecção imunológica de proteínas imobilizadas em filtros de nitrocelulose ("immunoblotting").....	63
11.1. Transferência eletroforética de proteínas de géis de poliacrilamida para filtros de nitrocelulose.....	63
11.2. Detecção imunológica das proteínas do "blot".....	63
12. Purificação de tubulina de flagelo de zoósporos.....	65
13. Separação dos derivados fosforilados da proteína ribossomal S6.....	67
13.1. Extração de proteínas ribossomais.....	67
13.2. Eletroforese bidimensional para separação dos derivados fosforilados de S6.....	68
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
1. Análise das variações no padrão de síntese proteica durante a esporulação e germinação em <u>Blastocladiella emersonii</u>	70
1.1. Síntese de proteínas durante a esporulação.....	70
1.1.1. Obtenção das proteínas totais na ausência de proteólise.....	70
1.1.2. Padrão das proteínas sintetizadas "in vivo".....	73
1.1.3. Tradução "in vitro" de RNAs isolados durante a esporulação.....	83
1.1.4. Discussão.....	90
1.2. Síntese de proteínas durante a germinação.....	95
1.2.1. Padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em solução inorgânica.....	97
1.2.2. Padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em meio nutriente AL.....	103
1.2.3. Tradução "in vitro" de RNAs isolados durante a germinação.....	107
1.2.4. Modificações pós-tradução das proteínas de zoósporos durante o início da germinação.....	109
1.2.5. Discussão.....	113
1.3. Identificação de três proteínas cuja síntese é controlada pelo desenvolvimento: actina, α -tubulina e β -tubulina.....	118
1.3.1. Variação no acúmulo de actina, α e β -tubulinas durante o ciclo de vida.....	124
1.3.2. Regulação da síntese de actina, α e β -tubulinas durante a esporulação.....	124
1.3.3. Discussão.....	130

2. A resposta ao choque térmico em <u>Blastocladiella emersonii</u>	135
2.1. Expressão diferencial das proteínas de choque térmico durante o desenvolvimento.....	135
2.2. Confirmação da identidade entre a proteína de 70 kDa induzida espontaneamente na esporulação e a Hsp70.....	150
2.3. Indução de termotolerância durante o desenvolvimento de <u>B. emersonii</u>	156
2.4. Discussão.....	163
3. Efeito do choque térmico na fosforilação da proteína ribossomal S6 de <u>B. emersonii</u>	169
3.1. Discussão.....	179
4. DISCUSSÃO FINAL.....	183
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	195

ABREVIATURAS

cpm	- contagens por minuto
DTT	- ditionotreitól
EDTA	- ácido etilenodiaminotetraacético
EGTA	- ácido etilenoglicol-bis-(β -aminoetil éter) N,N' tetraacético
Hsp	- proteína de choque térmico
IEF/SDS	- eletroforese bidimensional: focalização isoelétrica/ gel de poliacrilamida-SDS
IgG	- imunoglobulina G
kb	- quilobases
kDa	- quilodaltons
MES	- ácido (2-(N-morfolino)etanosulfônico
MOPS	- ácido (3-(N-morfolino)propanosulfônico
NEPHGE/SDS	- eletroforese bidimensional: gradiente de pH de não-equilíbrio/gel de poli- acrilamida-SDS
PMSF	- fluoreto de fenilmetilsulfonila
SDS	- dodecilsulfato de sódio
TCA	- ácido tricloroacético
TEMED	- N,N,N',N'-tetrametil-etilenodiamina
Tris	- Tris-(hidroximetil)-aminometano

RESUMO

Usando incorporação "in vivo" de [35 S]metionina, tradução "in vitro" de RNA e eletroforese bidimensional, iniciamos um estudo do controle da síntese de proteínas durante duas fases distintas de diferenciação celular, a esporulação e a germinação, do fungo Blastocladiella emersonii.

Durante a esporulação ocorre uma intensa variação no padrão de síntese proteica. Foi analisada a síntese de 108 proteínas, sendo verificado que o aumento na síntese de várias proteínas está associado com estágios definidos da esporulação. Um grande número de proteínas básicas é sintetizado exclusivamente no final da esporulação, que corresponde à fase de diferenciação dos zoósporos. Também foram detectadas drásticas variações na população de mRNAs ao longo de toda a esporulação. A síntese de várias proteínas típicas da esporulação parece ser controlada ao nível da transcrição. Além disso a maioria dos RNAs mensageiros específicos da esporulação não é conservada nos zoósporos maduros; o zoósporos contém mRNAs armazenados que provavelmente são sintetizados nos últimos 30 minutos da esporulação.

Durante a transição dos zoósporos a células redondas, que ocorre nos primeiros 25 minutos após a indução da germinação em meio inorgânico, não foram verificadas diferenças qualitativas no padrão de síntese proteica, tanto

na ausência como na presença de actinomicina D, indicando que os eventos precoces da germinação são inteiramente pré-programados pelo mRNA que está armazenado nos zoósporos. Contudo, na germinação tardia são verificadas profundas variações no padrão de síntese proteica. A síntese de algumas dessas proteínas (seis polipeptídios), provavelmente corresponde a uma tradução seletiva de mensagens armazenadas nos zoósporos, enquanto que a maioria das novas proteínas expressas (vinte e dois polipeptídios) corresponde a tradução de novos mRNAs. Assim, durante a germinação dos zoósporos, ocorrem múltiplos níveis de regulação da síntese proteica, envolvendo controles ao nível da tradução e transcrição. Durante o início da germinação também foi observado um controle ao nível de pós-tradução, com várias proteínas dos zoósporos sendo especificamente degradadas ou modificadas. Também analisamos o padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em meio nutriente sendo observada a síntese de polipeptídios específicos desta condição de germinação e crescimento.

Algumas proteínas cuja síntese é controlada pelo desenvolvimento foram identificadas. Utilizando anticorpos monoclonais comerciais contra actina, α e β -tubulinas foi possível identificar estas proteínas no perfil eletroforético de proteínas sintetizadas durante a esporulação. Comparando a cinética da síntese "in vivo" destas proteínas com o acúmulo de seus respectivos mRNAs traduzidos "in vitro", foi possível demonstrar que o intenso

aumento na síntese de actina, α e β -tubulinas que ocorre durante a esporulação apresenta uma correlação temporal com o aumento dos mRNAs correspondentes. Em paralelo ao aumento da síntese destas três proteínas citoesqueléticas pôde ser detectado um aumento dos seus conteúdos em massa. Durante a germinação e crescimento ocorre uma sensível diminuição no conteúdo destas proteínas. Além disso, verificamos que as proteínas identificadas como α e β -tubulinas estão presentes no flagelo dos zoósporos.

Muito interessante foi a observação de que três proteínas sintetizadas durante a esporulação correspondiam aparentemente a três proteínas, Hsp70, Hsp76 e Hsp39a, cuja síntese é induzida pelo choque térmico. Esta verificação decorreu do fato de estarmos investigando se em Blastocladiella a resposta ao choque térmico teria algum controle do desenvolvimento, uma vez que alguns dados da literatura sugeriam o envolvimento de certas proteínas de choque térmico (Hsps) no desenvolvimento normal de alguns organismos.

Em Blastocladiella a resposta ao choque térmico é dependente do estágio do desenvolvimento. Células expostas a temperaturas elevadas nos diferentes estágios do desenvolvimento (esporulação, germinação e crescimento) mostram uma síntese diferencial de proteínas de choque térmico. Conjuntos específicos de Hsps (de um total de 22 Hsps) são induzidos em cada fase, demonstrando uma expressão não coordenada dos genes de choque térmico.

A proteína de 70 kDa, sintetizada espontaneamente durante um certo intervalo da esporulação, apresenta mobilidade eletroforética em géis bidimensionais idêntica à Hsp70. A confirmação da identidade entre estas proteínas foi obtida através de análise dos seus peptídios resultantes de digestão enzimática parcial bem como pelo reconhecimento de ambas as proteínas por anticorpos contra a proteína DnaK (homóloga à Hsp70) de E. coli e contra a proteína Hsp70 de Drosophila. Utilizando tradução "in vitro" de RNA e hibridização de RNA com uma sonda do gene hsp70 de Drosophila, demonstramos que o aumento de síntese da Hsp70 que ocorre durante o choque térmico e espontaneamente durante a esporulação, está associado com a acumulação do mRNA desta proteína.

Embora a síntese de Hsps seja controlada pelo desenvolvimento em Blastocladiella, a aquisição de termotolerância pode ser induzida em qualquer estágio do seu ciclo de vida. A indução da termotolerância em Blastocladiella é dependente da síntese de proteínas e está correlacionada com o aumento da síntese de algumas Hsps: Hsp82a, Hsp82b, Hsp76, Hsp70, Hsp60, Hsp25 e Hsp17b. As outras Hsps parecem não estar envolvidas especificamente com a termotolerância.

As observações anteriores de que o estado de fosforilação da proteína ribossômica S6, em Blastocladiella, varia durante o desenvolvimento e em resposta a alterações do meio ambiente (Bonato et al., 1984, Eur. J. Biochem. 144:

597-606) e a verificação de que a resposta ao choque térmico, em Blastocladiella, também está sob o controle do desenvolvimento proporcionou a oportunidade de verificar se os diferentes níveis de fosforilação de S6 poderiam ser correlacionados com a tradução de mensageiros específicos - isto é, mRNAs normais ou de choque térmico - durante o choque térmico, recuperação do choque térmico e indução de termotolerância nos diferentes estágios do ciclo de vida deste fungo. Assim foi observado que, independente do estado inicial de fosforilação de S6 (máximo ou intermediário), ocorre uma rápida e completa desfosforilação de S6 durante o choque térmico, sendo que a S6 permanece desfosforilada durante a termotolerância. Durante a recuperação do choque térmico, ocorre a refosforilação de S6 para os níveis característicos de cada estágio do desenvolvimento, coincidentemente com a interrupção da síntese de proteínas de choque térmico.

SUMMARY

Using [35 S]methionine pulse labeling, in vitro translation and two-dimensional gel electrophoresis, we investigated the regulation of protein synthesis during two distinct phases of cell differentiation, sporulation and germination, in the aquatic fungus Blastocladiella emersonii.

We have found dramatic changes in the spectrum of proteins synthesized during sporulation. Synthesis of 108 polypeptides was analyzed and a large increase in the synthesis of several proteins is associated with particular stages. A large number of basic proteins are synthesized exclusively during late sporulation. Changes in translatable mRNA species were also detected by in vitro translation of RNA prepared at different stages of sporulation. The synthesis of several proteins during sporulation seems to be transcriptionally controlled. Most of the sporulation-specific messages are not present in the mature zoospores; the zoospores contain stored mRNA, which is apparently synthesized in the last 30 min of sporulation.

We analyzed the pattern of proteins synthesized during zoospore germination in an inorganic solution, in both the presence and absence of actinomycin D. During the transition from zoospore to round cells (the first 25 min), essentially no qualitative differences were noticeable, indicating that the earliest stages of germination are entirely preprogrammed with stored RNA. Later in germination (after

25 min), however, changes in the pattern of protein synthesis were found. Some of these proteins (a total of 6 polypeptides) correspond possibly to a selective translation of stored messages, whereas the majority of the changed proteins (22 polypeptides) corresponds to newly synthesized mRNA. Thus, multiple levels of protein synthesis regulation seem to occur during zoospore germination, involving both transcriptional and translational controls. We also analyzed the pattern of protein synthesis during germination in a nutrient medium; synthesis of specific polypeptides occurred during late germination. During early germination posttranslational control was also observed, several labeled proteins from zoospores being specifically degraded or charge modified.

Some proteins whose expression is developmentally regulated were identified. Actin, α - and β -tubulin have been identified in the two-dimensional pattern of proteins synthesized during sporulation by using well characterized monoclonal antibodies and western blotting. We compared the kinetics of synthesis of these proteins, by pulse-labeling experiments with [35 S]methionine, with the accumulation of their corresponding mRNAs, translated in a cell-free system. Large increases occur in the rates of actin and α - and β -tubulin biosynthesis during sporulation and there is an accumulation of the corresponding mRNAs. In parallel to the increased synthesis, these cytoskeletal proteins accumulate during the late stage of sporulation. During germination and

early growth there is a strong decrease in the level of these proteins. We also verified that α - and β -tubulin are present in flagellar axonemes of zoopores.

Very interesting was the observation that three proteins spontaneously expressed during sporulation correspond possibly to three heat shock-induced proteins (Hsp70, Hsp76, Hsp39a). This fact was noticed when we were investigating the heat shock-response during the development of Blastocladiella.

The heat-shock response in Blastocladiella is dependent on the developmental stage. Cells exposed to elevated temperatures at different stages of life cycle (sporulation, germination or growth) show a differential synthesis of heat-shock proteins (Hsps). Of a total of 22 polypeptides induced, particular subsets of Hsps appear in each phase, demonstrating a non-coordinate heat-shock gene expression.

By the criteria of two-dimensional gel electrophoresis and partial proteolysis mapping, the 70-kDa protein, whose synthesis is induced spontaneously during sporulation, is indistinguishable from the heat-inducible hsp70. Additional evidence in support of the identity between the 70-kDa protein and Hsp70 was provided by immunological cross-reaction of both proteins with antibodies against DnaK protein from E.coli and Hsp70 from Drosophila. The techniques of in vitro translation, and Northern analysis using a Drosophila hsp70 probe, demonstrated that enhanced synthesis of hsp70, which occurs during heat-shock treatment

and spontaneously during sporulation, is associated with an accumulation of Hsp70 mRNA.

Although the Hsps synthesis is developmentally regulated in Blastocladiella, the acquisition of thermotolerance can be induced at any stage of the life cycle. The development of thermotolerance is correlated with the enhanced synthesis of some heat-shock proteins: Hsp82a, Hsp82b, Hsp76, Hsp70, Hsp60, Hsp25, Hsp17b. Other Hsps are not specifically involved in thermotolerance.

In B. emersonii the state of S6 phosphorylation changes depending on the developmental stage and environmental conditions (Bonato et al., 1984, Eur. J. Biochem. 144, 597-606). On the other hand, we verified that the heat-shock response is developmentally regulated. Then, we examined the changes in S6 phosphorylation during heat shock, thermotolerance, and recovery from heat shock at different stages of life cycle in order to investigate whether the different levels of S6 phosphorylation might be correlated with the translation of specific message subsets. We observed that independently of the initial state of S6 phosphorylation (maximal or intermediate), a rapid and complete dephosphorylation of S6 is induced by heat shock and S6 remains unphosphorylated during the acquired thermotolerance. During recovery from heat shock rephosphorylation of S6 occurs always to the levels characteristic of that particular stage, coincidently with the turn off of heat shock protein synthesis.

I. INTRODUÇÃO

Diferenciação celular é uma capacidade inerente a praticamente todas as formas de vida compreendendo desde a simples formação de estruturas subcelulares como flagelo e pili de bactérias até o desenvolvimento de um organismo pluricelular a partir da célula-ovo. O conceito de diferenciação celular implica na existência de um programa genético que envolve a expressão ordenada e seletiva de certos genes e o modo pelo qual os produtos destes genes agem para produzir uma célula com um fenótipo especializado. Flutuações no meio extracelular, que incluem desde sinais químicos transmitidos pelas células até mudanças abruptas nos nutrientes disponíveis, podem também interferir nesse programa de desenvolvimento ou mesmo desencadeá-lo. Uma questão fundamental na biologia do desenvolvimento é a compreensão dos mecanismos de controle que levam à coordenação temporal da expressão dos genes envolvidos neste evento. Na maioria dos sistemas biológicos estudados este controle é exercido predominantemente ao nível de transcrição diferencial dos genes.

Durante a esporulação em Bacillus subtilis são sintetizadas proteínas específicas numa sequência rigorosamente programada, que é aparentemente controlada por uma cascata de diferentes subunidades (fatores sigma) da RNA-polimerase que aparecem em certos momentos da esporulação e que são capazes de redirecionar a

especificidade da holoenzima para diferentes promotores gênicos (Losick e Youngman, 1984). Transcrição diferencial também parece ser o principal mecanismo que regula o acúmulo de mRNAs induzidos pelo desenvolvimento em Dictyostelium discoideum (Chisholm et al., 1984), durante a formação de conídios em Neurospora crassa (Berlin e Yanofski, 1985a) e durante a esporulação em Saccharomyces cerevisiae (Weir-Thompson e Dawes, 1984; Kurtz e Lindquist, 1984).

Outros níveis de controle também parecem ser importantes na regulação da expressão gênica durante o desenvolvimento. Algumas evidências sugerem que a estabilidade diferencial de mRNAs é responsável pela determinação dos níveis citoplasmáticos dos mensageiros específicos de certos estágios do desenvolvimento em D. discoideum (Mangiarotti et al., 1982; Kelly et al., 1985). Este tipo de regulação ocorre durante a expressão diferencial de genes de fotossíntese em Rhodospseudomonas capsulata (Belasco et al., 1985). Durante a formação do corpo de frutificação de Mixococcus xanthus, uma fração da população de mRNAs possui uma vida-média relativamente longa, enquanto outras frações decaem rapidamente (Nelson e Zusman, 1983). Também nos estágios tardios da miogênese e da eritropoiese, certos mRNAs como o da miosina e da globina são preferencialmente mais estáveis (Affara et al., 1980; Volloch e Housman, 1981).

Na fertilização de oócitos de ouriço do mar o aumento na síntese proteica parece ser regulado ao nível da

disponibilidade de mRNAs maternos para a tradução e também ao nível da atividade dos componentes da maquinaria de tradução (Winkler et al., 1985). Contudo este aumento da síntese proteica não é acompanhado por uma variação significativa no padrão das proteínas sintetizadas durante a fertilização (Brandhorst, 1976). Por outro lado, as alterações no padrão de síntese proteica verificadas após a fertilização de oócitos de Spisula solidissima ou durante a maturação de oócitos de estrela-do-mar são, também, devidas a utilização estágio-específica de diferentes populações de mRNA materno (Rosenthal et al., 1980; Rosenthal et al., 1982). Um dos exemplos mais interessantes de regulação ao nível da tradução seletiva foi recentemente verificado durante a citodiferenciação induzida pela luz em Volvox. O padrão de síntese proteica varia rapidamente após a iluminação das células, sendo que actinomicina D não exerce nenhum efeito nesta variação e os RNAs isolados de células não-iluminadas e iluminadas fornecem idênticos produtos de tradução "in vitro" (Kirk e Kirk, 1985).

Processamento de RNA também pode estar envolvido no controle do desenvolvimento (Leff et al., 1986). Além disso, rearranjos no DNA parecem ocorrer em diversos sistemas, levando a importantes consequências fenotípicas. Os exemplos melhor caracterizados de rearranjos gênicos durante o desenvolvimento envolvem os genes das imunoglobulinas de vertebrados (Hood et al., 1985) e os genes que determinam o tipo de acasalamento em levedura (Klar et al., 1984).

Rearranjos nos genes de fixação de nitrogênio ocorrem durante a diferenciação celular dos heterocistos de Anabaena induzida pela carência de nitrato e amônia (Golden et al., 1985).

É também importante destacar a ocorrência de certas modificações nas proteínas ao nível de pós-tradução durante a morfogênese e diferenciação celular. Muitas das variações qualitativas observadas nos padrões de síntese proteica durante o início do desenvolvimento em camundongos são devidas a modificações pós-traducionais de proteínas (Blerkom, 1981).

Todavia, ainda muito pouco é conhecido acerca de como os genes envolvidos no processo de diferenciação são regulados, quais genes estão envolvidos e que função exercem os produtos destes genes. Esforços tem sido realizados no sentido de identificar proteínas cuja expressão e/ou atividade sofra a interferência do processo de diferenciação celular.

Em vários sistemas experimentais tem sido demonstrado que variações no formato celular e na organização citoplasmática são importantes na regulação da expressão de genes relacionados com o crescimento e diferenciação celular. O envolvimento do citoesqueleto no controle do crescimento e da diferenciação sugere, portanto, a possibilidade de que tais mecanismos de controle possam depender diretamente da expressão de genes para as proteínas citoesqueléticas. Esta noção foi inspirada na observação de

que alterações no formato celular bem como nos padrões de contato celular podem afetar a expressão de elementos do citoesqueleto, provavelmente por um mecanismo de regulação pelo produto final (Ben-Ze'ev, 1986; Farmer, 1986). Como exemplo pode ser citada a verificação de que a despolimerização de microtúbulos inibe especificamente a expressão do mRNA para tubulina, acelerando o seu decaimento (Ben-Ze'ev et al., 1979; Cleveland et al., 1981). Além disso, algumas evidências mostram que o gene da actina não-muscular, que inicialmente era considerado um gene do tipo "housekeeping", isto é, expresso constitutivamente para formar a rede de microfilamentos citoesqueléticos, na verdade não é expresso constitutivamente, mas sim sob um rigoroso controle, além de exercer um papel regulatório no crescimento e na diferenciação (Farmer, 1986). Por exemplo, em D.discoideum, a actina é uma proteína abundante e a sua síntese é regulada durante a formação do corpo de frutificação e também durante a germinação do esporo (Kimmel e Firtel., 1982).

Actina e tubulina estão entre as proteínas mais importantes do sistema citoesquelético da maioria das células eucarióticas. Estas proteínas estão envolvidas em vários processos biológicos como mudanças no formato celular, crescimento, motilidade, secreção, divisão e diferenciação (Cleveland e Sullivan, 1985; Farmer, 1986), embora pouco se conheça como elas estão organizadas ou como elas exercem suas funções celulares na maioria dos

organismos. Actina e tubulina são considerados polipeptídios altamente conservados. Contudo, foram verificadas várias diferenças nas propriedades imunológicas e bioquímicas entre as tubulinas de animais, plantas e eucariotos inferiores (Moregohn e Fosket, 1986). Além disso, tem sido encontrada uma heterogeneidade de formas de actina e tubulina gerada por eventos de modificação pós-tradução ou pela existência de famílias multigênicas para estas proteínas (Jantzen, 1981; Kimmel e Firtel, 1982; Cleveland e Sullivan, 1985). Também foi verificada uma distribuição específica de certas isoformas em algumas organelas, tais como os flagelos (Russell et al., 1984; Sasse et al., 1987; Diggins e Dove, 1987). As modificações ao nível de pós-tradução que originam a heterogeneidade da tubulina, parecem estar sob um rigoroso controle do desenvolvimento e da morfogênese (Cleveland e Sullivan, 1985).

Em adição às variações na atividade gênica que ocorrem durante o processo de diferenciação celular característico dos vários organismos vivos soma-se a capacidade destes organismos responderem a variações do meio ambiente, através da ativação e/ou desativação transitória de um conjunto específico de genes. Quando estas alterações se constituem em uma agressão, como por exemplo altas temperaturas, as células, dos mais diversos seres vivos, reagem de forma semelhante, apresentando modificações no seu padrão de transcrição gênica e de síntese de proteínas, modificações

essas conhecidas, genericamente, como resposta ao choque térmico.

A resposta ao choque térmico - Em resposta a uma súbita elevação da temperatura, praticamente todos os organismos até agora estudados, da bactéria ao homem, sintetizam um conjunto de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (Hsps, do inglês "heat shock proteins"). Este fenômeno é conhecido como resposta ao choque térmico. No entanto, a exposição das células a vários outros agentes agressores, como etanol, metais pesados, análogos de aminoácidos, inibidores da fosforilação oxidativa, anóxia, arsenito de sódio, dentre outros, levam a indução de uma resposta similar tanto em procariotos como eucariotos (para revisão, ver Schlesinger et al., 1982a,b; Atkinson e Walden, 1985; Lindquist, 1986).

Este fenômeno tem sido bastante estudado em Drosophila, onde foi primeiramente observado, há vinte e cinco anos atrás, por Ritossa (1962). A observação, ao microscópio, dos cromossomos politênicos de glândulas salivares, após elevação da temperatura de 20 para 37°C ou após tratamento com dinitrofenol, demonstrou o aparecimento de vários novos pufes. A indução de um conjunto de proteínas após choque térmico foi demonstrada somente dez anos mais tarde (Tissieres et al., 1974) e durante os anos que se seguiram foi esclarecido que os pufes eram sítios onde ocorria vigorosa transcrição de RNA e que vários destes RNAs eram

traduzidos nas proteínas de choque térmico. Inicialmente se pensou que esta indução seletiva de proteínas era uma propriedade exclusiva de Drosophila. Contudo por volta de 1978-1979, uma resposta análoga foi verificada em cultura de células de mamíferos e aves (Kelley e Schlesinger, 1978), E.coli (Lemeaux et al., 1978; Yamamori et al., 1978), Tetrahymena (Fink e Zeuthen, 1978) e em levedura (McAlister et al., 1979). Inúmeros trabalhos se seguiram, relatando respostas similares em uma extraordinária variedade de organismos. A ubiquidade da resposta ao choque térmico e a extrema conservação de alguns dos genes de Hsps ao longo da evolução, não apenas nas suas sequências codificadoras mas também nas suas sequências regulatórias, atestam a importância das Hsps (Schlesinger et al., 1982a; Schlesinger, 1986).

As sete principais proteínas induzidas pelo choque térmico em D. melanogaster são designadas Hsp83, Hsp70, Hsp68, Hsp27, Hsp26, Hsp23 e Hsp22. Estas proteínas foram nomeadas de acordo com seu peso molecular aparente em géis de poliacrilamida/SDS. Embora o número exato de Hsps varie nos diferentes organismos, a maioria delas corresponde a polipeptídios predominantemente nas faixas de peso molecular de 80 a 90 kDa, 68 a 74 kDa e 18 a 30 kDa. Estas três classes de Hsps são extremamente conservadas (Craig, 1985). Anticorpos contra a Hsp70 e Hsp89 de fibroblastos de embrião de galinha apresentam reação cruzada com proteínas equivalentes de vários organismos (Kelley e Schlesinger,

1982). Além disso, foi observada hibridização cruzada entre o gene hsp70 de Drosophila com sequências genômicas de diferentes organismos (Ingolia et al., 1982; Bardwell e Craig, 1984). Os peptídios resultantes da digestão triptica da Hsp 83 de Drosophila comigram em cromatografia de camada delgada com os peptídios equivalentes de proteínas de células de galinha (Hsp89) e humanas (Hsp90), sugerindo uma estreita similaridade entre estas três proteínas (Voellmy et al., 1983). Embora as Hsps de menor peso molecular de um dado organismo mostrem uma homologia maior entre si mesmas do que com relação as estas proteínas em outras espécies, a análise da sequência de seus genes demonstrou uma certa homologia entre as Hsps menores de insetos, vertebrados e nematódeos além de uma homologia parcial com a cadeia α -cristalino de mamíferos (Ingolia e Craig, 1982a; Russnak et al., 1983; Bienz, 1984).

Mas, é a Hsp70 a mais conservada das Hsps. Por exemplo, as proteínas Hsp70 de Drosophila e levedura apresentam uma homologia de 72% em termos das suas sequências de aminoácidos (Ingolia et al., 1982). A sequência desta proteína deduzida a partir do gene hsp70 humano mostra uma homologia de 73% à Hsp70 de Drosophila (Hunt e Morimoto, 1985). Além disso, o produto do gene dnaK, uma proteína abundante induzida também pelo choque térmico em E.coli, possui 50% de homologia com a Hsp70 de Drosophila, e uma similaridade antigênica com as Hsps70 de levedura, galinha e

homem, sendo talvez um dos elementos mais conservados na evolução (Neidhardt et al., 1984).

Como demonstrado por Bardwell e Craig (1984), o gene dnaK é único, mas em Drosophila e S. cerevisiae, os genes hsp70 compõem uma família multigênica, cujos membros respondem à temperatura de diferentes maneiras (Ingolia e Craig, 1982b; Wadsworth, 1982; Ingolia et al., 1982). Na maioria dos eucariotos até agora examinados, os genes que codificam para os polipeptídios de 70 kDa indutíveis pelo calor são membros de famílias multigênicas. Estas famílias também incluem genes cognatos que codificam para proteínas de aproximadamente o mesmo peso molecular, constitutivamente expressas, porém não indutíveis pelo calor (Craig et al., 1983; Lowe e Moran, 1984; O'Malley et al., 1985). Um anticorpo monoclonal produzido contra a Hsp70 de Drosophila reage com um grupo de proteínas de aproximadamente 70 kDa em Drosophila, ouriço do mar, nematódeo, células de galinha e humanas. Algumas destas proteínas são induzidas pelo calor, porém outras não (S. Lindquist, resultados não publicados, cf. Lindquist, 1986).

Em E. coli, o produto do gene dnaK, homólogo à Hsp70 e que é expresso mesmo à temperatura normal, foi originalmente identificado como uma proteína necessária para a replicação do bacteriófago lambda. A sua síntese é aumentada após a transferência das células para temperaturas mais altas, porém a sua função, em células não-infectadas, ainda não foi

encontrada, embora ela seja essencial para o crescimento celular (Neidhardt et al., 1984).

A proteína Hsp70 apresenta uma mobilidade na célula, indo do citoplasma para o núcleo após o tratamento térmico e retornando ao citoplasma durante a recuperação das células; no núcleo, a Hsp70 se concentra no nucléolo (Pelham, 1984; Welch e Suhan, 1985; Collier e Schlesinger, 1986). A Hsp70 passa da forma citosólica solúvel para uma fração do citoesqueleto nuclear após o choque térmico e sua forma insolúvel é solubilizada numa reação dependente de ATP (Lewis e Pelham, 1985). Aliás, as Hsps70 de mamíferos ligam fortemente ATP, uma propriedade que tem sido explorada para sua purificação (Welch e Feramisco, 1985). Recentemente Chappell et al. (1986) apresentaram fortes evidências (purificação por afinidade em colunas de ATP-agarose, mapa peptídico, análise em eletroforese bidimensional e reatividade antigênica cruzada) que uma ATPase que remove clatrina de vesículas cobertas, e que é sintetizada constitutivamente em células de mamíferos, é um membro da família das Hsp70.

As propriedades das outras Hsps não estão ainda bem esclarecidas, porém, algumas evidências sugerem que a Hsp90 poderia reconhecer sítios hidrofóbicos de proteínas desnaturadas após o tratamento térmico, ligando-se a elas e prevenindo assim a formação de precipitados insolúveis e danosos à célula (Pelham, 1985). Recentemente foi observado que o gene da ubiquitina é ativado pelo choque térmico tanto

em fibroblastos de embrião de galinha como em leveduras (Bond e Schlesinger, 1985; A. Findley e A. Varshavsky, resultados não publicados, cf. Lindquist, 1986). A associação entre choque térmico e proteases é também encontrada em procariotos; um dos genes de E. coli regulados pelo choque térmico é lon, que codifica para uma protease dependente de ATP (Phillips et al., 1984). Assim, atualmente especula-se que essas atividades proteolíticas fariam parte do sistema celular que percebe o estresse causado pelo choque térmico (Munro e Pelham, 1985; Schlesinger, 1986).

A resposta ao choque térmico é frequentemente vista como uma função de sobrevivência celular, capaz de proteger os organismos contra os efeitos tóxicos do calor ou de outros agentes. Contudo, a exata função das Hsps ainda é obscura. Uma observação interessante é o fato da indução de proteínas de choque térmico coincidir com a aquisição de tolerância a temperaturas mais extremas em diversos organismos (Craig, 1985).

O fenômeno da termotolerância é definido como uma capacidade indutível das células, que se caracteriza pelo fato das células adquirirem resistência a temperaturas elevadas (letais), desde que tenham sido anteriormente expostas ao choque térmico ou a outros estresses. A pré-exposição ao choque térmico ou a temperaturas intermediárias parece proteger as células da morte que poderia ser provocada por um estresse subsequente mais severo (Gerner e Schneider, 1975; McAlister e Finkelstein, 1980a; Loomis e

Weeler, 1980; Plesset et al., 1982; Li, 1983; Plesofski-Vig e Brambl, 1985).

A idéia de que proteínas indutíveis seriam responsáveis pelo aumento da termorresistência surgiu a partir dos resultados de experimentos, utilizando cicloeximida, em Dictyostelium e levedura, que indicavam a necessidade de síntese proteica durante a incubação a temperaturas intermediárias, para a aquisição da termorresistência (Loomis e Weeler, 1980; McAlister e Finkelstein, 1980a). Além disso, outros agentes que induzem Hsps também conferem termotolerância (Li e Werb, 1982; Hahn e Li, 1982; Yamamori e Yura, 1982; Li, 1983). Somam-se a estas evidências de um envolvimento das Hsps na aquisição de termotolerância, o fato de que o decaimento da termotolerância coincide com a degradação das Hsps (Li e Laszlo, 1985) e também relatos de que em certos estágios do desenvolvimento nos quais as Hsps não podem ser induzidas, os organismos são extremamente mais sensíveis ao calor e não adquirem termotolerância (Lindquist, 1986).

Contudo, alguns dados da literatura indicam que nem todas as Hsps estão necessariamente envolvidas na termoproteção. Alguns autores relataram a importância das Hsps de menor peso molecular (Loomis e Weeler, 1982; Berger e Woodward, 1983), ainda que, embriões de Drosophila que sintetizam constitutivamente as Hsps de menor peso molecular sejam extremamente termossensíveis (Zimmerman et al., 1983). Também existem evidências de que nenhuma síntese de Hsps

parece ser necessária para a indução da termotolerância adquirida em levedura e em fibroblastos de rato (Hall, 1983; Widelitz et al., 1986).

Ao lado de um papel na resposta ao estresse, as Hsps poderiam desempenhar uma função importante no desenvolvimento normal dos organismos. Esta hipótese é baseada na observação de que alguns genes de choque térmico são ativos durante certos estágios do desenvolvimento ou em certos tipos celulares em condições fisiológicas normais (Bienz, 1985). Durante a oogênese e o estágio de pré-pupa, em Drosophila, são expressos alguns genes hsp (Zimmerman et al., 1983; Mason et al., 1984). Em embriões de camundongo, a ativação do genoma ocorre no estágio de duas células e resulta em uma intensa variação no padrão de proteínas sintetizadas; entre as proteínas específicas desta fase estão proteínas idênticas a Hsp68 e a Hsp70 (Bensaude et al., 1983). Células de carcinoma embrional de camundongo também expressam altos níveis de Hsps na ausência de estresse (Bensaude e Morange, 1983). Durante a esporulação em levedura ocorre a síntese de RNA para duas possíveis Hsps (26 e 84) (Kurtz e Lindquist, 1984).

Por outro lado, em certos estágios do desenvolvimento ocorre uma repressão da expressão de genes de certas Hsps mesmo durante o tratamento térmico. Em oócitos de Xenopus o mRNA para Hsp30 não é detectado mesmo após o choque térmico, contudo sua indutibilidade pelo calor é restaurada no estágio de girino (Bienz, 1984). Reticulócitos de galinha

respondem ao calor com a indução de apenas uma Hsp (Hsp70), enquanto os linfócitos induzem a síntese de Hsp70, Hsp89, Hsp23 e Hsp 22 (Morimoto e Fodor, 1984). Também durante a oogênese em Drosophila, a hipertermia não induz alguns genes de choque térmico (hsp70, hsp68, hsp22 e hsp23) (Zimmerman et al., 1983).

Um aspecto interessante da expressão dos genes de choque térmico é que os níveis de sua regulação, nos diferentes organismos e mesmo nos diferentes tipos celulares de um mesmo organismo, podem ser diferentes. Em E. coli e levedura a resposta é controlada primariamente ao nível da transcrição (Yamamori e Yura, 1982; McAlister e Finkelstein, 1980b). Em Drosophila a regulação é exercida tanto ao nível da transcrição como da tradução (Lindquist e DiDomenico, 1985). Em Xenopus, a resposta das células somáticas é controlada primariamente ao nível da transcrição e a resposta de oócitos é regulada ao nível da tradução (Bienz e Gurdon, 1982).

Todavia, um mecanismo comum parece regular a transcrição de todos os genes eucarióticos de choque térmico durante a hipertermia. Pelham (1982) identificou uma pequena sequência regulatória na região 5' a montante do gene hsp70 de Drosophila que é essencial para transcrição deste gene quando em células de macaco submetidas à hipertermia. Esta sequência está localizada a mais ou menos 20 pares de bases a montante da "TATA box". A comparação com os promotores de outros genes de choque térmico em Drosophila revelou a

existência de uma sequência consenso mínima, rotacionalmente simétrica, C--GAA--TTC--G, denominada HSE (do inglês, "Heat Shock Element"). Sequências similares foram encontradas adjacentes a genes de choque térmico de outros organismos, o que explica a ativação pelo calor dos genes de Drosophila quando introduzidos em células heterólogas (Pelham, 1985).

Aparentemente estas regiões HSE são reconhecidas por um fator de transcrição de choque térmico (HSTF, do inglês "Heat Shock Transcription Factor") recentemente purificado e caracterizado pela propriedade de ligar-se a HSE "in vivo" e "in vitro" (Parker e Topol, 1984; Wu, 1984). O HSTF pode ser isolado tanto de células submetidas a tratamento térmico como de células controle, sendo, contudo, mais ativo quando isolado de células aquecidas (Parker e Topol, 1984). Este fato sugere que o HSTF existiria normalmente sob forma inativa e somente seria ativado mediante hipertermia ou outros tipos de agressão, ligando-se de maneira cooperativa às várias regiões HSE existentes nos promotores dos genes de choque térmico (Topol et al., 1985; Burdon, 1986).

A indução da síntese das proteínas de choque térmico, na maioria dos organismos, é devida a um aumento da transcrição de genes eucarióticos de choque térmico além da tradução seletiva destes mRNAs. Em Drosophila, o choque térmico ativa algum mecanismo de controle ao nível da tradução que promove a tradução de mRNAs de Hsps e reprime especificamente a tradução dos mRNAs normais pré-existentes (Lindquist, 1980, 1981). Contudo os mRNAs pré-existentes

permanecem estáveis e traduzíveis em outros sistemas "in vitro", ou "in vivo" após a recuperação do choque térmico (Krüger e Benecke, 1981; Storti et al., 1980). Lisados preparados a partir de células de D.melanogaster que sofreram choque térmico podem traduzir apenas mRNAs para as Hsps, porém a adição de uma preparação ribossomal de células controle a estes lisados, restaura a capacidade destes lisados traduzirem os mRNAs normais além dos de choque térmico (Scott e Pardue, 1981), sugerindo que a capacidade das células, submetidas ao tratamento térmico, de discriminarem entre mRNAs normais e de choque térmico poderia estar nos ribossomos. Entre outros fatores, tem sido muito discutido um possível envolvimento da proteína ribossomal S6 na mudança da especificidade da maquinaria de tradução durante o choque térmico.

A fosforilação da proteína ribossomal S6 - Após a observação de Loeb e Blat (1970) e Kabat (1970), que ribossomos de células de mamíferos possuíam proteínas fosforiladas, um grande número de estudos foram realizados na tentativa de elucidar o papel de tal fosforilação.

Os resultados acumulados ao longo de mais de dez anos demonstraram que uma proteína básica da subunidade 40S, denominada S6, com peso molecular entre 30-35 kDa, é a principal fosfoproteína ribossomal, nos vários eucariotos examinados. A S6 pode estar fosforilada em múltiplos sítios "in vivo" e a extensão desta fosforilação pode ser

modificada por diferentes estímulos, tanto fisiológicos como patológicos (para revisão, ver Leader, 1980 e Gordon et al., 1982).

Uma correlação entre o aumento da fosforilação de S6 e a estimulação da síntese proteica, tem sido proposta por vários autores, pois muitos agentes que promovem crescimento e proliferação celular estimulam a fosforilação de S6. Em culturas de células de mamíferos, quiescentes ou em ausência de soro, a fosforilação de S6 é estimulada por insulina, prostaglandina, ester de forbol, soro, fatores de crescimento e transformação viral (Thomas et al., 1982; Trevillyan et al., 1985; Blenis et al., 1984). Em oócitos de Xenopus, a fosforilação de S6 é estimulada em resposta a progesterona, aumento do pH e após injeção de uma tirosina-quinase de origem viral (Maller et al., 1985). A fertilização de oócitos de ouriço do mar e a germinação de esporos de Mucor racemosus são acompanhadas de um aumento na fosforilação de S6 (Ballinger e Hunt, 1981; Larsen e Sypherd, 1980). Além disso, algumas evidências associam a desfosforilação de S6 com situações onde a síntese proteica, ou a quantidade de polissomos, está diminuída, como durante o tratamento hipertônico de células em cultura (Kruppa e Clemens, 1984) ou durante o choque térmico em Drosophila e plantas (Glover, 1982; Scharf e Nover, 1982).

Contudo, vários trabalhos relatam que a fosforilação de S6 pode ser estimulada em condições onde a síntese proteica está aumentada, inibida ou inalterada (Traugh, 1981). No

protozoário Tetrahymena, a fosforilação de S6 é estimulada pela carência nutricional, situação onde a síntese proteica está diminuída (Hallberg et al., 1981). Em Dictyostelium discoideum também se observa a fosforilação de S6 em condições de carência. Contudo, esta fosforilação está aparentemente relacionada com o processo de agregação celular, que é induzido pela carência, uma vez que não se observou a fosforilação de S6 em mutantes que não agregam (Juliani et al., 1983). No fungo Blastocladiella emersonii, o estado de fosforilação de S6 varia durante o ciclo de vida; contudo durante a esporulação induzida pela carência nutritiva o estado de fosforilação de S6 não é alterado; a S6 apresenta-se em um estado intermediário de fosforilação ao longo de toda a esporulação. Além disso a estimulação da síntese proteica que ocorre durante a germinação dos zoósporos e que é dirigida essencialmente pelo mRNA pré-existente armazenado nos zoósporos, não é dependente dos derivados de S6 maximamente fosforilados, embora sob certas condições de germinação, por exemplo, presença de extrato de levedura, seja verificada máxima fosforilação de S6 (Bonato et al., 1984).

Várias preparações de proteína quinase, as quais foram purificadas de acordo com suas capacidades para fosforilar vários substratos, foram descritas como capazes de fosforilar, ainda que em diferentes níveis, a proteína S6 "in vitro" (Traugh e Pendergast, 1986). Qual destas enzimas é responsável pela fosforilação de S6 "in vivo", em resposta

aos vários estímulos, ainda não está claro. Algumas especulações foram feitas no sentido de se responsabilizar a proteína quinase dependente de AMP cíclico pela fosforilação de S6 "in vivo", porque estímulos que provocam a elevação intracelular dos níveis de AMP cíclico levam à rápida fosforilação de S6. Contudo, esta enzima é capaz de fosforilar apenas alguns sítios de S6 "in vitro" (Wettenhall e Morgan, 1984; Bonato et al., 1984). Recentemente foi descrita a purificação de uma enzima que, aparentemente, é capaz de fosforilar especificamente a proteína S6 "in vitro" nos mesmos sítios verificados "in vivo" em Xenopus (Erickson e Maller, 1986).

Embora o papel da fosforilação de S6 no processo de síntese proteica não esteja ainda elucidado, tem sido discutido o seu possível envolvimento na iniciação e/ou seletividade de tradução, uma vez que esta proteína está localizada na região de iniciação da subunidade 40S (Bommer et al., 1980) e pode ser quimicamente acoplada ao mRNA (Terao e Ogata, 1979; Takahashi e Ogata, 1981). Aparentemente, ribossomos com S6 maximamente fosforilada possuem alguma vantagem na formação de polissomos "in vivo" (Thomas et al., 1982). Além disso algumas evidências sugerem que o estado de fosforilação de S6 teria um papel no recrutamento de mRNAs específicos (Duncan e McConkey, 1982) uma vez que a suplementação de lisados de reticulócitos com subunidades 40S fosforiladas parece aumentar a ligação e a

tradução de RNA poli(AUG) sintético (Burkhard e Traugh, 1983).

A sugestão de que a proteína S6 exerceria algum papel no recrutamento e seleção de certos mRNAs poderia ser utilizada para explicar a capacidade das células, que foram submetidas a tratamento térmico, discriminarem entre mRNAs normais e de choque térmico. Durante o choque térmico a desfosforilação da proteína S6 é coincidente com a indução da síntese de Hsps em Drosophila, plantas e células de mamíferos (Glover, 1982; Scharf e Nover, 1982; Kennedy et al., 1984), e a recuperação do choque térmico em plantas é acompanhada pela refosforilação de S6 (Scharf e Nover, 1982). Por outro lado, agentes químicos que induzem a síntese de Hsps em Drosophila não provocam a desfosforilação de S6 e além disso, a refosforilação de S6 não pareceu ser necessária para a retomada da síntese proteica normal após o choque térmico (Olsen et al., 1983).

Os dados são controversos e até agora nenhuma correlação precisa pôde ser feita entre o estado de fosforilação de S6 e a tradução de mensagens normais ou específicas como aquelas de choque térmico.

Sistema de estudo: o fungo aquático Blastocladiella emersonii

Entre os diferentes sistemas biológicos utilizados como modelos experimentais para estudos dos mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular, os microorganismos tem

merecido especial interesse. Muitos microrganismos unicelulares respondem a alterações do seu meio ambiente, com mudanças morfológicas marcantes, que são acompanhadas por variações nas suas capacidades metabólicas e fisiológicas. Devido a certas peculiaridades tais como, simplicidade estrutural, facilidades de cultivo e amplas possibilidades de manipulação através de técnicas genéticas e bioquímicas, estes organismos provaram ser sistemas extremamente úteis no estudo dos problemas relativos ao desenvolvimento e morfogênese, incluindo aqueles relativos ao controle da expressão gênica em resposta às súbitas variações ambientais. O fungo aquático Blastocladiella emersonii, isolado por E. Cantino em 1949, é um dos sistemas modelo que tem sido usado para tais estudos. Duas fases distintas de diferenciação celular ocorrem durante o ciclo de vida assexuado deste fungo: a germinação e a esporulação, ambas caracterizadas por mudanças profundas na arquitetura e na biogênese de organelas, podendo ser induzidas experimentalmente com alto grau de sincronia. O esquema do ciclo de vida está mostrado na página seguinte.

B.emersonii cresce como uma célula cenocítica. A carência nutricional a qualquer momento durante o seu crescimento, induz o processo de esporulação. Após 60-120 min da indução da esporulação a célula cenocítica é convertida em um zoosporângio pela formação de um septo basal que separa o corpo nucleado do sistema rizoidal, que passa a não ser mais necessário para a nutrição da célula.

ESQUEMA DO CILO DE VIDA DO FUNGO *Blastocladiella emersonii*

(apud Lovett, 1975)

Entre 90-150 min, a papila é formada na parte superior oposta à região rizoidal, e logo após a formação da papila, tem início a diferenciação dos zoósporos, cujo primeiro evento é a formação do flagelo. Paralelamente à elongação do flagelo ocorre a citocinese e ao final desta clivagem (190 min) ocorre a formação das partículas gama (cuja função permanece desconhecida) e inicia-se a agregação dos ribossomos. Os eventos finais da diferenciação dos zoósporos incluem a rápida formação do capacete nuclear e, como último evento, a reorientação da grande e única mitocôndria ao redor do axonema flagelar. A esporulação dura entre 3,5 e 4 horas e dependendo do tempo de crescimento anterior à carência, cada célula (zoosporângio) fornecerá um número de zoósporos que pode variar entre um até 260 e que são liberados através da abertura da papila (para revisão, ver Lovett, 1975).

Durante a esporulação, embora não ocorra acúmulo no conteúdo celular de proteína, RNA e DNA, existe uma intensa renovação no conteúdo de proteínas e RNAs (Murphy e Lovett, 1966; Lodi e Sonneborn, 1974; Jaworski e Thomson, 1980). Estudos com o uso de inibidores mostraram que interferências na síntese de RNA e proteínas interrompem o processo de esporulação, indicando que síntese concomitante de RNA e proteínas é necessária para a esporulação normal (Murphy e Lovett, 1966). O aparecimento das partículas gama no final da esporulação requer a síntese "de novo" de pelo menos duas proteínas altamente básicas de peso molecular 41 e 43 kDa

(Hohn et al., 1984). Várias atividades enzimáticas são aumentadas durante a esporulação: guanilato ciclase (Silverman, 1976), adenilato ciclase (Gomes et al., 1978), esterase (Barbieri e Camargo, 1975), fosfodiesterase de AMP cíclico (Maia e Camargo, 1974), fosfodiesterase de GMP cíclico (Vale e Maia, 1976), fosfatase alcalina (Selitrennikoff e Sonneborn, 1977) e proteína quinase dependente de AMP cíclico (Juliani et al., 1979). Lodi e Sonneborn (1974) relataram a existência de uma proteólise intensa durante a esporulação. Mais tarde, foi verificado que antipaina, um inibidor de proteases, inibe o processo de esporulação, evidenciando que a degradação de proteínas é essencial para a conversão das células vegetativas em zoosporângios (Correa et al., 1978).

Durante toda a esporulação ocorre síntese de RNA poli(A)⁺. Os RNAs poli(A)⁺ sintetizados antes do início da diferenciação dos zoósporos parecem ser degradados rapidamente, enquanto os novos RNAs poli(A)⁺ sintetizados no final da esporulação é que, aparentemente, são conservados nos zoósporos. Este acúmulo de novos RNAs poli(A)⁺ nos últimos 30 minutos da esporulação coincide com a formação do capacete nuclear do zoósporo dentro do qual o RNA poli(A)⁺ estará sequestrado (Jaworski e Thomson, 1980), e também com a síntese de certas proteínas. Estas proteínas são sintetizadas nos momentos finais da esporulação (180-210 min) e são encontradas associadas às partículas ribonucleoproteicas. Estas partículas poderiam ter o papel

de armazenar o mRNA neste período em que RNA poli(A)+ estável é acumulado. Durante a germinação dos zoósporos foi observado o desaparecimento destas proteínas da fração ribossomal (Jaworski e Stumhofer, 1981).

Os zoósporos são células altamente diferenciadas, desprovidas de parede celular, capazes de nadar por um longo período de tempo na ausência de nutrientes, às custas de suas reservas endógenas. Os zoósporos são inativos quanto à síntese de proteínas e de RNA, embora eles contenham quase todos os componentes necessários para a síntese proteica, incluindo aminoacil-tRNAs carregados, RNA poli(A)+, fatores de iniciação e elongação e ribossomos, organizados em uma organela denominada capacete nuclear que está justaposta ao núcleo (Jaworski, 1976; Johnson et al., 1977; Schmoyer e Lovett, 1969; Gong e Lovett, 1977).

O processo de germinação dos zoósporos pode ser induzido rápida e sincronicamente em meio nutriente ou em solução inorgânica contendo certos íons monovalentes, AMP cíclico ou inibidores da fosfodiesterase de AMP cíclico (Soll e Sonneborn, 1972; Gomes et al., 1980; Gottschalk e Sonneborn, 1982). Os zoósporos cessam seu movimento, retraem o flagelo e formam uma fina parede de quitina, transformando-se em células redondas nos primeiros 10-15 minutos após indução da germinação. Em seguida estas células redondas transformam-se em germes com a formação de um tubo germinativo visível que começa a se ramificar aos 60 min e que é o precursor do sistema rizoidal da célula em

crescimento (Lovett, 1975). Gottschalk e Sonneborn (1982) relataram a existência do fator de manutenção de zoósporos, um derivado de nucleotídeo cíclico, que é liberado para o meio extracelular durante a esporulação e que aparentemente é capaz de bloquear a transformação do zoósporo para célula redonda.

A transição de zoósporo para célula redonda ou esferócito não é dependente da síntese de RNA e proteínas e a transição de esferócito para germe é dependente da síntese de proteínas mas não de RNA (Lovett, 1968). Entretanto o desenvolvimento do rizóide após 45-50 min de germinação não ocorre na presença de actinomicina D e se presume que seja então necessária a síntese de novos mRNAs (Leaver e Lovett, 1974).

Assim, síntese de RNA não é necessária para o aumento de síntese de proteínas que ocorre no início da germinação, e a tradução do mRNA transcrito durante a esporulação e estocado no zoósporo é responsável pelo rápido aumento no conteúdo de polissomos que ocorre entre 15 e 30 min de germinação (Lovett, 1968; Soll e Sonneborn, 1971a; Leaver e Lovett, 1974; Silverman et al., 1974; Jaworski e Thomson, 1980). Durante a rápida conversão dos zoósporos a esferócitos, 50% dos ribossomos estão na forma de polissomos e aos 60 min de germinação em meio nutriente, 70% dos ribossomos estão como polissomos. Em células germinadas em meio inorgânico, a fração de polissomos alcança um nível de 50% aos 60 min. É provável que os novos mRNAs sintetizados

contribuam para esta elevação no nível de polissomos após aquele aumento inicial em que foram utilizados os mRNAs armazenados nos zoósporos (Leaver e Lovett, 1974).

Os zoósporos contém tanto RNAs poli(A)⁺ como RNAs poli(A)⁻ armazenados, embora não sejam conhecidas as suas proporções em massa (Jaworski, 1976; Johnson et al., 1977; Lovett, 1983). Parte do RNA poli(A)⁺ que está sequestrado no zoósporo corresponde ao RNA poli(A)⁺ sintetizado durante o crescimento antes da indução da esporulação (Jaworski e Thomson, 1980). Os zoósporos armazenam RNA total que representa 42% da complexidade total do genoma (simples cópia) com cerca de 45% desta complexidade representada por RNA poli(A)⁺, 36% como RNA poli(A)⁻ de sequências distintas, e 15% em ambas as frações (Lovett, 1983). Resultados de Jaworski et al. (1976) demonstraram que há um intenso metabolismo dos fragmentos poli(A) nos 45 minutos iniciais da germinação, incluindo tanto degradação como adição de fragmentos poli(A) nos mRNAs armazenados nos zoósporos.

O ciclo de vida de Blastocladiella emersonii possui, portanto, características que propiciam a utilização deste microorganismo para estudos sobre o controle da expressão gênica envolvida no processo de diferenciação celular. Assim, neste trabalho nos propusemos a estudar o controle da expressão gênica durante as duas fases de diferenciação celular, esporulação e germinação, deste organismo.

Utilizando a incorporação "in vivo" de [³⁵S]metionina na forma de pulsos curtos e consecutivos e a técnica de

eletroforese bidimensional - que tem se demonstrado uma importante ferramenta na análise da quantidade e natureza das alterações no padrão de proteínas que ocorrem durante o processo de diferenciação celular - investigamos possíveis variações no padrão das proteínas sintetizadas durante a esporulação e a germinação. Para verificar se as variações no padrão de síntese proteica eram acompanhadas ou não de variações na população de RNAs, foram feitos ensaios de tradução "in vitro" utilizando RNAs isolados durante a esporulação e a germinação. Além disso, nos pareceu interessante tentar identificar actina e tubulina entre as proteínas cuja síntese estivesse sob um controle do desenvolvimento, através da utilização de anticorpos comerciais contra estas proteínas.

A este estudo seguiu-se, uma investigação sobre a resposta ao choque térmico durante o desenvolvimento em B.emersonii. O surgimento de alguns dados na literatura sugerindo um controle do desenvolvimento superposto à resposta transitória induzida pela hipertermia, nos levou a utilizar o fungo B.emersonii para investigarmos até que ponto o programa de desenvolvimento normal seria afetado ou afetaria a resposta ao choque térmico. Este estudo nos levou à verificação que três proteínas de choque térmico são expressas espontaneamente durante a esporulação (Hsp70, Hsp76 e Hsp39a), sendo que a identidade entre a Hsp70 e a proteína de 70 kDa induzida espontaneamente durante um certo estágio da esporulação foi investigada.

Assim, em B.emersonii, verificamos que sobre o controle da ativação transitória de genes de choque térmico aparentemente está superposto um controle do desenvolvimento, representado pela indução de conjuntos específicos de Hsps em cada fase do desenvolvimento de Blastocladiella emersonii. Contudo, algumas Hsps podiam ser induzidas pela hipertermia em todas as fases do ciclo de vida. Este fato proporcionou a oportunidade de analisarmos como se comportaria o fenômeno de aquisição de termotolerância em cada uma dessas fases do desenvolvimento e quais Hsps estariam envolvidas neste processo.

Finalmente, retomamos um estudo já iniciado em nosso laboratório sobre o papel da fosforilação da proteína ribossomal S6 (Bonato et al., 1984), agora no contexto da resposta ao choque térmico. Assim, investigamos o efeito do choque térmico na fosforilação desta proteína levando em consideração as observações anteriores de que o estado de fosforilação de S6 varia durante o desenvolvimento de Blastocladiella e a nossa observação de que existe um controle do desenvolvimento sobre a resposta ao choque térmico.

II. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

1. Condições de cultivo e obtenção das células

1.1. Manutenção das culturas e obtenção dos zoósporos de primeira geração

As culturas de B.emersonii mantidas em placas de Petri contendo meio PYG-ágar (peptona 0,125%, extrato de levedura 0,125%, glicose 0,3%, ágar 1%) foram renovadas diariamente pela sementeira de zoósporos, os quais, após germinarem aderidos à superfície do ágar, crescem vegetativamente por 20-24 horas a 19°C completando o ciclo de vida através de uma esporulação espontânea. Os novos zoósporos liberados, chamados "zoósporos de primeira geração", foram coletados através de ressuspensão em água destilada e utilizados para sementeira de novas placas ou inoculados em meio de crescimento líquido (DM3 e PYG-P).

As células vegetativas crescem lentamente a baixas temperaturas, o que permitiu estocá-las a 4°C durante o fim de semana. O desenvolvimento normal foi retomado incubando-se essas células a 24°C, induzindo-se a esporulação em 6-7 horas pela adição de água destilada.

1.2. Cultivo em meio líquido PYG-P para obtenção de grandes quantidades de zoósporos

Os zoósporos de primeira geração (7×10^7) foram, imediatamente após a colheita, inoculados em um litro de meio PYG-P (peptona 0,125%, extrato de levedura 0,125%, glicose 0,15%, KH_2PO_4 2,5mM, K_2HPO_4 2,5mM) num frasco de Fernbach (Goldstein e Cantino, 1962). Após 14 horas de crescimento a 23°C, sob agitação (160 rpm), as células vegetativas foram filtradas em rede de náilon (30µm), lavadas com solução de esporulação (Tris-maleato 1mM, pH6,8, CaCl_2 1mM) e ressuspensas em 400 ml desta mesma solução. Após 4 horas a 27°C sob agitação podia-se observar 95% a 100% dos zoosporângios vazios, que foram então separados dos zoósporos por filtração em rede de náilon. Para um litro de meio PYG-P obtinhamos cerca de 5×10^8 zoósporos. Estes zoósporos foram utilizados para a purificação de tubulina de flagelos (item II.12).

1.3. Indução da esporulação e germinação sincrônicas

Para a indução da esporulação sincrônica, o crescimento das células foi feito em meio de crescimento semi-definido DM3. Este meio é uma modificação do meio definido de crescimento, DM2, descrito por Selitrennikoff e Sonneborn (1977). A composição do meio DM3 é a seguinte: CaCl_2 1mM, MgSO_4 10mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6µg/ml, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1µg/ml,

ZnSO₄.7H₂O 0,2µg/ml, MnSO₄.H₂O 0,2µg/ml, glicose 0,33%,
tiamina 0,04µg/ml, glicina 0,2mM, L-histidina 0,13mM, L-
isoleucina 0,4mM, L-lisina HCl 0,4mM, L-metionina 0,1mM, L-
fenilalanina 0,2mM, L-serina 0,2mM, L-treonina 0,4mM, L-
triptofano 0,04mM, L-tirosina 0,2mM, valina 0,4mM, L-
arginina 0,24mM, ácido glutâmico 2,7mM, extrato de levedura
120µg/ml, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 1mM, pH6,8, Tris-maleato 3,5mM,
pH6,8; o pH do meio foi ajustado para 6,8 com KOH 1M e a
concentração final de K⁺ foi ajustada para 25mM com KCl 1M.

Zoósporos de primeira geração foram inoculados em meio
líquido DM3 na densidade de 3x10⁵ zoósporos/ml, sendo
utilizado no máximo 500ml de meio em cada frasco de
Fernbach. Após 14 horas de crescimento a 19°C, sob agitação
(160 rpm), as células vegetativas foram filtradas em rede de
náilon (30µm), lavadas com solução de esporulação (com
aproximadamente uma quantidade equivalente a 3 vezes o
volume do meio de crescimento), suspensas nesta mesma
solução na concentração de 5x10⁵ células/ml e mantidas a
27°C por 4 horas sob agitação. O progresso e a sincronia da
esporulação foram acompanhados ao microscópio óptico. Após 2
horas de esporulação 95-100% das células apresentavam papila
e após 4 horas os zoósporos eram liberados para o meio. As
células esporulantes foram coletadas nos diferentes momentos
da esporulação por filtração a vácuo em papel Whatman nº1 ou
por centrifugação (1000xg, 5 min). O sedimento obtido foi
imediatamente congelado em gelo seco/acetona ou tratado com
TCA 10% como descrito no item II.2.

Os zoósporos obtidos após esporulação sincrônica foram separados das células vegetativas vazias por filtração em rede de náilon e o seu número foi determinado por contagem em câmara de Neubauer. Para 500ml de meio DM3 ($1,5 \times 10^6$ células) obtinhamos uma produção de zoósporos variando entre $1,2-1,5 \times 10^9$ zoósporos totais. A seguir os zoósporos foram coletados por centrifugação (1000xg, 5 min) e imediatamente congelados em gelo seco/acetona ou tratados com TCA 10%.

Para as experiências de germinação, foram obtidos zoósporos como descrito no parágrafo anterior. Após a centrifugação (1000xg, 5 min, 4°C), os zoósporos foram ressuspensos em solução de esporulação gelada na concentração de 1×10^6 zoósporos/ml e em seguida inoculados no meio apropriado na densidade de 1×10^6 zoósporos/ml e mantidos a 27°C sob agitação (160 rpm). O progresso e a sincronia da germinação foram acompanhados ao microscópio óptico. Após 20 min, 100% das células correspondiam ao fenótipo de célula redonda e após 45 min 100% haviam desenvolvido o fenótipo germe.

Os meios utilizados para a indução da germinação foram: meio DM3, solução inorgânica de germinação (Tris-maleato 1mM, pH6,8, CaCl_2 1mM, MgCl_2 10mM, KCl 50mM), meio AL (CaCl_2 1mM, MgCl_2 10mM, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6µg/ml, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1µg/ml, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2µg/ml, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2µg/ml, glicose 0,3%, tiamina 0,04µg/ml, 0,2 mM dos seguintes aminoácidos: L-alanina, L-fenilalanina, L-ácido aspártico, L-cisteína, L-hidroxiprolina, L-prolina, L-leucina, L-isoleucina, L-ácido

glutâmico, glicina, L-serina, L-tirosina, L-arginina, L-lisina, L-treonina, L-valina, L-histidina, L-triptofano; metionina 5 μ M, NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ 1mM pH6,8, Tris-maleato 1mM, pH6,8; o pH do meio foi ajustado para 6,8 com KOH 1M e a concentração de K⁺ foi ajustada para 50mM com KCl 1M). Foram coletadas células nos diferentes momentos da germinação por filtração a vácuo em papel Whatman n°1 (exceto as células germinantes de até 30 min) ou por centrifugação (1000xg, 5 min). O sedimento obtido foi imediatamente congelado em gelo seco/acetona ou tratado com TCA 10% como descrito no item II.2.

1.4. Condições para o tratamento térmico das células

Nos experimentos de choque térmico, as células em diferentes momentos do ciclo de vida a 27°C, foram transferidas para 34°, 38°, 40° ou 42°C, permanecendo nestas temperaturas por um tempo que variou entre 10 e 60 min, dependendo do tipo de experimento. O aquecimento das células foi feito em banho-maria nas diversas temperaturas, com agitação manual das culturas. Após o intervalo de choque térmico as células foram coletadas como descrito no item II.1.3, ou transferidas para 27°C quando se pretendia analisar a recuperação das células. Para a determinação da viabilidade, as células (germes ou células em crescimento), depois de submetidas ao tratamento térmico, foram retornadas à temperatura normal (27°C). Após 4 horas de recuperação, a

esporulação foi induzida e o número de zoósporos liberados após 4 horas determinado. Para a determinação da viabilidade durante a esporulação, os zoosporângios que sofreram tratamento térmico foram retornados a 27°C e após 6 horas de recuperação o número de zoósporos liberados foi determinado.

1.5. Incorporação "in vivo" de ^{35}S metionina

Para a incorporação "in vivo" de ^{35}S metionina durante a esporulação ou germinação sincrônicas, alíquotas de 6×10^4 células esporulantes e 4×10^7 células germinantes foram removidas nos tempos indicados, ^{35}S metionina (1-2 $\mu\text{Ci/ml}$, da Amersham) foi adicionada ao meio e após 30 min, no caso da esporulação, ou 10 min, no caso da germinação, as células foram centrifugadas (1000xg, 5 min) e o sedimento ressuspenso em 10 ml de TCA 10% gelado contendo metionina 1mg/ml.

O tempo de incubação das células (pulso) na presença de ^{35}S metionina variou em alguns experimentos, principalmente aqueles envolvendo choque térmico. Nestes casos, os tempos de pulso estão indicados na apresentação dos resultados.

1.6. Incorporação "in vivo" de ^{32}P

Nos experimentos de marcação com ^{32}P a incorporação foi feita ao longo de todo o ciclo de vida. (O ^{32}P foi adquirido da Comissão Nacional de Energia Nuclear, CNEN/SP). A incorporação foi iniciada durante o crescimento em meio DM3 contendo menor concentração de fosfato (0,1mM) como descrito no item II.1.3, exceto que ^{32}P (10 $\mu\text{Ci/ml}$) foi adicionado ao meio. Após o crescimento, a esporulação foi induzida na presença de 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P e os zoósporos radioativamente marcados foram induzidos a germinar em solução inorgânica contendo ^{32}P (10 $\mu\text{Ci/ml}$). Os diferentes fenótipos celulares foram coletados por centrifugação (1000xg, 5 min) e o sedimento foi ressuspense em 10ml de TCA 10% gelado.

2. Extração das proteínas totais das células para análise em eletroforese em gel de poliacrilamida

O sedimento das células marcadas ou não com [^{35}S]metionina ou ^{32}P (6x10⁶ células vegetativas ou esporulantes ou 4x10⁷ zoósporos ou células germinantes) foi ressuspense em 10ml de TCA 10%, gelado, sob vigorosa agitação. Esta suspensão foi mantida a 4°C por no mínimo 30 min e, em seguida, centrifugada a 1000xg por 20 min. O sedimento obtido foi dissolvido em 0,5ml de NaOH 0,3N, sendo em seguida adicionado 1,2ml de água destilada. Em

seguida procedeu-se à sonicação das células em Sonicador Branson (microtip, potência nº4, 20 segundos por duas vezes), em banho de gelo. Esta etapa de sonicação é essencial para completa solubilização das proteínas. Uma alíquota de 100µl foi removida para a dosagem de proteínas (pelo método de Lowry et al., 1951) imediatamente após a sonicação e ao restante da amostra foi adicionado TCA gelado para concentração final de 10% (0,16ml de TCA 100% + 5 ml de TCA 10%). Após incubação por uma noite a 4°C a suspensão foi centrifugada a 4000xg por 15 min. O sedimento foi ressuspenso em etanol absoluto (5ml) e mantido a 4°C por 15 min e em seguida centrifugado 4000xg por 15 min. O sedimento obtido foi ressuspenso em 5ml de uma mistura de clorofórmio:metanol (1:1). Após 15 min a 4°C, a suspensão foi centrifugada (4000xg, 15 min). Após evaporação a vácuo o precipitado obtido foi armazenado a -20°C e no dia da eletroforese ressuspenso em tampão de amostra para eletroforese unidimensional (Laemmli, 1970) ou em tampão de amostra para eletroforese bidimensional (uréia 9,5M, Nonidet P-40 2%, ditiotreitól 10mM e anfolitos 2%) (O'Farrell, 1975).

3. Determinação da radioatividade incorporada em proteínas

Nos experimentos de incorporação "in vivo" de ^{35}S -metionina a quantidade de radioatividade incorporada em proteínas foi determinada por precipitação com TCA.

Imediatamente após a ruptura das células por sonicação, uma alíquota (10 μ l) foi pipetada, simultaneamente com albumina de soro bovino (50 μ g), em pedaço (1x1cm) de papel Whatman 3MM (previamente mergulhado em uma solução de TCA 10% contendo metionina 1mg/ml). Os pedaços de papel foram lavados por 4 vezes (10 min cada) com TCA 10% contendo metionina 1mg/ml, sendo que a segunda lavagem foi feita a 90°C para eliminar metionil-tRNA. A seguir os papéis foram lavados com etanol, secos e a radioatividade foi medida em contador de cintilação.

4. Extração e purificação de RNA

4.1. Obtenção de RNA total

O RNA total foi isolado segundo o procedimento descrito por Chirgwin et al. (1979) que envolve ruptura das células na presença de isotiocianato de guanidina e β -mercaptoetanol com o objetivo de inibir eficientemente ribonucleases. O RNA foi, então, isolado livre de proteínas e DNA por ultracentrifugação em cloreto de cério como descrito por Maniatis et al. (1982).

O sedimento congelado tanto de células vegetativas como de células esporulantes (7×10^7 células), de zoósporos ($1,5 \times 10^6$) ou de células germinantes (8×10^6) foi ressuspensão em 2,5ml da seguinte solução: isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sódio 25mM, pH7, lauril sarcosinato de sódio 2%,

β -mercaptoetanol 0,1M. Os zoósporos lisaram pelo simples congelamento e descongelamento. Os demais tipos celulares foram submetidos à sonicação (microtip de sonicador Branson potência nº4; 20 segundos por 2 vezes). O lisado celular foi centrifugado a 4000xg por 10 min e ao sobrenadante foi adicionado 1g de CsCl, e, em seguida este sobrenadante foi submetido a centrifugação sobre uma camada de CsCl 5,7M em EDTA 0,1M (pH7,5), densidade 1,78819 g/cm³, por 13 horas a 36000 rpm (rotor Spinco SW50.1). O sedimento contendo o RNA foi dissolvido em 1ml de Tris-HCl 10mM, pH7,4, EDTA 5mM, SDS 1% e extraído com 1ml de clorofórmio:1-butanol (4:1). A fase aquosa foi transferida para um tubo e a fase orgânica foi reextraída com volume igual de Tris-HCl 10mM, pH7,4, EDTA 5mM, SDS 1%. As fases aquosas foram reunidas e o RNA foi precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M (pH5,2) e 2,2 volumes de etanol gelado. Após incubação a -20°C por uma noite, o RNA foi coletado por centrifugação (13000xg, 10 min), ressuspensão em água (0,5ml) e precipitado novamente com acetato de sódio e etanol. Após centrifugação o sedimento foi seco sob vácuo, ressuspensão em água e armazenado a -70°C. A quantidade de RNA obtida foi estimada pela leitura da densidade óptica a 260 nm. A integridade do RNA obtido foi verificada através de eletroforese em gel de agarose. Todos os cuidados para evitar a contaminação da preparação de RNA com ribonucleases foram tomados. O material de vidro foi esterilizado a 180°C por 14 horas em forno Pasteur e o material de plástico foi esterilizado em

autoclave. As soluções foram preparadas de maneira estéril com reagentes ultra-puros (livres de nucleases) e quando possível foram esterilizadas em autoclave depois de prontas.

4.2. Purificação de RNA poli(A)+

Os RNAs poliadenilados (RNAs poli(A)+) foram separados dos RNAs não poliadenilados (RNAs poli(A)-) através de cromatografia em coluna de oligo(dT)-celulose como descrito por Aviv e Leder (1972).

A oligo(dT)-celulose (0,1g, da Collaborative Research, Inc.) foi equilibrada em tampão A (Tris-HCl 20mM, pH7,6, LiCl 0,5M, EDTA 2mM, SDS 0,4%) e colocada em uma seringa de 1ml. A coluna foi então lavada com 3 volumes de H₂O, 3 volumes de NaOH 0,1M em EDTA 5mM e novamente com H₂O até o pH do efluente ser menor que 8,0. Em seguida, a coluna foi lavada com 5 volumes de tampão A. Ao RNA dissolvido em H₂O (1mg/0,5ml), previamente aquecido a 65°C por 5 min, adicionou-se igual volume do tampão A duplamente concentrado e após resfriamento o RNA foi aplicado na coluna. O eluato foi coletado, aquecido a 65°C, resfriado e aplicado novamente na coluna. Essa etapa foi repetida mais uma vez. A coluna foi então lavada com 5-10 volumes de tampão A. A eluição do RNA poli(A)- foi acompanhada por leitura da densidade óptica a 260nm. Após total eluição do RNA poli(A)- procedeu-se a eluição do RNA poli(A)+ através de lavagem da coluna com 2-3 volumes de: Tris-HCl 10mM, pH7,5, EDTA 1mM. A

elução foi acompanhada por leitura da densidade óptica das frações a 260nm. As frações com maior densidade óptica foram reunidas e o RNA poli(A)+ foi precipitado pela adição de 0,1 volume de acetato de potássio 2M, pH5,0 e 2,2 volumes de etanol absoluto a -20°C. Após uma noite a -20°C, o RNA poli(A)+ foi coletado por centrifugação (13000xg, 10 min), lavado uma vez com etanol e seco sob vácuo. O precipitado obtido foi dissolvido em água e armazenado a -70°C.

5. Tradução do mRNA em lisado de reticulócitos de coelho

O lisado de reticulócitos foi preparado de acordo com Pelham e Jackson (1976) e Jackson e Hunt (1983) e nos foi gentilmente cedido pelos Drs. Cecilia Santos e Ricardo Brentani. A concentração final dos constituintes na mistura de reação (25µl) foi: creatina fosfato 8mM, 19 L-aminoácidos (exceto metionina) 50µM, acetato de magnésio 0,5mM, acetato de potássio 120mM, pH7,5, 16µl do lisado de reticulócitos, 0,5-1,0µg de RNA poli(A)+ ou 4-8µg de RNA total e 50µCi de [³⁵S]metionina. A mistura de reação foi incubada por 90 min a 30°C. Para análise dos produtos resultantes da tradução "in vitro" através de eletroforese unidimensional, uma alíquota de 5µl foi, imediatamente após a reação, ressuspensa em 50µl do tampão da amostra para gel unidimensional e fervida por 3 min. O restante da mistura de reação (20µl) foi ressuspensa em 20µl de tampão de amostra para gel bidimensional duplamente concentrado (uréia 9,5M,

NP-40 4%, DTT 20mM) sem anfolitos. A concentração da uréia foi corrigida pela adição direta de cristais para a concentração final de 9,5M e a dos anfolitos foi também corrigida para 2% de acordo com o sistema eletroforético a ser utilizado (IEF/SDS ou NEPHGE/SDS).

Alguns experimentos de tradução "in vitro" foram feitos utilizando-se lisado de reticulócitos comercial (da Amersham). Neste caso ao lisado (20 μ l) foi adicionado apenas RNA e [35 S]metionina (50 μ Ci), seguindo-se a uma incubação por 90 min a 30°C.

6. Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida contendo SDS

6.1. Eletroforese unidimensional

Foi adotado o sistema de Laemmli (1970), utilizando-se géis de separação de 14cm de largura por 8,5cm de altura e 1mm de espessura. A concentração de acrilamida foi de 10% no gel de separação e 4,5% no de empilhamento. As amostras foram dissolvidas no tampão de amostra (solução D: Tris-HCl 62,5mM, pH6,8, SDS 2,3%, glicerol 10%, DTT 1mM) e fervidas por 3 min. Após resfriamento foi adicionado azul de bromofenol 0,01% e DTT 25mM e em seguida as amostras foram imediatamente aplicadas no gel. As amostras estavam em volumes não maiores que 50 μ l, contendo 20-40 μ g de proteínas totais da célula por canaleta. Como padrão de peso

molecular foi usada uma mistura contendo 3µg das seguintes proteínas de peso molecular conhecido: albumina de soro bovino (67 kDa), IgG (55 e 25 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e lactoglobulina (18 kDa).

As corridas eletroforéticas foram desenvolvidas com amperagem constante de 15mA até ultrapassagem do gel de empilhamento e 20mA (no máximo 200 Volts) no gel de separação, sendo interrompidas quando a linha do corante azul de bromofenol atingia a extremidade inferior do gel.

Após a eletroforese o gel foi corado e fixado com azul de Coomassie 0,2% em metanol 50% e ácido acético 10% e descorado em metanol 30% e ácido acético 7%. Antes da secagem a vácuo o gel foi mergulhado por 30 min em solução de metanol 5% e ácido acético 7% contendo glicerol 3%.

Quando as proteínas estavam marcadas radioativamente com [³⁵S]metionina, o gel, após o descoramento, foi submetido a tratamento com o reagente fluorográfico Amplify (da Amersham) por 30 min, seco a vácuo e exposto a filme de Raios-X (da Kodak) a -70°C.

6.2. Eletroforese bidimensional

Foram empregados dois métodos de eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida: IEF/SDS (focalização isoeletrica, O'Farrell, 1975) e NEPHGE/SDS (eletroforese de não-equilíbrio em gradiente de pH, O'Farrell et al., 1977). Em ambos os métodos as proteínas são separadas na primeira

dimensão, de acordo como o ponto isoelétrico, através de focalização isoelétrica e na segunda dimensão, de acordo com o peso molecular, através de eletroforese em géis contendo SDS. O sistema NEPHGE/SDS separa além das proteínas ácidas, as proteínas mais básicas.

A eletroforese da primeira dimensão foi realizada em tubos de vidro com 2,5mm de diâmetro e 130mm de comprimento, preenchidos com a mistura do gel (uréia 9,2M, Nonidet P-40 2%, acrilamida/bisacrilamida 4%, anfolitos 2%) até a altura de 115mm. A polimerização do gel foi feita pela adição de persulfato de amônio (0,02%) e TEMED (0,1%). Após o preenchimento do tubo com o gel, os mesmos foram cobertos com 20µl de água e deixados polimerizar por no mínimo 2 horas. Antes de iniciar a eletroforese, a água foi removida e a superfície do gel foi seca.

Na primeira dimensão do sistema de equilíbrio (IEF/SDS) foi feita uma pré-corrida em direção ao anodo (200V por 30 min, 300V por 30 min e 400V por 30 min) anterior a aplicação da amostra, para que se estabelecesse o gradiente de pH no gel. Em seguida procedeu-se à aplicação da amostra previamente dissolvida em tampão de amostra (uréia 9,5M, Nonidet P-40 2%, ditiotreitol 10mM e 2% de anfolitos, i.e., 1,6% de anfolitos pH 5-8 e 0,4% de anfolitos pH 3,5-10, da Pharmacia). Sobre a amostra foram adicionados 20µl da solução de cobertura (uréia 6M, Nonidet P-40 2%, ditiotreitol 10mM e 2% de anfolitos, ou seja, pH 3,5-10 e pH 5-8 numa razão de 1:4). Finalmente, o tubo foi preenchido

com NaOH 0,02M. A câmara superior da cuba de eletroforese foi preenchida com NaOH 0,02M e a inferior com H_3PO_4 0,01M. A eletroforese foi feita à temperatura ambiente por 17 horas a 400 Volts. Com a combinação de anfolitos usada (3,5-10 e 5-8 numa razão de 1:4) obtivemos géis com pHs na faixa de 5 a 8.

A primeira dimensão do sistema de não-equilíbrio (NEPHGE/SDS) envolveu uma corrida eletroforética de curta duração (5 horas) a 400 Volts, em direção ao catodo, imediatamente após a aplicação da amostra dissolvida previamente no tampão da amostra (uréia 9,5M, Nonidet P-40 2%, ditiotreitól 10mM e 2% de anfolitos pH 3,5-10). Sobre a amostra foram adicionados 20 μ l da solução de cobertura (uréia 6M, Nonidet P-40 2%, ditiotreitól 10mM e 2% de anfolitos pH 3,5-10) e o tubo foi preenchido com H_3PO_4 0,01M. A câmara superior da cuba de eletroforese foi preenchida com H_3PO_4 0,01M e a inferior com NaOH 0,02M. Com o lote de anfolitos que utilizamos obtivemos géis com pHs na faixa de 4,5 a 9,0.

Tanto para o sistema IEF/SDS como para o NEPHGE/SDS foram usados no máximo 200 μ g de proteína total, em um volume não superior a 60 μ l, em cada eletroforese. No caso de proteínas totais isoladas das células, houve necessidade de uma rápida centrifugação da amostra, antes da aplicação nos géis de 1ª dimensão, para remoção do material celular insolúvel no tampão da amostra.

Após a eletroforese, os géis da primeira dimensão foram equilibrados por 30 min em 5ml de solução D (Tris-HCl 62,5mM, pH6,8, SDS 2,3%, glicerol 10%, DTT 1mM) e a seguir congelados em gelo seco e armazenados por no máximo uma semana a -70°C. A medida de pH dos géis foi feita em potenciômetro com eletrodo de superfície (Ingold) antes da imersão dos géis em solução D.

No dia da eletroforese de segunda dimensão a solução D foi renovada e o géis foram equilibrados por mais 30 min. A eletroforese de segunda dimensão foi feita em gel de poliacrilamida 10% contendo SDS como descrito no item II.6.1., exceto que o gel de separação era de 15cm de largura por 12cm de altura e 1mm de espessura. O gel da 1ª dimensão foi selado ao gel da 2ª dimensão com a mesma solução do gel de empilhamento, da qual haviam sido separados 3ml antes de serem adicionados os agentes polimerizadores (persulfato de amônio e TEMED). Um pequeno pedaço (0,5 cm) de gel de composição similar ao gel da 1ª dimensão, contendo os marcadores de peso molecular (albumina de soro bovino, 67 kDa, ovoalbumina, 45 kDa, IgG, 55 kDa e 25 kDa e lactoglobulina, 18 kDa), foi selado ao lado do gel da 1ª dimensão.

Os pedaços de gel contendo os marcadores de peso molecular foram feitos da seguinte maneira: os padrões de peso molecular foram adicionados a uma solução de gel de 1ª dimensão, que não continha anfolitos, para a concentração final de 50µg/ml e, após a polimerização, o gel foi cortado

em pedaços de 0,5cm e armazenados em solução D (0,5 ml) a -70°C. Antes de serem selados ao gel de 2ª dimensão, foram equilibrados em solução D por 20 min, na presença do corante azul de bromofenol.

Após a eletroforese da 2ª dimensão o gel foi submetido ao mesmo tratamento descrito para os géis unidimensionais no item II.6.1.. Em alguns experimentos os géis bidimensionais foram corados pelo método da prata (Wray et al., 1981); este método de coloração é muito mais sensível que a coloração com azul de Coomassie.

Para análise da variação de síntese de proteínas através da incorporação "in vivo" de [35 S]metionina e posterior separação destas proteínas marcadas em eletroforese bidimensional, foram seguidas as recomendações de Alton e Lodish (1977). Nos géis foram colocadas quantidades equivalentes de proteínas e o tempo de exposição do gel a filme de Raios-X foi calculado de acordo com a incorporação de [35 S]metionina em proteínas durante o pulso administrado, de modo que a exposição fosse a mesma para todas as amostras (1×10^6 cpm colocados no gel equivalem a 24 horas de exposição a -70°C). Além disso, foram feitos vários auto-radiogramas para um mesmo gel, variando-se o tempo de exposição, para se ter certeza sobre a variação na velocidade de síntese de uma determinada proteína.

No caso de proteínas marcadas radioativamente com 32 P, o gel, após a coloração com azul de Coomassie, foi mergulhado em TCA 16%, NaH₂PO₄ 50mM e aquecido a 95°C por 40

min; este tratamento promove a eliminação de contaminantes do tipo RNA ou polifosfatos (Desmarquets et al., 1984). Após a secagem, o gel foi exposto a filme de Raios-X com intensificadores Cronex Quanta II (da Dupont).

7. Procedimento para obtenção de mapa peptídico da Hsp 70

A região do gel bidimensional (IEF/SDS) onde se localiza a proteína Hsp 70 de germes que sofreram choque térmico e a proteína de 70 kDa de células esporulantes (ambas marcadas "in vivo" com [35 S]metionina) foi cortada imediatamente após rápida coloração/descoramento do gel. O fragmento foi incubado com 0,3 μ g de protease V8 de Staphylococcus aureus (da Sigma) para digestão proteolítica parcial como descrito por Cleveland et al. (1977). Os peptídeos foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15%/SDS de 1,5mm de espessura e detectados por fluorografia (item II.6.1).

8. Eletroforese de RNA em gel de agarose

O RNA isolado como descrito no item II.4 foi submetido a eletroforese horizontal em gel de agarose, em condições desnaturantes, para análise da sua integridade ou para sua posterior transferência para filtros de nitrocelulose e hibridização com sondas de DNA.

A eletroforese foi feita em gel de agarose (20cm de comprimento por 14cm de largura e 0,6cm de espessura) como descrito por Maniatis et al., 1982. A mistura do gel continha agarose 1,5%, formaldeído 2,8% e brometo de etídio 0,5µg/ml dissolvidos em tampão de eletroforese de RNA (MOPS 20mM, pH7, acetato de sódio 5mM, EDTA 0,1mM). O RNA (20µg de RNA total ou 2,5µg de RNA poli(A)+) foi ressuspenso em 20µl do tampão de eletroforese de RNA contendo formaldeído 6% e formamida 50% e aquecido a 65°C por 10 min, e em seguida resfriado a 4°C. A essa solução contendo RNA, foram adicionados 2µl da seguinte solução: glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,4%. Após a aplicação da amostra iniciamos a eletroforese em direção ao anodo por 16 horas a 30 Volts. Após a eletroforese o gel foi lavado algumas vezes com água e examinado com luz ultra-violeta para visualização das bandas correspondentes aos RNA ribossomais 25S e 18S (Lovett, 1975).

9. Transferência do RNA para filtros de nitrocelulose e hibridização RNA/DNA

Após a eletroforese em gel de agarose o RNA foi transferido para filtro de nitrocelulose (Gene Screen, da New England Nuclear), como descrito por Southern (1975). O tampão de transferência usado foi SSC 10 vezes concentrado (a composição de SSC é NaCl 0,15M e citrato de sódio 0,015M, pH7). Em seguida, o filtro foi incubado em solução de

hibridização - SSC 6 vezes concentrado , solução de Denhardt 5 vezes concentrada (albumina de soro bovino 1mg/ml, Ficoll 1mg/ml e polivinilpirrolidona 1mg/ml), SDS 0,5%, DNA de timo bovino 100µg/ml, EDTA 0,01M - por 2 horas a 60°C. Esta solução foi removida e o filtro foi então incubado, por 16 horas a 60°C, em solução de hibridização contendo a sonda de DNA desnaturada e radioativamente marcada com ^{32}P . A seguir o filtro foi lavado com quatro trocas de SSC 4 vezes concentrado contendo SDS 0,1% por um total de 2 horas, a 60°C. Após secagem à temperatura ambiente o filtro foi exposto a filme de Raios-X, a -70°C, com o uso de intensificadores Cronex Quanta II (da Dupont).

Como sonda de DNA foi utilizado o plasmídeo B8 (Ingolia et al., 1980). Este plasmídeo, gentilmente cedido pela Dra. E. Craig, corresponde ao vetor pBR322 contendo uma única cópia do gene hsp70 de Drosophila inserido no sítio de restrição para a enzima BamHI. O plasmídeo B8 foi radioativamente marcado com ^{32}P pela reação de "nick-translation" (Maniatis et al., 1982) obtendo-se uma atividade específica maior que 10^7 cpm/µg de DNA. O $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ utilizado na reação de "nick-translation" foi preparado como descrito por Maia et al., 1984.

10. Ensaio de imunoprecipitação

A reação de imunoprecipitação foi feita como descrito por Gomes e Shapiro (1984) com modificações. As células (6×10^6 zoosporângios ou 4×10^7 germes) marcadas com

35 S]metionina foram lisadas por sonicação (microtip, potência nº3, 30 segundos por duas vezes) em 0,5ml de tampão de lavagem (Tris-HCl 0,05M, pH8,3, NaCl 0,45M, Triton X-100 0,5%, sendo que o Triton X-100 é adicionado imediatamente após a sonicação) contendo puromicina 0,5mM, antipaina 50µg/ml e PMSF 1mM e, em seguida, centrifugadas a 12000xg por 5 min. Ao sobrenadante foram adicionados 25µl de células "Staph A" (células de Staphylococcus aureus fixadas com formol, da Bethesda Research Laboratories) suspensas em tampão de lavagem contendo albumina de soro bovino (1mg/ml). Após 30 min de incubação no gelo, foi feita uma centrifugação (12000xg, 1 min) para remoção do material particulado e adsorvido inespecificamente. Ao sobrenadante foi adicionado o antisoro contra a proteína DnaK de Escherichia coli na diluição 1:250 (o antisoro nos foi cedido pelo Dr. C.P. Georgopoulos) e a mistura foi mantida no gelo por 2 horas. A precipitação do complexo antígeno-anticorpo foi feita pela adição de 25µl de células "Staph A". Após 30 min de incubação no gelo, o complexo ligado a "Staph A" foi coletado por centrifugação. As células foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e coletadas por centrifugação. O precipitado foi suspenso em tampão de amostra para eletroforese unidimensional, fervido por 3 min e, em seguida, centrifugado. O sobrenadante foi então submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS.

11. Detecção imunológica de proteínas imobilizadas em filtros de nitrocelulose ("immunoblotting")

11.1. Transferência eletroforética de proteínas de géis de poliacrilamida para filtros de nitrocelulose

Após separação das proteínas por eletroforese uni ou bidimensional em gel de poliacrilamida/SDS, as mesmas foram submetidas a transferência eletroforética para filtro de nitrocelulose como descrito por Towbin et al. (1979) e Burnette (1981). A transferência foi feita a 200mA (45 Volts), por 20 horas a 4°C, utilizando-se o seguinte tampão: Tris-base 25mM, glicina 196mM, metanol 20%. Após o término da transferência o filtro de nitrocelulose ("blot") foi corado por 5 min com solução de Ponceau-S 0,1% em ácido acético 10% e em seguida descorado com água bidestilada.

11.2. Detecção imunológica das proteínas do "blot"

Após transferência, coloração e descoramento, a região do filtro de nitrocelulose que contém os marcadores de peso molecular foi cortada e seca ao ambiente. O restante do "blot" foi imediatamente incubado por 30 min em TBS (Tris-HCl 10mM, pH7,5, NaCl 150mM) contendo leite em pó desnatado (Molico) 5% e NaN_3 0,05%, para saturação de sítios inespecíficos de ligação. Em seguida o filtro foi incubado em outra porção desta mesma solução contendo o anticorpo

apropriado na diluição 1:500, por 14 horas, à temperatura ambiente, sob agitação branda. Foram usados os seguintes anticorpos monoclonais (da Amersham) feitos em camundongo: anti-actina (contra actina de músculo esquelético de galinha), anti- α -tubulina e anti- β -tubulina (contra α e β -tubulinas de microtúbulos de cérebro de galinha). Após a incubação com os anticorpos, os "blots" foram lavados com TBS por 30 min com várias trocas para a remoção dos anticorpos não ligados.

Para revelação do complexo antígeno-anticorpo utilizamos um método de detecção imunoenzimática, através de anticorpos conjugados à enzima peroxidase (Towbin et al., 1979). Assim, após a incubação com os anticorpos monoclonais, o "blot" foi incubado com um segundo anticorpo anti-IgG de camundongo (da Cappel) desenvolvido em coelho (diluição 1:500). Após 60 min de incubação, o filtro foi lavado com TBS por 30 min e em seguida incubado por 60 min com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase) na diluição 1:500. Após lavagem do filtro com TBS por 30 min foi feita a reação enzimática usando-se diaminobenzidina (0,5mg/ml em Na_2HPO_4 8,0mM/ KH_2PO_4 1,5mM pH7, KCl 2,7mM, NaCl 137mM) e H_2O_2 (1 μ l/ml de uma solução 30%). A banda correspondente ao complexo antígeno-anticorpo desenvolveu cor marrom em 5-10min. A reação foi interrompida pela adição de H_2O destilada. O filtro foi então lavado várias vezes em água e seco ao

ambiente ou submetido imediatamente à reação com outro anticorpo em alguns casos.

Em alguns experimentos as proteínas do "blot" estavam marcadas com [35 S]metionina. Neste caso, após a revelação do complexo imunoenzimático, o filtro foi tratado por 30 min com reagente fluorográfico Amplify (da Amersham), seco ao ambiente e exposto a filme de Raios-X, a -70°C .

Também foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-Hsp70, na diluição 1:500, (contra a proteína Hsp70 de Drosophila) desenvolvido em rato. Como segundo anticorpo utilizou-se anti-IgG de rato, desenvolvido em coelho, procedendo-se em seguida à revelação do complexo antígeno-anticorpo com o conjugado imunoenzimático, como descrito acima. Os anticorpos anti-Hsp70 e anti-IgG de rato nos foram gentilmente cedidos pelos Drs. S. Lindquist e J.D. Lopes, respectivamente.

O conjugado imunoenzimático que utilizamos correspondia a fração IgG dos soros de carneiros (anti-IgG de coelho) que foi acoplada com peroxidase pelo método descrito por Nakane e Kawaoi (1974) e nos foi gentilmente cedido por Glaucia S. Paranhos.

12. Purificação de tubulina de flagelo de zoósporos

O isolamento de microtúbulos de flagelo de zoósporos para a obtenção de tubulina foi feito como descrito por Abe e Lovett (1982) e Kowit e Fulton (1974). Os zoósporos

obtidos após a esporulação de células crescidas em meio PYG-P (ítem II.1.2.) foram ressuspensos em Tris-HCl 25mM, pH7,5 na concentração de 4×10^8 zoósporos/ml e desflagelados através de vigorosa agitação (Vortex, 20 segundos por duas vezes). A suspensão de zoósporos e flagelos foi centrifugada a 755xg por 2,5 min (4°C) e, em seguida, o sobrenadante contendo apenas os flagelos foi centrifugado a 12000xg por 10 min. O precipitado contendo os flagelos foi ressuspenso em 0,5ml de lauril sarcosinato de sódio 0,075%, Tris-HCl 38mM pH7,6 e EDTA 0,3mM e, após incubação por 30 min a 4°C, foi centrifugado a 100000xg por 30 min. Este tratamento com detergente rompe as membranas flagelares, liberando os microtúbulos. O precipitado obtido foi ressuspenso em 0,3ml de tampão B (Tris-HCl 25mM pH7,6, DTT 0,1mM, EGTA 0,1mM, GTP 0,1mM) adicionando-se em seguida 0,3ml de um tampão contendo lauril sarcosinato de sódio 0,3%, Tris-HCl 25mM, pH7,6, DTT 0,1mM e EDTA 0,4mM. Após incubação a 4°C por 30 min a suspensão foi centrifugada a 27000xg por 25 min. O precipitado foi ressuspenso em 0,1ml do tampão B e as proteínas foram precipitadas pela adição de 8ml de acetona gelada e centrifugação a 12000xg por 10 min. O precipitado após lavagem com acetona e secagem a vácuo foi ressuspenso em tampão de eletroforese bidimensional (O'Farrell, 1975). A eletroforese no sistema IEF/SDS (ítem II.6.2) permitiu a visualização, após coloração do gel com azul de Coomassie, de duas bandas majoritárias de 56 e 55 kDa de peso molecular

sendo a banda de 55 kDa predominante e ligeiramente mais ácida.

13. Separação dos derivados fosforilados da proteína ribossomal S6

13.1. Extração de proteínas ribossomais

O sedimento de células congeladas (5×10^7 células esporulantes ou $4-5 \times 10^8$ germes) obtidas como descrito nos itens II.1.3 e 1.4, foi descongelado na presença de 1,5ml de tampão de lise contendo tampão fosfato de sódio 50mM, pH7, NaF 50mM, KCl 250mM, DTT 1mM e PMSF 0,15mg/ml, para evitar a desfosforilação da proteína S6 (Bonato et al., 1984). A seguir, foram lisadas pela passagem em "French Press" por 3 vezes seguidas à pressão de 400 psi. Os extratos foram imediatamente centrifugados a 12000xg, por 10 min, a 4°C, para eliminação de células não rompidas e restos de parede celular. Ao sobrenadante foi adicionado $MgCl_2$ para concentração final de 3mM. Os ribossomos aí presentes foram sedimentados a 39000 rpm por 90 min em rotor Spinco 50Ti.

Em seguida as proteínas ribossomais foram extraídas com ácido acético como descrito por Hardy et al. (1969). O precipitado contendo os ribossomos foi ressuspense em 150 μ l de $MgCl_2$ 0,2M, adicionando-se imediatamente 2 volumes de ácido acético vagarosamente, sob agitação. Após 45 min a 4°C, sob agitação, a suspensão foi centrifugada a 12000xg

por 15 min. Ao sobrenadante foram adicionados 5 volumes de acetona fria e após precipitação a -20°C , por uma noite, as proteínas ribossomais foram coletadas por centrifugação a $4000\times g$ por 10 min. O precipitado obtido foi lavado com acetona, seco a vácuo durante 5 min e armazenado a -20°C .

13.2. Eletroforese bidimensional para separação dos derivados fosforilados de S6

Para a visualização das subespécies fosforiladas da proteína ribossomal S6 utilizamos o sistema eletroforético bidimensional básico/ácido (Lastick e McConkey, 1976) como descrito por Bonato et al. (1984, 1985). Este sistema eletroforético separa os diferentes derivados fosforilados de acordo com o número de fosfatos de cada derivado (Gressner e Wool, 1974), sendo que quanto maior o nível de fosforilação, menor a migração eletroforética do derivado.

As proteínas ribossomais purificadas (300 μg) foram dissolvidas em 60 μl de um tampão contendo uréia 10M, Tris/borato 20mM, pH8,6, EDTA 1mM, ditiotreitól 15mM e aquecidas a 60°C , por 10 min, antes da aplicação ao gel da primeira dimensão.

Para a primeira dimensão foram usados tubos de vidro (130 x 3mm de diâmetro) preenchidos até a altura de 115mm com gel de separação (Tris/borato 200mM, pH8,6, acrilamida 4%, bisacrilamida 0,1%, uréia 8M, EDTA 10mM). A eletroforese foi feita em direção ao catodo por 20 horas a 105 Volts

utilizando-se o seguinte tampão do eletrodo: Tris/borato 60mM, pH8,6, EDTA 3mM, 2-mercaptoetilamina 0,02%. Após o término da corrida os géis foram armazenados a -70°C em solução de equilíbrio (glicina/ácido acético 46mM, pH4, uréia 6M, 2-mercaptoetanol 1%, glicerol 10%). A separação das proteínas na segunda dimensão foi feita em gel com 20cm de largura por 15cm de altura e 0,1cm de espessura contendo: acrilamida 18%, bisacrilamida 0,5%, uréia 6M, ácido acético/KOH 0,44M, pH4,5. A corrida foi feita em direção ao catodo a 135 Volts por 20 horas, utilizando tampão glicina/ácido acético 93mM, pH4, contendo 2-mercaptoetilamina 0,02%. Terminada a eletroforese o gel foi corado, descorado e seco como descrito no item II.6.1.

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Análise das variações no padrão de síntese de proteínas totais durante a esporulação e a germinação em *Blastocladiella emersonii*.

Para investigar a regulação da síntese proteica durante a esporulação e a germinação do fungo *Blastocladiella emersonii* utilizamos eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida em dois sistemas eletroforéticos (IEF/SDS e NEPHGE/SDS) para a análise das proteínas sintetizadas "in vivo", bem como dos produtos resultantes da tradução "in vitro" dos RNAs mensageiros isolados nos diferentes estágios das duas fases de citodiferenciação do fungo.

1.1. Síntese de proteínas durante a esporulação

1.1.1. Obtenção das proteínas totais na ausência de proteólise

Para a obtenção de perfis reprodutíveis de eletroforese bidimensional é necessário que a obtenção das proteínas totais das células seja feita em completa ausência de proteólise. Sendo conhecido que o zoósporo de *B.emersonii* é uma célula rica em proteases (Correa et al., 1978, 1979; Brochetto-Braga et al., 1982; Gomes et al., 1983), utilizamos estas células para estabelecermos uma condição de

lise celular, na qual a proteólise fosse evitada. A figura 1 compara dois métodos de lise de zoósporos que tiveram as suas proteínas marcadas "in vivo" com ^{35}S metionina ao longo de toda a esporulação. No primeiro método, os zoósporos foram centrifugados, congelados e descongelados na presença do tampão de amostra de eletroforese bidimensional (uréia 9,5M, NP-40 2%, DTT 10mM, anfolitos 2%) e, imediatamente, submetidos à eletroforese. No segundo método, as células foram, imediatamente após a centrifugação, submetidas ao tratamento com TCA 10% descrito no item 2 de Procedimentos Experimentais. Como podemos verificar, os padrões eletroforéticos obtidos nas duas condições são completamente diferentes. No primeiro método (Fig.1A), obtivemos um perfil eletroforético com um grande número de polipeptídios de baixo peso molecular, quando comparado ao perfil eletroforético obtido com células tratadas com TCA 10% (Fig.1B), indicando que a proteólise pode ocorrer mesmo na presença de 9,5M de uréia.

Testamos também a lise de zoósporos na presença de MES 20mM, pH6,5, EDTA 1mM, EGTA 1mM, glicerol 10%, DTT 4mM, PMSF 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$, antipaina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Gomes et al., 1983). Contudo, mesmo na presença de inibidores de proteólise, os perfis eletroforéticos obtidos não foram reprodutíveis (resultado não mostrado).

O tratamento com TCA foi, portanto, a condição de escolha, por evitar a proteólise, além de permitir a sonicação das células, uma vez que os demais fenótipos

Figura 1 - Eletroforese bidimensional (NEPHGE/SDS) de proteínas totais isoladas de zoósporos. As células foram marcadas com [³⁵S]metionina ao longo da esporulação e os zoósporos obtidos foram congelados e descongelados na presença de tampão de eletroforese bidimensional (A) ou imediatamente precipitados com TCA como descrito em Procedimentos Experimentais (B). As setas à esquerda (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo).

celulares de B.emersonii possuem parede celular e não lisam pelo simples congelamento e descongelamento.

1.1.2. Padrão das proteínas sintetizadas "in vivo"

Durante a esporulação foram administrados pulsos consecutivos de 30 minutos com [³⁵S]metionina, sendo que após cada pulso as células foram coletadas por centrifugação e, imediatamente, submetidas ao tratamento com TCA 10%. Após extração as proteínas foram analisadas em eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida no sistema de equilíbrio, IEF/SDS (O'Farrell, 1975) que detecta proteínas com pI entre 5,5 e 8,0 e no sistema de não equilíbrio, NEPHGE/SDS (O'Farrell et al., 1977), que detecta além das proteínas ácidas, as proteínas mais básicas (pI entre 4,5 e 9,0).

A análise da variação da velocidade de síntese das proteínas ao longo da esporulação foi feita pela comparação dos géis das proteínas sintetizadas em cada momento (pulso) da esporulação. A identificação das proteínas nos vários auto-radiogramas foi feita através do pI e do peso molecular relativo dessas proteínas, e também através da superposição de desenhos correspondentes aos auto-radiogramas. Foram realizados dois experimentos idênticos, sendo que, da comparação de ambos, pudemos definir as variações que ocorrem no padrão de síntese das proteínas totais ao longo da esporulação. Um total de 400 polipeptídios foram

detectados no sistema IEF/SDS e a síntese de 85 foi analisada. A síntese dos polipeptídeos básicos foi analisada no sistema NEPHGE/SDS e um total de 23 polipeptídeos puderam ser inequivocamente identificados na porção mais básica do gel.

As figuras 2 e 3 mostram os perfis eletroforéticos obtidos quando as proteínas sintetizadas nos diferentes estágios da esporulação foram analisadas, respectivamente, nos sistemas IEF/SDS e NEPHGE/SDS. A comparação dos vários auto-radiogramas revela a ocorrência de uma extensa variação na velocidade relativa da síntese de um grande número de proteínas. Já nos 30 min iniciais da esporulação podemos observar várias mudanças no padrão de síntese. Quando comparamos o padrão das proteínas sintetizadas entre 0-30 min (Fig.2B, Fig.3B) com o padrão das proteínas sintetizadas pelas células vegetativas durante os 45 min finais do crescimento (Fig.2A, Fig.3A), podemos notar que a maioria das proteínas sintetizadas durante os 30 min iniciais da esporulação não foram detectadas entre as proteínas sintetizadas durante o final do crescimento. Algumas das proteínas sintetizadas pelas células vegetativas (por exemplo: 8, 9, 27, 28, 30, 31) sofreram decréscimo na sua síntese logo no início da esporulação e outras tiveram sua síntese mantida por toda a esporulação (1 a 5).

Durante o início da esporulação a velocidade relativa da síntese de algumas proteínas (por exemplo: 17 a 19, 21 a 26, 30 a 33, 86 a 88) diminui, enquanto outras proteínas tem

Figura 2 - Legenda na página seguinte

Figura 2 - Eletroforese bidimensional (IEF/SDS) de proteínas sintetizadas durante a esporulação. As células foram marcadas com ^{35}S metionina por períodos de 30 min, tratadas com TCA e as proteínas totais submetidas à eletroforese. São mostrados os auto-radiogramas dos géis correspondentes às proteínas sintetizadas durante o crescimento (A) e nos intervalos 0-30 (B), 30-60 (C), 60-90 (D), 90-120 (E), 120-150 (F), 150-180 (G), 180-210 (H) min após indução da esporulação. As setas à esquerda (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo). Aos 120 min mais que 90% das células apresentavam papila, e aos 240 min mais que 90% das células já haviam liberado os zoósporos

Figura 3 - Eletroforese bidimensional (NEPHGE/SDS) de proteínas sintetizadas durante a esporulação. Como descrito na Figura 2.

sua velocidade de síntese aumentada (por exemplo: 34, 38, 41, 42, 89). Um certo número de proteínas não mostraram variação na sua síntese (por exemplo: 1-5) e, provavelmente, correspondem à proteínas indispensáveis à manutenção da célula.

Uma correlação entre o aumento da síntese de algumas proteínas com a sucessão de eventos morfológicos que ocorrem na esporulação pode ser feita. Assim, o aumento da síntese das proteínas nº 34, 41, 42, 45, 46, 90, 91 coincide com o aparecimento do septo basal do zoosporângio (60-90 min) e das proteínas nº 44, 50, 92, 93, 94 coincide com a formação da papila (120 min). A partir dos 150 min de esporulação ocorrem mudanças profundas no padrão de síntese proteica, o que coincide com a fase de diferenciação dos zoósporos. A maioria dessas proteínas são proteínas básicas (96 a 108), que são sintetizadas exclusivamente na esporulação mais tardia (Fig.3H).

O quadro apresentado na figura 4 esquematiza a variação da síntese dos polipeptídios analisados pela comparação dos perfis eletroforéticos bidimensionais das figuras 2 e 3.

Com o objetivo de detectar alterações no acúmulo em massa das proteínas durante a esporulação, géis bidimensionais foram submetidos à coloração pela prata (Wray et al., 1981). Este método de coloração é muito mais sensível que a coloração com azul de Coomassie; contudo, como esta coloração interfere na fluorografia (Morrissey, 1981), foram necessárias corridas eletroforéticas

Figura 4 - Quadro esquemático da variação da síntese das proteínas durante a esporulação. Os números nas laterais (1 a 85) correspondem às proteínas analisadas como descrito na Figura 2 (IEF/SDS) e os números (86-108) correspondem às proteínas analisadas como descrito na Figura 3 (NEPHGE/SDS). Linha sólida indica síntese máxima, linha descontínua indica síntese e ausência de linha indica que nenhuma síntese foi detectada.

independentes para as amostras que foram analisadas pelos dois métodos, fluorografia e coloração pela prata.

Os eletroferogramas corados pela prata, mostrados nas Figs. 5 e 6, são relativos às proteínas isoladas de células vegetativas, zoosporângios de 60, 120 e 180 min e de zoósporos, que foram analisadas nos dois sistemas eletroforéticos IEF/SDS e NEPHGE/SDS, respectivamente. A comparação destes eletroferogramas revelou pouquíssima variação no padrão de proteínas totais acumuladas durante toda a esporulação, ao contrário da enorme variação que foi verificada no padrão de síntese de proteínas. Muitas das proteínas intensamente marcadas com [35 S]metionina (por exemplo 11, 25, 58, 59, 68, Fig.2), e inclusive aquelas proteínas básicas (96 a 108, Fig.3), não foram detectadas nos géis corados pela prata e, provavelmente, correspondem a proteínas cujo conteúdo é minoritário em relação a quantidade de proteína total da célula.

No entanto, algumas proteínas sintetizadas durante a esporulação puderam ser identificadas nos eletroferogramas corados pela prata. Embora a velocidade relativa da síntese de alguns destes polipeptídios apresentasse variação durante o desenvolvimento, os seus conteúdos em massa permaneceram constantes durante toda a esporulação, pelo menos dentro da sensibilidade do método de coloração. Por exemplo, a proteína 87, uma proteína básica que é sintetizada pelas células vegetativas e cuja síntese diminui aos 90 min da esporulação (Figs.3 e 4), permanece constante em massa

Figura 5 - Géis bidimensionais (IEF/SDS) corados pelo método da prata. Proteínas totais isoladas de células em crescimento (A), células esporulantes de 60 min (B), 120 min (C), 180 min (D) e de zoósporos (E) foram submetidas à eletroforese bidimensional e os géis obtidos foram corados pelo método da prata. As setas à esquerda dos géis representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo). As proteínas numeradas correspondem às proteínas sintetizadas "in vivo" e identificadas na Fig.2.

Figura 6 - Géis bidimensionais (NEPHGE/SDS) corados pelo método da prata. Como descrito na figura 5. As proteínas numeradas correspondem às proteínas sintetizadas "in vivo" e identificadas na Fig.3.

durante toda a esporulação, sendo mantida inclusive nos zoósporos, o que demonstra sua extrema estabilidade. As proteínas 18, 30 e 31 são também proteínas típicas de crescimento (Fig.2A) e embora a velocidade de sua síntese diminua durante a esporulação (Fig.4), são visualizadas, pela coloração da prata, entre as proteínas dos zoósporos (Fig.5E).

A proteína 61, uma proteína cuja síntese é controlada pelo desenvolvimento, foi a única proteína cujo aumento de síntese foi correlacionado com um aumento na quantidade em massa. Essa proteína corresponde à actina como será demonstrado no item III.1.3.

1.1.3. Tradução "in vitro" de RNAs isolados durante a esporulação

Os mRNAs poli(A)⁺ isolados de células de diferentes estágios da esporulação foram traduzidos em lisado de reticulócitos de coelho. Os produtos resultantes da tradução "in vitro" desses mRNAs poli(A)⁺ foram separados em eletroforese unidimensional e em eletroforese bidimensional nos sistemas IEF/SDS e NEPHGE/SDS.

O auto-radiograma da eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida, apresentado na Fig.7, mostra os produtos resultantes da tradução "in vitro" de duas concentrações diferentes (0,5µg e 1,0µg) do RNA poli(A)⁺ isolado de células vegetativas, células de 60, 120 e 180 min de

Figura 7 - Eletroforese unidimensional dos produtos de tradução "in vitro" de RNAs poli(A)⁺ isolados de diferentes fases da esporulação: células vegetativas (2), células esporulantes de 60 min (3,4), 120 min (5,6), 180 min (7,8) e zoósporos (9,10). Nos ensaios foram usadas duas concentrações de RNA poli(A)⁺: 0,5µg (2,3,5,7,9) e 1,0µg (4,6,8,10). No gel foram colocados 5µl do ensaio. A canaleta 1 corresponde ao ensaio em que não foi adicionado RNA (atividade endógena do lisado de reticulócitos). As setas à esquerda do auto-radiograma representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45, 25 kDa, de cima para baixo).

esporulação e de zoósporos. Da análise do gel unidimensional podemos concluir que os ensaios onde foram utilizadas 0,5 µg de RNA poli(A)+ foram mais eficientes. O restante das amostras correspondentes a esses ensaios mais eficientes foi então analisado através de eletroforese bidimensional.

Os perfis eletroforéticos, obtidos nos sistemas IEF/SDS (Fig.8) e NEPHGE/SDS (Fig.9), das proteínas sintetizadas "in vitro" a partir dos RNAs poli(A)+ de células vegetativas, células de 60, 120 e 180 min de esporulação e de zoósporos, mostram a drástica variação que ocorre na população do RNA poli(A)+ traduzível, como era de se esperar dada a intensa variação que havíamos detectado no padrão de síntese proteica "in vivo".

A maioria dos RNAs poli(A)+ encontrados nas células vegetativas (Figs.8A e 9A) desaparece após 60 min da indução da esporulação, surgindo, então, novas populações de RNA poli(A)+ em cada estágio da esporulação. O padrão das proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de RNAs poli(A)+ isolados de zoósporos é bastante distinto dos demais padrões obtidos. Aparentemente, poucos mensageiros sintetizados durante o crescimento e esporulação até 180 min são conservados nos zoósporos (Figs.8E e 9E). Resultados similares foram obtidos quando utilizamos RNA total para a tradução "in vitro" (não mostrado). Além disso, o padrão das proteínas sintetizadas "in vitro" a partir do RNA poli(A)+ (Fig.10A) e do RNA total (Fig.10B) de zoósporos é idêntico,

Figura 8 - Eletroforese bidimensional (IEF/SDS) dos produtos de tradução "in vitro" de RNAs poli(A)⁺ isolados de diferentes fases da esporulação: células vegetativas (A), células esporulantes de 60 min (B), 120 min (C), 180 min (D) e zoósporos (E). Os quadrados indicam polipeptídios cujo mRNA poli(A)⁺ é conservado nos zoósporos. As proteínas numeradas correspondem às proteínas sintetizadas "in vivo" e identificadas na Fig.2. As setas à esquerda dos autoradiogramas representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo).

Figura 9 - Eletroforese bidimensional (NEPHGE/SDS) dos produtos da tradução "in vitro" de RNAs poli(A)⁺ de diferentes fases da esporulação: células vegetativas (A), células esporulantes de 60 min (B), 120 min (C), 180 min (D) e zoósporos (E). As proteínas numeradas correspondem às proteínas sintetizadas "in vivo" e identificadas na Fig.3. As setas à esquerda dos auto-radiogramas representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo).

Figura 10 - Comparação das proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de RNA poli(A)⁺ e RNA total isolado de zoósporos. RNA poli(A)⁺ (A) e RNA total (B) de zoósporos foram traduzidos "in vitro" e os polipeptídeos resultantes foram analisados através de eletroforese bidimensional (IEF/SDS). As setas à direita (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo).

com apenas algumas variações na intensidade de algumas proteínas. Essa similaridade reflete a provável inexistência de diferenças entre a população de RNA poli(A)⁻ e RNA poli(A)⁺ de zoósporos.

Através da comparação do padrão das proteínas sintetizadas "in vivo" com o padrão dos produtos da tradução "in vitro" de RNAs poli(A)⁺ das diferentes fases da esporulação, identificamos algumas das proteínas sintetizadas "in vivo" entre as proteínas sintetizadas "in vitro" (Figs.8 e 9). Entretanto, vários produtos da tradução "in vitro" não correspondem às proteínas sintetizadas "in vivo" e várias proteínas resultantes da síntese "in vivo" não foram encontradas entre os produtos de tradução "in vitro".

A maioria das proteínas básicas (96 a 108) sintetizadas "in vivo" no final da esporulação (150-180 min) foram também sintetizadas "in vitro" a partir dos mRNAs poli(A)⁺ extraídos das células de 180 min (compare as Figs.3H e 9D). Outras proteínas, cuja síntese é controlada pelo desenvolvimento, como por exemplo 37, 45, 50, 58, 59 e 61 foram também identificadas na tradução "in vitro" (compare as Figs.2 e 8). As variações na síntese destas proteínas observadas durante a esporulação acompanham as variações na concentração dos seus respectivos RNAs mensageiros, sugerindo um controle ao nível da transcrição para os genes que codificam estas proteínas.

Um exemplo de controle ao nível da tradução foi verificado para a proteína 87. Esta proteína é sintetizada pelas células vegetativas e também no início da esporulação, porém o mRNA para esta proteína existe durante toda a esporulação persistindo inclusive nos zoósporos (Fig.9).

1.1.4. Discussão

Como mostrado para os zoósporos (Fig.1), foi necessária uma cuidadosa extração das proteínas para evitarmos a intensa proteólise que normalmente se verifica nas células de B.emersonii (Correa et al., 1978, 1979; Brochetto-Braga et al., 1982; Gomes et al., 1983). A degradação de proteínas parece ser um evento essencial para a conversão das células vegetativas em zoosporângios (Correa et al., 1978). Durante a esporulação, pelo menos 35% das proteínas das células vegetativas são completamente hidrolisadas pela maquinaria celular responsável pela proteólise (Lodi e Sonneborn, 1974). Estes dados podem ser correlacionados com as dramáticas variações que observamos no padrão das proteínas sintetizadas durante a esporulação.

Durante a esporulação de B.emersonii encontramos mudanças muito rápidas no padrão das proteínas sintetizadas nas diferentes fases, de acordo com a análise através da eletroforese bidimensional. Em adição às proteínas feitas ao longo de toda a esporulação, as quais são provavelmente indispensáveis para a manutenção de funções básicas da

célula, observamos um grande número de proteínas cuja síntese é restrita a um determinado intervalo da esporulação. Estas proteínas podem ser classificadas como proteínas cuja síntese é crítica para a transição de um estágio da esporulação ao estágio seguinte. Outro grupo contém proteínas cuja síntese inicia-se entre 60 e 90 min e é mantida até o final da esporulação. Coincidente com a fase de diferenciação dos zoósporos (150-210 min), ocorre a síntese de um outro grupo de proteínas, a maioria sendo proteínas básicas.

Estudos anteriores demonstraram que alguns dos RNA poli(A)+ presentes nas células em crescimento eram conservados nos zoósporos e que, em contraste, a maioria do RNA poli(A)+ sintetizado durante toda a esporulação era degradado e apenas aqueles produzidos no últimos minutos da esporulação eram preferencialmente armazenados nos zoósporos; cerca de um terço do mRNA mantido nos zoósporos correspondia ao RNA transcrito durante os 30 minutos finais da esporulação (Jaworski e Thomson, 1980). Contudo, nada era conhecido sobre as proteínas que eram codificadas por esses mRNAs.

Nossos resultados indicam que a intensa variação do padrão das proteínas sintetizadas "in vivo" durante a esporulação reflete a extrema variabilidade da população de mRNAs, como demonstrado através da análise dos produtos da tradução "in vitro" dos RNAs poli(A)+ isolados em diferentes estágios da esporulação. A esporulação é caracterizada pelo

desaparecimento de certas mensagens presentes durante o crescimento e pelo aumento na quantidade de mRNAs estágio-específicos. Estes mRNAs estágio-específicos são rapidamente renovados, provocando as numerosas variações que verificamos nos padrões bidimensionais dos produtos da tradução "in vitro" dirigida pelos RNAs poli(A)+ isolados de células de 60, 120 e 180 min da esporulação. A maioria das mensagens estágio-específicas desaparecem, não sendo encontrada entre a população de mensagens que é armazenada nos zoósporos, sendo que poucas mensagens sintetizadas na esporulação e crescimento foram conservadas nos zoósporos. Estes dados levam à conclusão que uma quantidade substancial do mRNA poli(A)+ presente nos zoósporos foi sintetizada nos últimos 30 minutos da esporulação. Os zoósporos também contêm RNA não-poliadenilado (Jaworski et al., 1976; Johnson e Lovett, 1984a). Contudo excluimos uma possível diferença entre esta população não-poliadenilada e a população poliadenilada, uma vez que o padrão bidimensional dos produtos da tradução "in vitro" do RNA total é semelhante ao obtido pela tradução "in vitro" do RNA poli(A)+. Provavelmente muitas mensagens são encontradas em ambas as populações de RNAs de zoósporos.

A síntese "in vivo" de algumas proteínas, síntese essa regulada pelo desenvolvimento, coincide com o momento em que os RNAs poli(A)+ específicos para estas proteínas podem ser identificados através da tradução "in vitro". Este fato sugere que os genes que codificam para essas proteínas estão

sob um controle ao nível da transcrição. Contudo, poderia estar ocorrendo um controle ao nível de adenilação/desadenilação e que não estaria sendo detectado pelo nosso ensaio de tradução "in vitro". Palatnik et al. (1984) sugeriram que o grau de adenilação de RNAs pode depender do estado de desenvolvimento da célula. Nossos resultados, contudo, descartam esta possibilidade, uma vez que a tradução "in vitro" do RNA total isolado nas diferentes fases da esporulação e de zoósporos confirmam que a maioria das variações no padrão das proteínas sintetizadas "in vivo" estão sob um controle ao nível da transcrição.

No entanto, é necessário considerar que apesar das intensa variação na população de RNA poli(A)+, várias proteínas sintetizadas "in vivo" não foram identificadas entre os produtos de tradução "in vitro". Este fato provavelmente é devido a incapacidade do sistema de tradução "in vitro" de realizar processamento ou modificações pós-tradução nas proteínas sintetizadas, como provavelmente ocorre após a síntese "in vivo".

Através de estudos de hibridização RNA/DNA em solução, Johnson e Lovett (1984b) mostraram que 80% da complexidade do genoma era expresso ao longo da esporulação, mas apenas 40% era conservado nos zoósporos. Nós não podemos comparar diretamente nossos estudos com os estudos de hibridização de Johnson e Lovett, uma vez que eles não estudaram as variações nas diferentes classes do mRNA (abundante, intermediária e escassa) durante a esporulação. O

procedimento que utilizamos detecta apenas proteínas codificadas por mRNAs das classes abundante e intermediária. Apesar das limitações do sistema de tradução "in vitro", nossos estudos mostraram a ocorrência de variações na população de mRNA ao longo da esporulação. O fato de que a maioria das mensagens específicas da esporulação não está presente nos zoósporos maduros correlaciona-se bem com o resultado de Johnson e Lovett (1984b), que indica que metade da complexidade expressa durante a esporulação não se encontra entre o grupo de mRNAs armazenados nos zoósporos.

1.2. Síntese de proteínas durante a germinação

Durante a germinação em meio inorgânico e em meio nutriente contendo ou não actinomicina D (5µg/ml) foram administrados pulsos de [35 S]metionina, consecutivos e com duração de 10 minutos. As proteínas totais marcadas radioativamente foram analisadas através de eletroforese bidimensional (IEF/SDS e NEPHGE/SDS). Precauções com a proteólise também foram tomadas como comentado no item III.1.1.1. A figura 11 compara dois métodos de lise de germes que tiveram suas proteínas marcadas "in vivo" com [35 S]metionina ao longo de toda a germinação, confirmando, assim, a eficiência do tratamento com TCA 10% para se evitar a proteólise.

A radioatividade incorporada em proteínas durante a germinação em solução inorgânica ou meio nutriente na ausência e presença de actinomicina D foi medida pelo método de precipitação com TCA a quente. O resultado dessa quantificação está apresentado na Fig.12. Em solução inorgânica o rápido aumento da incorporação foi seguido por um platô (Fig.12A), enquanto que em meio nutriente a incorporação aumenta exponencialmente, embora a porcentagem total de radioatividade incorporada tenha sido bem menor devido à presença de metionina não-radioativa neste meio (Fig.12B). Na presença de 5µg/ml de actinomicina D, concentração esta capaz de inibir 95% da incorporação de uridina (Leaver e Lovett, 1974; nossos resultados não

Figura 11 - Eletroforese bidimensional (NEPHGE/SDS) de proteínas isoladas de germes. As células foram marcadas com $[^{35}S]$ metionina ao longo da germinação e os germes foram congelados e descongelados na presença de tampão de eletroforese bidimensional (A) ou imediatamente precipitados com TCA como descrito em Procedimentos Experimentais (B). As setas à esquerda (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 kDa, de cima para baixo).

mostrados), a cinética e a sincronia da germinação foram similares ao controle, pelo menos até os 50 min. Após este momento parece ocorrer uma inibição da elongação do tubo germinativo. O aumento inicial na incorporação de metionina não foi afetado por este inibidor; contudo, após 25 min foi observado um decréscimo significativo na incorporação de [35 S]metionina nas células tratadas com actinomicina D.

1.2.1. Padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em solução inorgânica

A eletroforese bidimensional no sistema IEF/SDS permitiu a detecção de aproximadamente 400 polipeptídios sintetizados durante a germinação em meio inorgânico, sendo que a síntese de 150 foi analisada. As proteínas mais básicas foram analisadas no sistema NEPHGE/SDS e um total de 20 polipeptídios básicos foram identificados na região mais básica do gel. A figura 13 mostra os perfis eletroforéticos das proteínas sintetizadas durante o início da germinação em solução inorgânica, na ausência e na presença de actinomicina D. Durante o primeiro pulso (5 a 15 min), não foi detectada incorporação de [35 S]metionina (Fig.12A); contudo, uma exposição prolongada do gel ao filme de Raios-X permitiu a detecção de síntese proteica neste pulso inicial (Fig.13A). O padrão das proteínas sintetizadas nos intervalos 5 a 15 e 15 a 25 min, na presença ou ausência de actinomicina D, é praticamente idêntico (Fig.13), indicando

Figura 12 - Efeito de actinomicina D na incorporação de $[^{35}\text{S}]$ metionina em proteínas totais durante a germinação. Células foram marcadas com $[^{35}\text{S}]$ metionina por intervalos de 10 min durante a germinação em meio inorgânico (A) ou meio nutriente (B) na presença (barra hachurada) ou ausência (barra vazia) de actinomicina D ($5\mu\text{g/ml}$). Em todos os casos a germinação foi sincrônica; após 20 min virtualmente 100% das células correspondiam ao fenótipo célula redonda e, após 45 min, 100% das células correspondiam a germes.

Figura 13 - Padrão das proteínas sintetizadas durante o início da germinação. Zoósporos foram induzidos a germinar em solução inorgânica na presença (B,D,F) ou ausência (A,C,E) de actinomicina D, que foi adicionada no tempo zero. As células foram marcadas com [³⁵S]metionina por 10 min nos intervalos indicados e as proteínas totais foram extraídas e analisadas através de eletroforese bidimensional. As setas à esquerda (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

que os zoósporos contém mRNA armazenado, que é traduzido já nos primeiros minutos de indução da germinação. Os polipeptídios mais proeminentes foram numerados (1 a 39). Apenas um único polipeptídio (N41), identificado no sistema IEF/SDS (Fig.13C), e um polipeptídio básico (N40), identificado no sistema NEPHGE/SDS (Fig.13E), não foram sintetizados na presença de actinomicina D.

Após 25 minutos do início da germinação observamos uma variação significativa na velocidade de síntese de várias proteínas. Pelo menos 28 novos polipeptídios aparecem entre 25 e 55 min, a maioria sendo inibida na presença de actinomicina D (Figs.14 e 15). Estas proteínas, cujo aparecimento envolve síntese de novos mRNAs, foram designadas com a letra N (do inglês "new" mRNA). Contudo, detectamos algumas novas proteínas, cuja síntese é independente da transcrição de novos mRNAs, proteínas estas designadas com a letra S (do inglês "stored" mRNA). Na figura 14 podemos visualizar cinco novos polipeptídios (S44, S45, S47, S50, S51), que são sintetizados entre 25 e 35 min e um (S58), que é sintetizado entre 35 e 45 min, tanto na ausência como na presença de actinomicina D. Este fato sugere que no processo de germinação existe um mecanismo de tradução envolvendo seleção dos mRNAs previamente armazenados nos zoósporos.

Paralelamente ao aumento da síntese de várias proteínas, que ocorre após 25 min da germinação, observamos uma diminuição na síntese de outras proteínas (polipeptídios

Figura 14 - Eletroforese bidimensional IEF/SDS de proteínas sintetizadas durante a germinação tardia em solução inorgânica. Como descrito na legenda da figura 13. ACT, actinomicina D.

Figura 15 - Eletroforese bidimensional NEPHGE/SDS de proteínas sintetizadas durante a germinação tardia em solução inorgânica. Como descrito na legenda da figura 13. ACT, actinomicina D.

3 a 7, 11, 20 a 22, 27, 30, 33 a 35, 38, 39) (Fig.14 e 15). Em alguns casos esta diminuição é atrasada na presença de actinomicina D (por exemplo, polipeptídios 5, 20, 21, 33 a 35). Além disso, após 35 min ocorre um intenso aumento na síntese de algumas proteínas na germinação induzida na presença de actinomicina D em relação ao controle (Figs.14D, F), indicando que a meia-vida de certos mRNAs foi afetada pela inibição da transcrição.

1.2.2. Padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em meio nutriente AL

Com a finalidade de se detectar alguma eventual diferença entre o padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em meio inorgânico e o padrão das proteínas sintetizadas durante germinação induzida em condições de crescimento, analisamos a síntese proteica durante germinação em meio AL. O meio de crescimento AL contém baixa concentração de metionina (5 μ M), o que permite boa incorporação de [³⁵S]metionina, sem contudo afetar a cinética de germinação e o crescimento normal das células.

Para o estudo da síntese proteica durante a germinação em meio AL foram administrados quatro pulsos consecutivos de [³⁵S]metionina (10 min de duração), a partir dos 25 min da indução da germinação na presença e na ausência de actinomicina D. Nas Figs. 16 e 17 (respectivamente sistemas IEF/SDS e NEPHGE/SDS) são mostrados os auto-radiogramas

Figura 16 - Padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação em meio nutrien-te. Zoósporos foram induzidos a germinar em meio AL. As células foram marcadas com ^{35}S metionina por 10 min nos intervalos indicados e as proteínas totais foram extraídas e analisadas através de eletroforese bidimensional IEF/SDS. As setas à esquerda (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

Figura 17 - Eletroforese bidimensional NEPHGE/SDS das proteínas sintetizadas durante a germinação em meio nutriente. Como descrito na legenda da figura 16.

correspondentes ao padrão das proteínas sintetizadas na ausência de actinomicina D. Não estão apresentados os autoradiogramas correspondentes à síntese proteica na presença de actinomicina D, uma vez que a incorporação foi extremamente baixa. Embora o gradiente de pH dos géis de 1ª dimensão no sistema IEF/SDS (Fig.16) seja ligeiramente diferente do gradiente de pH dos géis IEF anteriormente apresentados, devido a uma mudança no lote de anfolitos, isto não dificultou a identificação das proteínas.

A comparação entre o padrão das proteínas sintetizadas em meio inorgânico (Figs.13, 14 e 15) com o padrão das proteínas sintetizadas em meio nutriente (Figs.16 e 17) revela que a maioria dos polipeptídios previamente identificados no início da germinação, em solução inorgânica, foram também detectados entre as proteínas sintetizadas na germinação em meio nutriente. Além disso, a maioria dos polipeptídios identificados como N e alguns classificados como S (Fig.14 e 15) foram também identificados (Figs.16 e 17). Várias dessas proteínas tem o momento de sua síntese antecipado (frequentemente um pulso antes), indicando que durante a germinação em meio AL a síntese proteica parece estar mais adiantada que na germinação em meio inorgânico.

Verificamos, também, a síntese de um número significativo de novos polipeptídios (cerca de 20), exclusivamente na germinação em meio AL (Fig.16 e 17). Estes polipeptídios foram designados pela letra G (do inglês

"growth"). Vários desses polipeptídios, específicos de crescimento, foram de fato encontrados ao analisarmos a síntese de células vegetativas em crescimento (resultado não mostrado).

1.2.3. Tradução "in vitro" de RNAs isolados durante a germinação

Com o objetivo de se confirmar os dados obtidos a partir dos experimentos de síntese "in vivo" na presença de actinomicina D, RNA total isolado de zoósporos, de células após 20 e 45 min de germinação em meio inorgânico e de células após 45 min de germinação em meio AL, foi traduzido em lisado de reticulócitos de coelho. Os produtos da tradução "in vitro" desses RNAs foram separados em eletroforese bidimensional no sistema IEF/SDS.

O padrão dos produtos da tradução "in vitro" do RNA isolado de zoósporos é muito semelhante ao obtido da tradução do RNA de células após 20 min da indução da germinação (Figs. 18A,B), indicando que não ocorre síntese de novos RNAs no início da germinação. Contudo, uma boa parte dos RNAs que estavam armazenados nos zoósporos são degradados até 45 min da germinação, enquanto uma menor parte é conservada pelo menos até os 45 min de germinação (Figs. 18A,C). Entre as proteínas sintetizadas a partir da tradução do RNA de células de 45 min (Fig. 18C,D) podemos detectar algumas novas proteínas correspondentes aos novos

Figura 18 - Eletroforese bidimensional (IEF/SDS) dos produtos de tradução "in vitro" de RNA total isolado de zoósporos (A), células após 20 min (B) e 45 min (C) de germinação em solução inorgânica e após 45 min de germinação em meio nutriente AL (D). Triângulos fechados indicam polipeptídeos codificados por RNAs armazenados nos zoósporos que são mantidos até 45 min de germinação e triângulos abertos aqueles que desaparecem. As setas apontam polipeptídeos codificados por RNAs sintetizados de novo. Os polipeptídeos exclusivos de meio nutriente são identificados pela letra G. As proteínas numeradas correspondem àquelas proteínas sintetizadas "in vivo" e identificadas nas Figs. 14 e 16. As pontas de setas à esquerda dos auto-radiogramas representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

RNAs que são transcritos após os 20-25 min da germinação. Além disso, várias outras proteínas correspondentes a novos mRNAs foram detectadas na tradução "in vitro", embora não tenhamos encontrado estas proteínas no padrão das proteínas sintetizadas "in vivo".

Ao compararmos o padrão obtido da tradução "in vitro" do RNA isolado das células de 45 min de germinação em meio inorgânico com o de células obtidas em meio nutriente AL, (Fig.18C,D) podemos visualizar algumas diferenças, como o aparecimento de alguns novos produtos de tradução exclusivos da germinação em meio AL, o que confirma a idéia de que já durante a germinação em meio nutriente tem início a expressão de novos genes provavelmente relacionados com o crescimento dessas células.

1.2.4. Modificações pós-tradução das proteínas de zoósporos durante o início da germinação

Possíveis modificações pós-tradução devem ocorrer no início da germinação, uma vez que as transformações que ocorrem nesta fase devem depender essencialmente de modificações nas proteínas preexistentes nos zoósporos. A transformação morfológica zoósporo --> célula redonda é independente de síntese proteica, ocorrendo na presença de cicloeximida (Lovett, 1968; Soll e Sonneborn, 1971b).

Para verificar a existência de tais modificações, zoósporos marcados radioativamente com [³⁵S]metionina

durante toda a esporulação foram coletados e induzidos a germinar em solução inorgânica contendo excesso de metionina não-radioativa (0,2mM). Foram coletadas células após 6, 12, 18 e 25 min e as proteínas foram analisadas através de eletroforese bidimensional (IEF/SDS e NEPHGE/SDS). As figuras 19 e 20 mostram os perfis eletroforéticos obtidos nestes diferentes momentos.

O padrão das proteínas dos zoósporos (Figs.19A,20A), que representa as proteínas sintetizadas durante toda a esporulação e conservadas nos zoósporos, difere significativamente do padrão das proteínas sintetizadas durante a germinação (Figs.13 a 15). Durante o início da germinação as proteínas dos zoósporos são relativamente estáveis. Contudo, algumas proteínas são processadas ou degradadas logo no início da germinação, enquanto que outras mais tardiamente. Entre estas últimas está um grupo de proteínas básicas de peso molecular entre 55 e 40 kDa, detectadas no sistema NEPHGE/SDS (Fig.20), cujo desaparecimento ocorre entre 18 e 25 min; estas proteínas haviam sido sintetizadas exclusivamente durante a diferenciação dos zoósporos que ocorre no final da esporulação (Fig.3H).

Existem algumas proteínas que aparentemente sofrem modificações no seu ponto isoelétrico. Alguns polipeptídeos tornam-se mais básicos (b,c,d) (Fig.19), enquanto outros tornam-se mais ácidos (a,e) (Fig.19), sugerindo que modificações do tipo fosforilação-desfosforilação,

Figura 19 - Modificações pós-tradução de proteínas de zoósporos durante o início da germinação. Zoósporos obtidos após esporulação sincrônica na presença de $[^{35}\text{S}]$ metionina foram lavados para remoção da metionina radioativa e induzidos a germinar em solução inorgânica contendo metionina não-radioativa (0,2mM). Foram retiradas amostras após 0 (A), 6 (B), 12 (C), 18 (D) e 25 (E) min da indução da germinação e as proteínas foram analisadas através de eletroforese bidimensional IEF/SDS. As setas apontam proteínas que são degradadas durante o início da germinação. As pontas de setas à esquerda dos auto-radiogramas representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

Figura 20 - Eletroforese bidimensional NEPHGE/SDS das modificações de proteínas de zoósporos, pré-marcadas radioativamente. Como descrito na figura 19.

glicosilação-desglicosilação ou outras capazes de afetar a carga elétrica de proteínas, podem estar ocorrendo durante o início da germinação.

1.2.5. Discussão

Durante a germinação de zoósporos de B.emersonii ocorre uma grande estimulação da síntese proteica. Como já foi demonstrado, menos que 10% dos ribossomos dos zoósporos estão associados em polissomos, mas após 30 min da germinação este valor aumenta para 80% (Gong e Lovett, 1977; Silverman et al., 1974). O pequeno efeito da actinomicina D na síntese proteica (Leaver e Lovett, 1974; Silverman et al., 1974; Soll e Sonneborn, 1971a; Fig.12A) e na formação de polissomos (Leaver e Lovett, 1974; Silverman et al., 1974) durante o início da germinação sugeria que os zoósporos continham mRNAs pré-formados. Assim, a tradução destes mRNAs é que seria responsável pelo aumento da síntese proteica verificado entre os primeiros 15 e 30 min da germinação. De fato, como revelaram nossos resultados, o padrão das proteínas sintetizadas até os 25 min de germinação não sofre alterações qualitativas, indicando que o aumento na velocidade de síntese proteica que ocorre no início da germinação é devido a um aumento da tradução das mesmas espécies de mRNA e não de espécies diferentes. Além disso, como o padrão das proteínas sintetizadas na ausência ou presença de actinomicina D é idêntico e como todos os

produtos da tradução "in vitro" do RNA de células de 20 min de germinação foram encontrados entre os produtos da tradução "in vitro" do RNA dos zoósporo, confirmamos que o aumento da velocidade de síntese proteica é devido exclusivamente a uma gradual ativação de mRNAs armazenados nos zoósporos, não havendo síntese de novas mensagens nos tempos iniciais da germinação. Vários outros fungos que no estágio de esporo são inativos com relação à síntese proteica contém RNA armazenado que é ativado durante a germinação dos seus esporos. Contudo, não é conhecido em que etapa (iniciação ou elongação) a síntese proteica está bloqueada nos esporos (Freer e Van Etten, 1978; Smith e Burke, 1979; Linz e Orlowski, 1982).

Após os 25 min da indução da germinação ocorreram várias modificações no padrão de síntese proteica, que correspondem ao surgimento de novas proteínas bem como à diminuição na velocidade de síntese de várias proteínas. A maioria das novas proteínas tem sua síntese dependente da transcrição de novas mensagens, uma vez que a actinomicina D foi capaz de inibir o aparecimento destas novas proteínas. Esta ativação gênica que ocorre após os 25 min de germinação foi confirmada pela detecção de novos produtos de tradução "in vitro" ao analisarmos o padrão das proteínas sintetizadas "in vitro" a partir de RNA isolado de germes de 45 min. Contudo, existe um pequeno número de novas proteínas cuja síntese não é inibida por actinomicina D. A síntese tardia dessas proteínas, cujos mRNAs estavam armazenados nos

zoósporos, sugere que a ativação da tradução para alguns dos mRNAs estocados é seletiva, o que implica na existência de uma regulação ao nível do recrutamento dos mRNAs para a síntese destas proteínas. O recrutamento seletivo de alguns mRNAs maternos também ocorre durante a fertilização de ovos de ouriço do mar (Wells et al., 1981), durante a maturação de oócitos de estrela-do-mar (Rosenthal et al., 1982) ou durante o desenvolvimento de Volvox em resposta a luz (Kirk e Kirk, 1985).

Assim, durante a germinação dos zoósporos de B.emersonii parecem estar ocorrendo múltiplos níveis de regulação da síntese proteica, envolvendo tanto controles ao nível da tradução como da transcrição. Superposto à ativação da tradução dos mRNAs pré-formados existe um controle para a seleção destas mensagens. A tradução poderia ser controlada tanto ao nível da disponibilidade de mRNAs como pela própria atividade dos componentes da maquinaria de tradução. Existem algumas evidências de que parte da maquinaria de tradução dos zoósporos está interrompida ao nível da elongação (Jaworski e Stumhofer, 1984). Além disso, partículas inibidoras da tradução (Jaworski e Stumhofer, 1983) bem como um inibidor de baixo peso molecular (Adelman e Lovett, 1974) já foram encontrados em zoósporos. Tanto adenilação como desadenilação de mRNAs pré-formados ocorrem simultaneamente durante a germinação dos zoósporos e experimentos com actinomicina D demonstraram que transcrição não é essencial para a poliadenilação dos mRNAs dos zoósporos (Jaworski,

1976). Portanto, mudanças no estado de poliadenilação dos mRNAs estocados poderiam estar relacionadas com esta seletividade da tradução.

Estudos preliminares sobre as proteínas sintetizadas na ausência e presença de actinomicina D foram feitos por Lovett (1983). Foram detectados um total de 132 polipeptídios em géis bidimensionais com mínimas variações no padrão de síntese. Contudo, este autor não descreveu as condições de preparação do extrato das células - há uma evidente proteólise mostrada em seus géis - nem as condições de eletroforese, para que pudéssemos fazer uma comparação direta com nossos resultados. Por outro lado, nossos resultados concordam com as conclusões de Johnson e Lovett (1984b) que, baseados em análises de hibridização de RNA/DNA em solução, mostraram que células induzidas a germinar em solução inorgânica apresentam uma pronunciada perda dos mRNAs dos zoósporos das classes de média e alta abundância, com um ligeiro enriquecimento da classe de baixa abundância. Contudo, esta comparação torna-se difícil, pois a técnica de eletroforese bidimensional, por nós utilizada, permite apenas a detecção de proteínas codificadas pelos mRNAs das classes de intermediária e alta abundância.

Em paralelo ao aumento da síntese de proteínas durante o início da germinação, observamos a degradação de alguns polipeptídios que haviam sido sintetizados durante a esporulação e continuavam presentes nos zoósporos. Junto à essa degradação específica para alguns polipeptídios, outros

sofrem modificações na sua carga, sugerindo que modificações pós-tradução tais como proteólise, fosforilação ou glicosilação, podem ter um papel importante nos primeiros minutos da germinação, durante o encistamento (transição de zoósporo para célula redonda), já que esta transição envolve rearranjos radicais na morfologia das células e ocorre mesmo na presença de cicloeximida.

1.3. Identificação de três proteínas cuja síntese é controlada pelo desenvolvimento: actina, α -tubulina e β -tubulina

Como continuidade dos estudos sobre a regulação da síntese proteica durante a esporulação e a germinação de Blastocladiella optamos pela identificação e caracterização de algumas proteínas cuja síntese fosse controlada pelo desenvolvimento. Dentro desta abordagem, obtivemos evidências de que uma das proteínas induzidas durante um certo intervalo da esporulação e que foi denominada proteína n°50 corresponde a uma proteína de choque térmico (Hsp70) como será apresentado adiante no item III.2.3.. Com o objetivo de identificar outras proteínas, utilizamos anticorpos monoclonais comerciais contra actina, α e β -tubulinas de galinha, na tentativa de detectarmos estas proteínas nos perfis eletroforéticos bidimensionais das proteínas totais de Blastocladiella através da técnica de "immunoblotting".

Inicialmente, havia necessidade de verificarmos se estes anticorpos, embora heterólogos, reconheceriam as proteínas equivalentes de B.emersonii. Assim, o extrato total de zoósporos foi submetido à eletroforese unidimensional e as proteínas, assim separadas, foram transferidas para filtros de nitrocelulose. Após a transferência, os filtros foram então incubados com cada um dos anticorpos monoclonais. Na Fig.21 podemos verificar que

Figura 21 - Imunodeteccção de actina, α e β -tubulinas no extrato total de proteínas de zoósporos. Após separação através de eletroforese unidimensional, as proteínas totais de zoósporos foram transferidas para filtro de nitrocelulose e submetidas à imunorreacção com anticorpos monoclonais anti-actina (act), anti- α -tubulina (α -T) e anti- β -tubulina (β -T). O complexo antígeno-anticorpo foi revelado imunoenzimaticamente através de reacção de diaminobenzidina e H_2O_2 com peroxidase conjugada a anti-IgG de coelho. As setas representam os marcadores de peso molecular em kDa.

todos os três anticorpos utilizados, anti-actina, anti- α -tubulina e anti- β -tubulina, foram muito específicos e capazes de reconhecer uma única proteína de 43 kDa no caso do anti-actina, uma proteína de 56 kDa no caso do anti- α -tubulina e uma proteína de 55 kDa no caso do anti- β -tubulina.

Uma vez verificado que os anticorpos estavam reconhecendo actina e α e β -tubulinas, prosseguimos na detecção destas proteínas num perfil eletroforético bidimensional. Para isso, as proteínas totais de células, marcadas com [35 S]metionina no intervalo 90-120 min da esporulação, foram submetidas à eletroforese bidimensional no sistema IEF/SDS e posterior transferência. Foram feitos quatro géis idênticos, os quais foram submetidos à transferência simultaneamente. O primeiro "blot" foi incubado com o monoclonal anti-actina, o segundo com o monoclonal anti- α -tubulina, o terceiro com o monoclonal anti- β -tubulina e o quarto com uma mistura dos três anticorpos. A Fig.22A mostra o "blot" que foi incubado com a mistura dos três anticorpos e a Fig.22B mostra o autoradiograma correspondente. Assim, foi possível identificar: a) duas isoformas da actina com peso molecular de 43 kDa e ponto isoelétrico aproximado entre 5,7-5,9; b) uma banda múltipla, contendo pelo menos 3 isoformas de 55 kDa, correspondente à β -tubulina, migrando entre os pHs 5,8-6,0; c) uma banda de 56 kDa, correspondente à α -tubulina, migrando numa posição mais básica que a β -tubulina (pI entre

Figura 22 - Identificação de actina, α e β -tubulinas em gel bidimensional. Proteínas totais marcadas com ^{35}S metionina durante o intervalo 90-120 min da esporulação foram submetidas à eletroforese bidimensional IEF/SDS e transferência. O "blot" foi incubado simultaneamente com anti-actina, anti- α -tubulina e anti- β -tubulina e após incubação, procedeu-se a revelação imunoenzimática dos complexos antígeno-anticorpo (A). Em (B) está mostrado o auto-radiograma do "blot", após fluorografia. As setas à direita (lado ácido do "blot") representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 43 kDa, de cima para baixo). Está apresentada apenas parte do "blot" e do auto-radiograma correspondente.

6,0-6,1). O auto-radiograma (Fig.22B) mostra que estas três proteínas estão sendo sintetizadas, com grande intensidade durante o intervalo 90-120 min da esporulação. Essas 3 proteínas já haviam sido numeradas na análise que fizemos das proteínas sintetizadas na esporulação (item III.1.1, Figs.2 e 4). Assim, actina corresponderia às proteínas 61/62, α -tubulina à proteína 43 e β -tubulina à proteína 38 (compare Figs.2 e 22).

Abe e Lovett (1982), utilizando eletroforese unidimensional em gel de uréia, detectaram a existência de dois tipos de tubulinas (α e β) numa preparação purificada de axonemas flagelares de zoósporos, porém uma única banda de 55 kDa foi visualizada após eletroforese desta mesma preparação em gel de poliacrilamida 10%/SDS. Através de eletroforese bidimensional e "immunoblotting", nós identificamos, em uma preparação de axonemas flagelares de zoósporos, isolados como descrito por Abe e Lovett (1982), uma banda proeminente de 55 kDa, que reagiu com anti- β -tubulina e um polipeptídeo de 56 kDa, que reagiu com anti- α -tubulina (Fig.23). Portanto, anticorpos monoclonais contra tubulinas de microtúbulos de cérebro de galinha reagiram com tubulinas de microtúbulos de flagelos de zoósporos. Além disso, α e β -tubulinas, purificadas dos flagelos, comigram em eletroforese bidimensional com as proteínas que identificamos como sendo α e β - tubulinas (não mostrado).

Figura 23 - Imunodeteccção de proteínas purificadas de flagelo de zoósporos. Tubulina purificada de flagelos foi submetida à eletroforese bidimensional IEF/SDS e transferência. O "blot" foi incubado com anti- α -tubulina e anti- β -tubulina e o complexo antígeno-anticorpo foi detectado como descrito na figura 21. As setas à direita (lado ácido do "blot") representam os marcadores de peso molecular (67 e 55 kDa, de cima para baixo). Está apresentada apenas parte do "blot".

1.3.1. Variação no acúmulo de actina, α e β -tubulinas durante o ciclo de vida de *B.emersonii*

Para investigar a quantidade de actina, α e β -tubulinas presente nas células nos diferentes estágios do desenvolvimento, utilizamos "immunoblots" de géis unidimensionais de proteínas totais isoladas de células de diferentes fases do ciclo de vida. Como mostrado na Fig.24A, células vegetativas contém menor quantidade de actina, sendo observado um acúmulo progressivo desta proteína durante a esporulação, apresentando-se em níveis máximos em células de 180 min. A actina é mantida nos zoósporos, sendo que após 2 horas de crescimento ocorre um decréscimo sensível nos seus níveis. Tanto α e β -tubulinas apresentaram níveis máximos após 120 min de esporulação, sendo que durante a germinação e início do crescimento verifica-se uma rápida diminuição na quantidade destas proteínas (Fig.24B,C).

1.3.2. Regulação da síntese de actina, α e β -tubulinas durante a esporulação

De acordo com a análise apresentada no item III.1.1. (Fig.4), as proteínas agora identificadas como actina, α e β -tubulinas apresentam estágios definidos de síntese máxima. Na Fig. 25 pode ser vista, em destaque, a variação na síntese dessas proteínas ao longo da esporulação. Durante a esporulação ocorrem mudanças dramáticas no padrão de síntese

Figura 24 - Acúmulo de actina, α e β -tubulinas durante o ciclo de vida. Proteínas totais isoladas de células após 0 (1), 60 (2), 120 (3) e 180 (4) min da indução da esporulação; zoósporos (5); germes de 45 min obtidos em solução inorgânica (6) e células após 60 (7), 120 (8) e 180 (9) min de crescimento em meio nutriente AL, foram separadas em eletroforese unidimensional e submetidas à transferência. Os "blots" foram incubados com anti-actina (A), anti- α -tubulina (B) e anti- β -tubulina (C) e a revelação foi feita como descrito na figura 21. No géis foram aplicadas a mesma quantidade (15 μ g) de proteínas totais de cada tipo celular. Canaletas: 10A, actina purificada de músculo de coelho; 10B e 10C, tubulina purificada de flagelo.

Figura 25 - Síntese "in vivo" de actina, α e β -tubulinas durante a esporulação. As células foram marcadas com [35 S]metionina por períodos de 30 min, tratadas com TCA e as proteínas totais submetidas à eletroforese bidimensional IEF/SDS. São mostrados os auto-radiogramas dos géis correspondentes às proteínas sintetizadas durante os intervalos 30-60 (A), 60-90 (B), 90-120 (C), 120-150 (D), 150-180 (E) e 180-210 (F) min após indução da esporulação. As setas à direita (lado ácido do gel) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 43 kDa, de cima para baixo). Está apresentada apenas parte de cada auto-radiograma.

de proteínas totais, sendo marcantes as variações na velocidade de síntese da actina α e β -tubulinas. A actina apresentou síntese máxima a partir dos 120 min da esporulação. A síntese de α e β -tubulinas aumentou, significativamente, após 90 min da indução da esporulação, verificando-se uma diminuição nesta síntese máxima após 150 min. É interessante observar que o aumento da velocidade de síntese para estas duas proteínas antecede por alguns minutos o início da formação do flagelo dos zoósporos (Lovett, 1975).

A coloração com azul de Coomassie de géis bidimensionais de proteínas marcadas revelou que actina é uma das três proteínas mais abundantes em B. emersonii (não mostrado).

Para comparar a cinética da síntese "in vivo" de actina, α e β -tubulinas com o acúmulo de seus mRNAs correspondentes, analisamos os produtos da tradução "in vitro" de RNAs poli(A)+, isolados durante as diferentes fases da esporulação (Fig.26). Pode ser observada, nesta figura, a ocorrência de um aumento na quantidade do RNA que codifica para actina, durante os estágios finais da esporulação, indicando que as variações da velocidade de síntese "in vivo" desta proteína reflete o aumento nos níveis do seu RNA mensageiro. Estes estudos de tradução "in vitro" também revelaram que o aumento, verificado "in vivo", da síntese das tubulinas flagelares, é devido a um aumento nos níveis dos mRNAs que codificam para estas proteínas.

Figura 26 - Síntese "in vitro" de actina, α e β -tubulinas a partir de mRNAs poli(A)⁺ isolados durante a esporulação. mRNAs poli(A)⁺ isolados de células após 0 (A), 60 (B), 120 (C) e 180 (D) min após indução da esporulação foram traduzidos "in vitro" em lisado de reticulócitos e os polipeptídeos resultantes foram separados através de eletroforese bidimensional IEF/SDS. As setas à direita (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 43 kDa, de cima para baixo). Está apresentada apenas a região de interesse de cada auto-radiograma.

Para identificar, nos géis bidimensionais, actina e tubulina entre os produtos de tradução "in vitro", uma pequena quantidade de extrato total da célula (não marcado) foi misturado aos produtos da reação de tradução "in vitro", previamente à eletroforese bidimensional. Após "immunoblotting", pode ser visualizado no "blot" o padrão característico da actina e tubulinas próprias do lisado de reticulócitos, juntamente com o padrão típico destas proteínas em Blastocladiella, uma vez que a actina e tubulina de reticulócitos e de Blastocladiella apresentam diferentes mobilidades eletroforética em gel bidimensional.

Nossos resultados de marcação "in vivo" revelaram a existência de pelo menos duas formas da actina, diferindo ligeiramente no ponto isoelétrico. Estas duas formas foram também detectadas quando RNA de células esporulantes foi traduzido "in vitro", sugerindo que esta heterogeneidade para actina de Blastocladiella pode ser devida a eventos pós-transcricionais ou a existência de múltiplos genes para actina. O aumento na síntese de β -tubulina, durante a esporulação, também é marcado pelo aparecimento de pelo menos três isoformas de β -tubulina, como detectado pela reação imunológica. Contudo, apenas uma única forma apresentando uma pequena cauda, correspondente a β -tubulina, foi detectada entre os produtos de tradução "in vitro", sugerindo, assim que eventos ao nível de pós-tradução podem estar determinando o aparecimento das isoformas de β -tubulina.

Tanto actina com α e β -tubulinas parecem não ser sintetizadas durante a germinação. Contudo, actina é sintetizada, aparentemente em menor quantidade, no crescimento tardio (ver Fig.2A). Não podemos excluir a possibilidade da existência de outros tipos de tubulina existentes em Blastocladiella, os quais não estariam sendo reconhecidos pelos anticorpos monoclonais usados.

1.3.3. Discussão

Acompanhando as dramáticas mudanças morfológicas que ocorrem durante a esporulação, verificamos um intenso aumento na síntese e no acúmulo de actina e de α e β -tubulinas. As tubulinas, proteínas estruturais predominantes nos microtúbulos do flagelo de zoósporos, são sintetizadas "de novo", entre 90-150 min após a indução da esporulação sendo acumuladas simultaneamente; esta variação coincide com a zoosporogênese. A velocidade de síntese de actina, sofre um aumento após 90-120 min do início da esporulação, permanecendo elevada até o final deste processo, sendo que o acúmulo de actina reflete este aumento de sua síntese. O controle do desenvolvimento, para a síntese de actina e tubulinas, parece ser exercido ao nível do acúmulo dos seus respectivos RNAs mensageiros. A síntese, tanto das duas isoformas da actina bem como das isoformas de β -tubulina de Blastocladiella, é aparentemente coordenada durante a esporulação. Os resultados de tradução "in vitro" sugerem

que a heterogeneidade da actina é devida a eventos pós-transcricionais ou múltiplos genes, contudo a ocorrência de acetilação de actina no ensaio de tradução "in vitro" não pode ser excluída (Garrells e Hunter, 1979).

A germinação dos zoósporos de B.emersonii envolve um rearranjo radical da arquitetura celular, que transforma os zoósporos em células redondas, que são convertidas em germes, capazes de crescer. Entre estes rearranjos estruturais, está a retração do flagelo pelo corpo celular e a desmontagem do axonema flagelar (Lovett, 1975). Barstow e Lovett (1974) relataram evidências preliminares da presença de microtúbulos arranjados longitudinalmente nos rizóides de germes. A actina é mantida ao longo da germinação e desaparece após 2 horas do crescimento, sugerindo o envolvimento de microfilamentos, na profunda reorganização das organelas típicas dos zoósporos. Os níveis dos antígenos detectados com os monoclonais anti-tubulina de cérebro de galinha, revelaram o desaparecimento das tubulinas durante a germinação, o que pode ser correlacionado com a desmontagem do axonema flagelar. Abe e Lovett (1982), através de ensaios de ligação com colchicina, concluíram que, as tubulinas dos axonemas, após a retração dos flagelos, não retornam ao reservatório solúvel, detectado pelos ensaios com colchicina, e são provavelmente degradadas durante a germinação. Apesar dos problemas que eventualmente ocorrem no ensaio de ligação com colchicina, estes autores apresentaram evidências de que, as tubulinas dos axonemas

flagelares podem ser diferentes da tubulina citoplasmática solúvel. Nós não podemos excluir, em nossos estudos, a possibilidade de que o monoclonal anti-tubulinas de cérebro não reconheça alguma tubulina citoplasmática diferente das tubulinas flagelares.

Os anticorpos monoclonais desenvolvidos em camundongo, contra α e β -tubulinas de cérebro de galinha apresentaram reação cruzada com as tubulinas isoladas do flagelo de zoósporos. Também, o anticorpo anti-actina de galinha reagiu com uma proteína similar em Blastocladiella, indicando a existência de similaridades imunológicas entre estes polipeptídios, apesar da distância filogenética entre fungos e vertebrados. Em vários organismos inferiores e plantas, a α -tubulina difere da tubulina de mamíferos, por migrar adiante da β -tubulina em géis de poliacrilamida/SDS (Clayton et al., 1980; White et al., 1983; Russell et al., 1984; Hussey e Gull, 1985). Em Blastocladiella, não verificamos esta inversão entre α e β -tubulinas.

O fenômeno das múltiplas formas para actina e tubulinas ocorre mesmo nos eucariotos inferiores. A heterogeneidade eletroforética de α e β -tubulinas e actina já foi observada em S.pombe, Physarum, Dictyostelium, Polytonella, Chlamydomonas, Aspergillus e Crithidia (Clayton et al., 1979; Burland et al., 1983; Kindle e Firtel, 1978; Jantzen, 1981; Mckee et al., 1983; Sheir-Neiss et al., 1978; Russell et al., 1984), sendo que esta heterogeneidade pode ser detectada ao nível de diferentes tipos celulares

expressando diferentes isoformas, como ao nível de organelas diferentes montadas a partir de isoformas distintas. Embora, a presença de certas isoformas possa ser devida às modificações ao nível de pós-tradução, elas podem, também, representar produtos expressos a partir de genes diferentes.

Vários dados da literatura relatam diferentes tipos de modificação pós-tradução que determinam as isoformas das tubulinas. Em cérebro de rato, parece ocorrer fosforilação da β -tubulina (Eipper, 1975) e tirosinilação de α -tubulina (Arce et al., 1975). Em Physarum polycephalum, uma nova forma de tubulina, isto é, tubulina acetilada é produzida quando a mixoameba é induzida a se tornar flagelada (Green e Dove, 1984; Diggins e Dove, 1987). Em Chlamydomonas (L'Hernault e Rosenbaum, 1985) e em Crithidia fasciculata (Russell et al., 1984), foi detectada a existência de uma α -tubulina específica de flagelos, que é produzida pela acetilação da tubulina citoplasmática. Também, em Tetrahymena thermophila, foram identificadas diferentes formas de α e β -tubulinas no axonema ciliar, algumas das quais são distintas das tubulinas citoplasmáticas solúveis (Suprenant et al., 1985). Assim, a adição ou a remoção de modificações após a tradução como por exemplo a acetilação de tubulinas poderia desempenhar um papel controlador para a montagem e a desmontagem do flagelo. Também as actinas podem ser modificadas, após a tradução, através de acetilação ou acilação (Rubenstein e Deuchler, 1979; Stadler et al., 1985). Resultados obtidos por nós (não mostrados)

demonstraram que fosforilação não é a modificação pós-tradução que eventualmente seria responsável pelas múltiplas formas de actina e β -tubulina em Blastocladiella.

A heterogeneidade da actina e das tubulinas em alguns casos poderia ser devida à presença de múltiplos genes para estas proteínas. Em muitos organismos, α e β -tubulinas são codificadas por famílias multigênicas (Cleveland e Sullivan, 1985), sendo que uma fração dos genes destas famílias são pseudogenes. Enquanto leveduras contem um único gene de actina (Ng e Abelson, 1980), outros eucariotos contém vários genes de actina como ouriço do mar que contém 11 (Scheller et al., 1981) e Dictyostelium que contém 17 (Kindle e Firtel, 1978). Contudo, não é conhecido quantos destes genes são diferentes e quantos são, de fato, expressos. De qualquer maneira, está descrito que o nível de expressão dos genes de actina varia dramaticamente ao longo do ciclo de vida de Dictyostelium (Alton e Lodish, 1977; Marlgolskee e Lodish, 1980) e que mudanças na expressão dos genes de actina e tubulina parecem exercer algum papel durante o crescimento e a diferenciação celular (Farmer, 1986; Ben-Ze'ev, 1986).

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

2.1. Expressão diferencial das proteínas de choque térmico durante o desenvolvimento

Para investigar a regulação da resposta ao choque térmico durante o desenvolvimento de *B.emersonii* foi necessário, inicialmente, determinar qual a temperatura onde esta resposta seria melhor induzida. A figura 27 mostra o perfil eletroforético das proteínas totais sintetizadas após o aquecimento de zoosporângios e germes em diferentes temperaturas. Tanto durante a esporulação como durante a germinação, observamos a indução de um novo grupo de proteínas, com pesos moleculares na faixa de 70-84 kDa e 45-60 kDa, quando as células foram transferidas de 27°C para 34, 36 ou 38°C; estas proteínas correspondem às proteínas de choque térmico, Hsps (do inglês "heat shock protein"). A incorporação de [³⁵S]metionina em Hsps aumenta gradualmente com a elevação da temperatura até 38°C e não é acompanhada de uma diminuição da síntese proteica normal. A 40°C observamos um decréscimo tanto na síntese das Hsps como das proteínas normais, indicando que o aquecimento das células a esta temperatura mais elevada afeta tanto a expressão das proteínas de choque térmico como das proteínas normais. O grupo de Hsps de menor peso molecular (30-17 kDa) tem uma faixa de indução mais estreita, mas a máxima incorporação ocorre também a 38°C, observando-se muito pouca incorporação

Figura 27 - Temperatura ótima para indução das proteínas de choque térmico. (A) Após 30 min de indução da esporulação a 27°C, as células foram incubadas nas temperaturas indicadas por 30 min, ^{35}S metionina foi adicionada e a incubação foi mantida por mais 30 min. (B) Após 15 min de indução da germinação de zoósporos em solução inorgânica a 27°C, as células foram incubadas por 35 min nas temperaturas indicadas e marcadas com ^{35}S metionina nos 10 min finais da incubação. Nos géis foram aplicadas quantidades equivalentes de proteínas. As pontas de setas representam os marcadores de peso molecular em kDa.

em temperaturas imediatamente inferiores ou superiores a 38°C. Assim, 38°C foi a temperatura onde a resposta ao choque térmico foi melhor induzida, sendo que em Blastocladiella a tradução das mensagens normais é aparentemente concomitante com o aumento da tradução dos mRNAs de choque térmico. Na figura 27 estão indicadas as três proteínas mais proeminentes (Hsp76, Hsp70 e Hsp17); outras proteínas são claramente induzidas, porém em menor extensão.

O exame das células ao microscópio ótico, após diferentes tempos de choque térmico, revelou que a germinação, incluindo a formação do tubo germinativo, não foi afetada pelo aquecimento a 38°C. Contudo, a 40°C os zoósporos encistam, mas não formam tubo germinativo. O aquecimento a 38°C ou 40°C, quando feito durante a esporulação, provocou um certo atraso no processo.

Utilizando eletroforese bidimensional, fizemos uma análise mais detalhada das proteínas induzidas pelo choque térmico a 38°C durante o crescimento e em várias fases da esporulação e da germinação.

Na figura 28 estão apresentados os perfis eletroforéticos bidimensionais das proteínas sintetizadas quando as células após 15 ou 30 min de indução da germinação a 27°C foram transferidas para 38°C e mantidas nesta temperatura por 30 e 15 min respectivamente, isto é, as células foram coletadas após 45 min da indução da germinação. Pelo menos 11 polipeptídios foram induzidos em

Figura 28 - Legenda na página seguinte

Figura 28 - Análise através de eletroforese bidimensional IEF/SDS da síntese de proteínas de choque térmico durante a germinação. Zoósporos foram induzidos a germinar em solução inorgânica e submetidos ao tratamento térmico pelos períodos indicados (B,C,D,F) ou mantidos a 27°C (A,E), como controle. Em todos os casos as células foram marcadas com [³⁵S]metionina nos 10 min finais da incubação. As proteínas foram extraídas e submetidas à eletroforese. As setas à direita (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

ambos os casos: Hsp82a, Hsp82b, Hsp70, Hsp60, Hsp50, Hsp39a, Hsp30a, Hsp30b, Hsp30c, Hsp30d, Hsp25 (Figs.28B,D). Este mesmo conjunto de Hsps foi sintetizado quando os zoósporos foram induzidos a germinar diretamente a 38°C e coletados após 45 min (Fig.28C). Em todos os casos a [³⁵S]metionina foi adicionada nos últimos 10 min (35-45 min) da incubação e a quantificação da radioatividade incorporada em proteínas revelou que a incorporação foi ligeiramente maior a 38°C que a 27°C (não mostrado). Além disso, observamos que o choque térmico a 38°C não afetou o processo de germinação, incluindo a formação do tubo germinativo, mesmo quando o aquecimento foi iniciado no tempo zero da germinação.

Ao analisarmos a resposta ao choque térmico na germinação mais tardia, detectamos a indução de outro conjunto de Hsps em adição àquele que foi induzido durante o choque térmico até 45 min de germinação. Assim, células que foram transferidas para 38°C aos 30 min da germinação e mantidas nesta temperatura por mais 30 min, sendo a marcação com [³⁵S]metionina feita nos 10 min finais da incubação (50-60 min), sintetizam mais um grupo de Hsps: Hsp84, Hsp76, Hsp24, Hsp17a e Hsp17b (Fig.28F). Estas proteínas não foram induzidas quando o choque térmico foi analisado até 45 min da germinação, independente do momento e da duração do tratamento térmico (Figs.28B,C,D), sugerindo um controle do desenvolvimento para a síntese destas proteínas superposto à indução pelo choque térmico.

Para análise da resposta ao choque térmico durante o crescimento, as células, após 120 min de crescimento a 27°C, foram transferidas para 38°C, mantidas nesta temperatura por 30 ou 60 min, sendo a marcação com [³⁵S]metionina feita nos últimos 10 min da incubação. Foram detectados 14 polipeptídios: Hsp82a, Hsp82b, Hsp76, Hsp70, Hsp60, Hsp50, Hsp45a, Hsp45b, Hsp45c, Hsp39a, Hsp30b, Hsp30d, Hsp25 e Hsp17b, induzidos após 30 ou 60 min de choque térmico, sendo a resposta melhor induzida durante o tratamento mais curto (Fig.29). As proteínas Hsp70 e Hsp82b são fortemente induzidas; várias outras Hsps, tais como Hsp76, Hsp30b, Hsp30d ou Hsp17b, são fracamente marcadas quando comparadas com a indução obtida em outras fases do desenvolvimento. Durante o choque térmico observamos apenas um ligeiro decréscimo na síntese proteica normal. No crescimento à temperatura fisiológica duas proteínas, com pesos moleculares e pIs similares à Hsp82b e Hsp70, são sintetizadas em níveis basais.

Durante as diferentes fases da esporulação as células foram submetidas ao tratamento térmico de 30 ou 60 min de duração. A marcação com [³⁵S]metionina foi feita nos 20 min finais da incubação. Pelo menos 16 polipeptídios foram induzidos (Hsp84, Hsp82a, Hsp82b, Hsp76, Hsp70, Hsp60, Hsp45a, Hsp45b, Hsp45c, Hsp39b, Hsp39c, Hsp39d, Hsp30a, Hsp25, Hsp17a, Hsp17b) nos primeiros 30 min de choque térmico (Figs.30B,D,F). Quando as células são expostas a alta temperatura por períodos mais prolongados (60 min), a

Figura 29 - Análise através de eletroforese bidimensional IEF/SDS da síntese de proteínas durante choque térmico em células em crescimento. Zoósporos foram induzidos a germinar a 27°C em meio nutriente AL. Após 2 horas de crescimento, uma alíquota de células foi transferida para 38°C e mantida nesta temperatura por 30 min (B). Em (A) células mantidas a 27°C, como controle. As células foram marcadas com ^{35}S metionina nos 10 min finais da incubação. As proteínas foram extraídas e submetidas à eletroforese. As setas à direita (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

Figura 30 - Legenda na página seguinte

Figura 30 - Padrões de síntese proteica de células esporulantes normais e aquecidas. A esporulação foi induzida a 27°C e durante os intervalos indicados alíquotas de células esporulantes foram submetidas a tratamento térmico a 38°C (B,D,F). Em (A,C,E) são mostrados os controles. As células foram marcadas com ^{35}S metionina nos 20 min finais da incubação. As proteínas foram extraídas e submetidas à eletroforese bidimensional IEF/SDS. As setas apontam as proteínas de choque térmico induzidas espontaneamente durante a esporulação. As pontas de setas à direita (lado ácido dos auto-radiogramas) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

síntese de várias proteínas de choque térmico diminui (Hsp84, Hsp39b, Hsp39c, Hsp39d), além de se observar um aumento da incorporação de metionina em proteínas normais. Este fato sugere uma transitoriedade da resposta ao choque térmico na esporulação.

A comparação do padrão das proteínas sintetizadas nos vários estágios da esporulação à temperatura fisiológica com aquele induzido pelo tratamento térmico, revelou que três proteínas (39 kDa, 70 kDa e 76 kDa), sintetizadas a 27°C, parecem corresponder, respectivamente, às proteínas de choque térmico Hsp39a, Hsp70 e Hsp76, devido às suas similaridades em peso molecular e ponto isoelétrico (Figs.30A,C,E). A proteína de 39 kDa é expressa constitutivamente ao longo da esporulação a 27°C, enquanto as proteínas de 70 kDa e 76 kDa são induzidas apenas aos 120 min deste processo. É interessante destacar que o choque térmico não aumentou significativamente o nível de expressão destas duas proteínas naquele momento (Fig.30D). Já havíamos demonstrado que esta proteína de 70 kDa (anteriormente designada n°50, ítem III.1.1.2), que apresenta migração eletroforética similar a Hsp70, tem síntese máxima aos 120min da esporulação (Fig.4).

A análise da resposta ao choque térmico nas diferentes fases do ciclo de vida de B.emersonii permitiu, portanto, a identificação, dentro das limitações de resolução oferecidas pela eletroforese bidimensional, de pelo menos 22 polipeptídios induzidos pela hipertermia. A tabela 1 resume

TABELA 1. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO INDUZIDAS PELA HIPERTERMIA EM DIFERENTES FASES DO CICLO DE VIDA DE *B. emersonii*, IDENTIFICADAS POR ELETROFORESE BIDIMENSIONAL

hsp	pH	Germinação		Crescimento	Esporulação
		início	final		
kDa					
84	6.5-7.0	-	+	-	+
82a	5.0-5.5	+	+	+	+
82b	5.5-6.0	+	+	+	+
76	5.0-5.6*	-	+	+	+
70	5.2-5.7	+	+	+	+
60 ^b	5.5-6.5	+	+	+	+
50 ^b	6.3-6.8	+	+	+	-
45a	6.1-6.6	-	-	+	+
45b	6.5-7.0	-	-	+	+
45c	6.7-7.2	-	-	+	+
39a	5.2-5.7	+	+	+	-
39b	7.0-7.5	-	-	-	+
39c	7.2-7.7	-	-	-	+
39d	7.5-8.0	-	-	-	+
30a	5.0-5.5	+	+	-	-
30b	7.0-7.5	+	+	+	-
30c	7.5-8.0	+	+	-	-
30d	> 8.0	+	+	+	-
25	5.3-5.8	+	+	+	+
24	7.5-8.0	-	+	-	-
17a	5.8-6.3	-	+	-	+
17b	6.7-8.2	-	+	+	+

* Durante a esporulação a Hsp76 apresenta-se em posição mais ácida que a Hsp70, mas durante a germinação ela é mais básica

^b Estas proteínas correspondem a 2-5 polipeptídios nesta faixa de peso molecular

a expressão diferencial destas Hsps de acordo com o estágio de desenvolvimento, mostrando que, embora alguns polipeptídeos ocorram em todas as fases do desenvolvimento, outros são característicos de uma fase específica do ciclo de vida. As Hsps 82a, 82b, 76, 70, 60, 25 e 17b são comuns à germinação, crescimento e esporulação, sendo a Hsp70 a proteína de choque térmico predominante em Blastocladiella. Algumas Hsps não são induzidas durante o processo de germinação (45a, 45b, 45c, 39b, 39c, 39d), enquanto a Hsp24 e a Hsp30c são proteínas típicas desta fase. Por outro lado, Hsps 39b, 39c, e 39d são típicas de esporulação.

A regulação da expressão gênica durante a esporulação ocorre principalmente ao nível da transcrição (item III.1.1.4), enquanto durante o início da germinação ocorre a tradução de mRNAs pré-formados e armazenados nos zoósporos (Soll e Sonneborn, 1971a; Leaver e Lovett, 1974; item III.1.2.5). Portanto, durante o choque térmico na germinação, poderia estar ocorrendo apenas ativação da tradução de mRNAs de choque térmico preexistentes nos zoósporos. Com o objetivo de determinar se a regulação da resposta ao choque térmico seria diferente na esporulação e germinação, células das duas fases foram submetidas ao tratamento térmico na presença de actinomicina D. O tratamento de zoósporos com actinomicina D (5µg/ml) durante a germinação inibiu a indução de Hsps (não mostrado), sugerindo que o controle da expressão destas proteínas ocorre principalmente ao nível da transcrição. A síntese de

Hsps foi também inibida pela adição de actinomicina D (5µg/ml) durante o choque térmico em qualquer momento da esporulação.

Uma evidência adicional de que os mRNAs das Hsps acumulam durante o choque térmico foi obtida a partir de resultados de tradução "in vitro" de RNAs obtidos de células normais e de células que sofreram tratamento térmico. A eletroforese unidimensional dos produtos da tradução "in vitro" de RNAs poli(A)+ de células normais e aquecidas revelou um significativo aumento na síntese de algumas proteínas com migração eletroforética similar à Hsp70, Hsp30, Hsp25 e Hsp17 (não mostrado). Portanto, o aumento na síntese destas proteínas que ocorre durante o choque térmico reflete o aumento da abundância de seus respectivos mRNAs. A eletroforese bidimensional destes produtos de tradução "in vitro" confirmou que os mRNAs para as Hsp70, Hsp30a, Hsp25, Hsp17a e Hsp17b são de fato induzidos durante o choque térmico (Fig.31A,B). Além disso, existe uma clara correspondência, em termos de mobilidade eletroforética, entre a proteína de 70 kDa traduzida "in vitro" a partir de RNA poli(A)+ de células de 120 min de esporulação e a Hsp 70 traduzida a partir de RNA obtido de células que sofreram choque térmico (Fig.31C). Os zoósporos não contém mRNAs de choque térmico (Fig.31D), confirmando os experimentos feitos com actinomicina D, os quais mostraram que, mesmo durante a germinação, a regulação da expressão dos genes de choque térmico ocorre provavelmente ao nível da transcrição.

Figura 31 - Tradução "in vitro" de RNA isolado de células normais e de células submetidas a tratamento térmico. mRNAs poli(A)+ isolados de cada amostra foram traduzidos em lisado de reticulócitos e os polipeptídios resultantes foram analisados em eletroforese bidimensional IEF/SDS. (A) Células esporulantes aquecidas a 38°C no intervalo 30-60 min ou (B) 90-120 min após indução da esporulação; (C) células esporulantes após 120 min de esporulação à temperatura normal; (D) zoósporos. As setas apontam as proteínas de choque térmico.

2.2. Confirmação da identidade entre a proteína de 70 kDa induzida espontaneamente na esporulação e a Hsp70

Com o objetivo de confirmar a identidade entre a proteína de 70 kDa, sintetizada espontaneamente durante esporulação, e a Hsp70, principal proteína de choque térmico de Blastocladiella, comparamos os fragmentos proteolíticos resultantes da digestão parcial destas proteínas com protease V8 de Staphylococcus aureus. A banda em gel bidimensional correspondente à Hsp70 induzida pelo choque térmico e a banda correspondente à proteína de 70 kDa induzida aos 120 min da esporulação foram cortadas do gel e submetidas à proteólise limitada como descrito por Cleveland et al. (1977). Como mostrado na Fig.32, o padrão dos peptídios obtidos da digestão da Hsp70 e da proteína de 70 kDa é idêntico.

Para determinar se o mRNA da Hsp70 era expresso durante a esporulação, em temperatura normal, fizemos hibridizações de "blots" de RNA, utilizando como sonda o gene hsp70 de Drosophila clonado em pBR322. Assim, em condições de baixa estrringência, detectamos um transcrito de 2600 nucleotídeos nos "blots" tanto de RNA total (Fig.33B) como de RNA poli(A⁺) (Fig.33A). Durante a esporulação à temperatura normal, observa-se máxima quantidade deste transcrito aos 120 min (Fig.33A); nenhuma hibridização foi detectada com RNAs de células do início da esporulação (Fig.33A) ou mesmo

Figura 32 - Comparação dos mapas peptídicos da proteína Hsp70, induzida pelo choque térmico durante a germinação, e da proteína correspondente de 70 kDa induzida espontaneamente durante a esporulação. Células esporulantes foram marcadas com [35 S]metionina no intervalo 90-120 min da esporulação à temperatura normal (A). Durante a germinação as células foram aquecidas a 38°C no intervalo 15-45 min na presença de [35 S]metionina (B). As bandas correspondentes a Hsp70 foram cortadas de gel bidimensional e submetidas à digestão proteolítica parcial com protease V8 de *Staphylococcus aureus*. Os fragmentos obtidos foram separados através de eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida 15%/SDS e detectados por fluorografia. Os marcadores de peso molecular em kDa estão indicados à direita do auto-radiograma do gel.

Figura 33 - Hibridização da sonda do gene *hsp70* de *Drosophila* com RNA isolado de células controle e células aquecidas a 38°C. Após separação através de eletroforese em géis de agarose e transferência para filtros Gene Screen, o RNA foi submetido à hibridização com a sonda (plasmídeo B8 contendo o gene *hsp70* de *Drosophila*) marcada com ^{32}P pela reação de "nick-translation". (A) RNA poli(A)⁺ isolado de células após 60 (1), 120 (2) e 180 (3) min após indução da esporulação a 27°C. (B) RNA total isolado de células esporulantes aquecidas a 38°C nos intervalos 30-60 min (3), 60-90 min (4), 90-120 min (5), 90-150 min (6) ou 150-180 min (7) e células controle após 30 min (1) ou 180 min (2) da indução da esporulação. A menor intensidade de hibridização observada nas canaletas 5 e 6 é devido a menor quantidade de RNA aplicada. As setas apontam a posição dos rRNAs (25S e 18S visualizados pela coloração do gel com brometo de etídio) e do transcrito de 2600 nucleotídeos.

de zoósporos (não mostrado). Estes dados concordam com os resultados sobre a síntese "in vivo" da proteína de 70 kDa verificada durante a esporulação normal, bem como com os resultados de tradução "in vitro", que demonstraram a comigração em eletroforese bidimensional desta proteína de 70 kDa com a Hsp70 (Figs.30 e 31). Além disso, a Fig.33B mostra que a síntese da Hsp70, induzida pelo choque térmico nos vários momentos da esporulação, é também devida a um acúmulo do mRNA para Hsp70.

Mais uma evidência da identidade entre a proteína de 70 kDa e Hsp 70 de Blastocladiella foi obtida ao detectarmos reação imunológica cruzada de ambas proteínas com o anti-soro contra a proteína DnaK de E.coli, análoga à Hsp70 em procariotos (Bardwell e Craig, 1984). Como mostra a Fig.34, uma banda dupla na região de 70 kDa do gel foi precipitada especificamente, de extratos de células de Blastocladiella marcadas com [³⁵S]metionina, pelo anticorpo anti-DnaK. A quantificação, através de ensaio de imunoprecipitação, do aumento da síntese da proteína de 70 kDa durante a esporulação não pôde ser feita devido à proteólise que ocasionalmente ocorre durante a incubação com o anticorpo.

Também detectamos reação imunológica da proteína Hsp70 de Blastocladiella com anticorpo monoclonal contra Hsp70 de Drosophila. Este anticorpo reconhece um epitopo conservado nos vários membros da família dos genes hsp70 na maioria das células eucarióticas (Kurtz et al., 1986). Nas figuras 35A e 35B, são mostrados "immunoblots" de géis bidimensionais de

Figura 34 - Imunoprecipitação da proteína de 70 kDa de células normais e aquecidas a 38°C. Extratos de células marcadas com ^{35}S metionina foram submetidas à imunoreação com anti-soro contra a proteína DnaK de *E.coli*. As proteínas precipitadas foram analisadas através de eletroforese unidimensional e fluorografia. Canaletas: (1), células esporulantes de 120 min; (2), células esporulantes aquecidas no intervalo 30-60 min de esporulação; (3), células de *E.coli* cepa K12 aquecidas a 42°C por 12 min; (4), células de *E.coli* mantidas a temperatura normal. Em *Blastocladiella*, a marcação com ^{35}S metionina foi feita nos 20 min finais da incubação e em *E.coli* nos 7 min finais. A seta à direita aponta a Hsp70. As setas à esquerda representam os marcadores de peso molecular (67,55,45 kDa, de cima para baixo).

Figura 35 - Imunodeteção da Hsp70 em "blots" de géis bidimensionais. Proteínas totais de células de 120 min de esporulação (A), células aquecidas a 38°C entre 0-60 min de esporulação (B), germes de 45 min em meio AL (D) e germes aquecidos a 38°C entre 15-45 min de germinação (E) foram submetidas à eletroforese bidimensional IEF/SDS e transferência. (C) e (F) correspondem a mistura das amostras analisadas em (A e B) e (D e E), respectivamente. Os "blots" foram incubados com anticorpo monoclonal anti-Hsp70 de *Drosophila*, desenvolvido em rato, lavados e incubados com anticorpo anti-IgG de rato desenvolvido em coelho. O complexo antígeno-anticorpo foi revelado imunoenzimaticamente através de reação de diaminobenzidina e H₂O₂ com peroxidase conjugada a anti-IgG de coelho. Estão apresentados apenas parte de cada "blot". As setas à direita apontam a proteína Hsp70.

proteínas isoladas de células esporulantes de 120 min e de células esporulantes aquecidas a 38°C, no intervalo 0-60 min da esporulação. O "immunoblot" do gel em que ambas as amostras foram misturadas não revelou nenhuma banda adicional, demonstrando se tratar da mesma proteína (Fig.35C). Este monoclonal anti-Hsp70 também detectou a mesma proteína de 70 kDa nos "immunoblots" de géis bidimensionais das proteínas isoladas de germes de 45 min submetidos ou não a tratamento térmico de 30 min (Figs.35D,E,F).

2.3. Indução de termotolerância durante o desenvolvimento de *B. emersonii*

A termotolerância é definida como a capacidade das células sobreviverem a uma temperatura letal se forem previamente expostas a temperaturas supra-ótimas ou outros tipos de estresses. Embora exista alguma controversia, tem sido proposto um envolvimento das proteínas de choque térmico e a aquisição de termotolerância. Contudo, alguns dados indicam que não necessariamente todas as Hsps estão envolvidas nesta proteção (para revisão, ver Lindquist, 1986; Craig, 1985).

Ao estudarmos a resposta ao choque térmico durante o ciclo de vida de *B. emersonii* verificamos que diferentes conjuntos de Hsps foram induzidos em cada fase (esporulação, germinação e crescimento), demonstrando que, neste

organismo, a expressão dos genes de choque térmico não é coordenada. Além disso, durante a esporulação algumas Hsps são espontaneamente expressas. Com o objetivo de determinarmos quais proteínas de choque térmico estão envolvidas na aquisição do efeito protetor conferido pela termotolerância, investigamos a síntese de proteínas durante a aquisição da termotolerância em Blastocladiella.

As células de diferentes fases do ciclo de vida (início da esporulação, germinação e início do crescimento) foram submetidas a diferentes condições de hipertermia. As células foram expostas diretamente a 42°C ou submetidas a um pré-tratamento a 34°C, seguido de um tratamento a 38°C e finalmente expostas a 42°C. O efeito destes tratamentos na sobrevivência das células está mostrado na Fig. 36. A sobrevivência foi determinada pela capacidade de produção de zoósporos após retorno a 27°C das células tratadas, para que pudessem assim retomar o seu desenvolvimento normal. Durante a germinação, a pré-incubação a temperaturas intermediárias (34°C por 15 min e 38°C por mais 15 min) protege contra os efeitos letais da hipertermia a 42°C (Fig.36B). Durante a esporulação e crescimento também ocorre uma proteção, embora não tão acentuada (Figs.36A,C). A viabilidade não é afetada quando as células são aquecidas diretamente a 38°C.

Se a síntese de Hsps for bloqueada com cicloeximida durante a incubação a 34°C e 38°C, as células não são protegidas da morte a 42°C (não mostrado).

Figura 36 - Indução de termoproteção. (A) Células esporulantes foram sucessivamente transferidas para 34°C por 30 min, para 38°C por 30 min e finalmente incubadas a 42°C (□—□) ou transferidas diretamente para 42°C (○—○). (B) Zoósporos induzidos a germinar em meio AL a 27°C durante 15 min foram transferidos diretamente para 42°C (○—○) ou sucessivamente para 34°C por 15 min, para 38°C por 15 min e então para 42°C (□—□). (C) Células em crescimento a 27°C foram transferidas diretamente para 42°C (○—○) ou sucessivamente transferidas para 34°C por 30 min, para 38°C por 30 min e finalmente para 42°C (□—□). Após os tempos indicados de incubação a 42°C, as células foram retornadas para 27°C e a viabilidade foi aferida. 100% corresponde à viabilidade das células mantidas a 27°C que não sofreram qualquer tratamento.

Ao analisarmos o padrão unidimensional das proteínas sintetizadas por células em crescimento expostas a diferentes temperaturas (Fig.37) observamos uma alta incorporação de [³⁵S]metionina nas células aquecidas até 38°C sendo que acima desta temperatura (40°C) ocorre uma drástica queda na incorporação. A 42°C, a síntese proteica diminui mais que 95%. Na incubação a 38°C por 30 min, foram induzidas proteínas de choque térmico. Estas proteínas foram também sintetizadas quando as células em crescimento foram inicialmente expostas a 34°C, transferidas para 38°C e finalmente expostas a 42°C.

Através de eletroforese bidimensional fizemos uma análise mais detalhada das proteínas sintetizadas durante a termotolerância nas diferentes fases do ciclo. Na Fig.38, os auto-radiogramas das proteínas sintetizadas na termotolerância são comparados aos padrões obtidos à temperatura normal e durante o choque térmico a 38°C. A tabela 2 resume estes resultados. Como apresentado no item III.2.1, a exposição das células a 38°C induz a síntese de conjuntos específicos de Hsps dependendo do estágio de desenvolvimento das células. Durante a termotolerância, em cada uma das três fases analisadas, foram induzidas a maioria, se não todas, das Hsps típicas da esporulação ou da germinação ou do crescimento, sendo que algumas Hsps são comuns a estas três fases. Assim, pode ser feita uma correlação entre a indução da síntese das Hsps 82a, 82b, 76, 70, 60, 25 e 17b e o desenvolvimento da termotolerância. É

Figura 37 - Padrão unidimensional de proteínas sintetizadas a diferentes temperaturas e durante a termotolerância. Células no início do crescimento em meio AL foram tratadas por 30 min a 27°C (A), 38°C (B), 40°C (C), 42°C (D) ou tratadas por 30 min a 34°C, C transferidas para 38°C por 30 min e então aquecidas a 42°C por 30 min (E). Quantidades equivalentes de proteínas foram aplicadas em cada canaleta. A marcação com ^{35}S metionina foi feita nos 20 min finais de cada incubação ou durante todo o período de indução de termotolerância. As setas à esquerda representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

Figura 38 - Padrão bidimensional (IEF/SDS) de proteínas sintetizadas durante a termotolerância induzida na esporulação, germinação ou crescimento. As células foram induzidas a esporular e em seguida foram mantidas a 27°C por 90 min (A), ou aquecidas a 38°C no intervalo 60-90 min (B), ou transferidas sucessivamente para 34°C, 38°C e 42°C durante os intervalos 0-30 min, 30-60 min e 60-90 min respectivamente (C), após a indução da esporulação. Zoósporos foram induzidos a germinar em solução inorgânica e mantidos a 27°C por 60 min (D), ou aquecidos a 38°C durante o intervalo 45-60 min (E), ou transferidos sucessivamente para 34°C, 38°C e 42°C durante os intervalos 15-30 min, 30-45 min, 45-60 min, respectivamente (F), após indução da germinação. Células no início do crescimento (120 min após inoculação dos zoósporos em meio AL) foram mantidas a 27°C por 30 min (G), ou aquecidas por 30 min a 38°C (H), ou transferidas sucessivamente para 34°C, 38°C e 42°C por 30 min em cada temperatura (I). A marcação com ^{35}S metionina foi feita nos 20 min (10 min na germinação) finais da incubação nas temperaturas indicadas ou durante todo o período de aquisição de termotolerância. As setas à esquerda representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

TABELA 2. PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO INDUZIDAS DURANTE A
 TERMOTOLERANCIA (TT) EM DIFERENTES ESTÁGIOS DO CICLO DE VIDA
 DE B. emersonii

hsps (kDa)	esporulação		germinação tardia		início do crescimento	
	38°C	TT	38°C	TT	38°C	TT
84	+	+	+	+	-	-
82a	+	+	+	+	+	+
82b	+	+	+	+	+	+
76*	+	+	+	+	+	+
70*	+	+	+	+	+	+
60	+	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+	+
45a	+	+	-	-	+	+
45b	+	+	-	-	+	+
45c	+	+	-	-	+	+
39a*	+	+	+	-	+	+
39b	+	-	-	-	-	-
39c	+	-	-	-	-	-
39d	+	-	-	-	-	-
30a	+	+	+	+	-	-
30b	-	-	+	+	+	+
30c	-	-	+	+	-	-
30d	-	-	+	+	+	+
25	+	+	+	+	+	+
24	-	-	+	+	-	-
17a	+	+	+	+	-	-
17b	+	+	+	+	+	+

* estas proteínas são sintetizadas espontaneamente durante a esporulação

provável que as outras Hsps (84, 50, 45a, 45b, 45c, 39a, 39b, 39c, 39d, 30a, 30b, 30c, 30d, 24 e 17a) não estejam especificamente envolvidas na termotolerância.

2.4. Discussão

A síntese de pelo menos 22 polipeptídios é acentuadamente induzida quando células de Blastocladiella são submetidas ao choque térmico a 38°C nas várias fases do seu ciclo de vida. A proteína de choque térmico mais abundante induzida em Blastocladiella, Hsp 70, é análoga à Hsp70 de Drosophila e à proteína DnaK de E.coli. A imunoprecipitação de uma proteína de 70 kDa, induzida pelo calor, com o anti-soro anti-DnaK, a imunodetecção de uma proteína de 70 kDa com anticorpo anti-Hsp70 de Drosophila, além da detecção do seu mRNA, utilizando-se o gene hsp70 de Drosophila como sonda, forneceram fortes evidências acerca da identidade destas proteínas, confirmando a extrema conservação da Hsp70 na evolução. As Hsps de Blastocladiella possuem um padrão de indução característico de cada fase do desenvolvimento. Algumas Hsps não são induzidas em certas fases mesmo sob tratamento térmico, enquanto a síntese de outras é induzida pelo choque térmico apenas em fases específicas do ciclo de vida. Por exemplo, as Hsps 24 e 30c são típicas da germinação e não são expressas em qualquer outra fase do desenvolvimento, enquanto as Hsps 39b, 39c, 39d são apenas expressas durante a esporulação. Contudo não

está claro porque uma classe particular de Hsps é preferencialmente induzida nos diferentes estágios do desenvolvimento; esta seletividade pode estar refletindo um fenômeno regulatório mais amplo e também fundamental para a diferenciação do organismo. O comportamento destas Hsps contrasta com aquele de sete outras Hsps (Hsp82a, Hsp82b, Hsp76, Hsp70, Hsp60, Hsp25, Hsp17b) que são induzidas tanto durante o choque térmico na esporulação como na germinação e crescimento. Estas sete Hsps poderiam estar envolvidas com a aquisição de termotolerância que pode ser induzida neste fungo, como discutiremos a seguir.

A regulação da síntese de Hsps em B.emersonii ocorre não apenas em resposta à elevação da temperatura, mas também como parte do desenvolvimento normal deste organismo. Três proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsp76, Hsp39a) são sintetizadas durante fases específicas da esporulação à temperatura normal, não sendo sintetizadas espontaneamente em outras fases. Estudos de hibridização de "blots" de RNA e tradução "in vitro" mostraram que o aumento da síntese da Hsp70 durante a esporulação reflete a acumulação do mRNA para esta proteína neste estágio específico do desenvolvimento. Os resultados obtidos a partir de mapas peptídicos, sugerem fortemente a identidade entre o gene hsp70 que é expresso espontaneamente durante a esporulação e aquele que é induzido pelo calor. É importante destacar que, de acordo com os dados obtidos da análise da síntese "in vivo" de proteínas, os níveis de síntese da Hsp70, Hsp76 e

Hsp39a não são significativamente aumentados se, durante a fase de indução espontânea, o organismo for submetido a hipertermia. A partir destes dados, podemos concluir que um controle do desenvolvimento está aparentemente superposto à indutibilidade da síntese de Hsps pelo calor.

Presumivelmente o aumento da síntese da Hsp70, e provavelmente de outras Hsps (76 e 39a), durante a esporulação, não é simplesmente uma resposta ao estresse causado pela carência nutritiva. O aparecimento da Hsp70 e Hsp76 ocorre somente após 120 min da indução da carência, enquanto a variação verificada no padrão da síntese proteica tem início nos primeiros momentos da esporulação (item III.1.1.; Silva et al., 1986). Portanto, a ativação do gene hsp70 durante a esporulação não é parte da resposta à carência, mas parte de um programa de ativação do desenvolvimento.

A proteína Hsp70 é uma das proteínas mais abundantes em Blastocladiella, conforme detecção por coloração com azul de Coomassie de géis bidimensionais de poliacrilamida/SDS (não mostrado). Embora sua síntese seja forte e espontaneamente induzida entre 90-120 min da esporulação e durante o choque térmico em qualquer fase do ciclo, seu conteúdo em massa parece não variar durante o ciclo de vida e nem após a indução do choque térmico, ao menos dentro dos limites de detecção através da inspeção visual de géis corados. A Hsp70, sintetizada espontaneamente durante a esporulação, é conservada nos zoósporos e germes, como pôde ser detectado

através da utilização do anticorpo monoclonal anti-Hsp70 de Drosophila. Durante a germinação não observamos síntese da Hsp70; contudo durante o início do crescimento é sintetizada uma proteína de 70 kDa, com mobilidade eletroforética semelhante à Hsp70, que foi denominada proteína nºG11 e cuja síntese é mantida em níveis basais ao longo do crescimento.

Uma família de genes relacionados ao gene hsp70 foi encontrada nos genomas de Drosophila e leveduras (Ingolia et al., 1982; Ingolia e Craig, 1982b). Em ambos os casos, alguns membros são induzidos pelo calor enquanto outros são transcritos em condições de crescimento normal e não são induzidos pelo tratamento térmico. Os produtos proteicos codificados por estes genes são similares, mas não idênticos, quando analisados por eletroforese bidimensional ou mapeamento peptídico (Wadsworth, 1982; Craig e Jacobsen, 1985). A função destes genes cognatos permanece obscura.

A síntese proteica é essencial para o processo de germinação de zoósporos, sendo dirigida principalmente pelos mRNAs que estão armazenados nos zoósporos (ítem III.1.2.; Silva et al., 1987a). Em contraste, obtivemos evidências de que o controle da expressão dos genes de choque térmico ocorre ao nível da transcrição, sendo que não foi encontrado nenhum mensageiro para proteínas de choque térmico em zoósporos, apesar da indução de uma proteína idêntica à Hsp70 durante a esporulação.

Uma forte correlação entre a expressão de Hsps e o desenvolvimento da termotolerância tem sido encontrada em

vários organismos (McAlister e Finkelstein, 1980a; Loomis e Weeler, 1982; Li e Werb, 1982; Plesofsky-Vig e Brambl, 1985). A evidência mais forte para a ligação entre estes dois fenômenos foi encontrada em E.coli onde uma linhagem com uma mutação do gene regulatório (hin), que portanto não sintetiza Hsps, é incapaz de desenvolver termotolerância (Yamomori e Yura, 1982). Em eucariotos esta evidência não é tão clara. Alguns autores relataram que para a indução da termotolerância adquirida não é necessária a síntese de Hsps (Hall, 1983; Widelitz et al., 1986). Em contraste, alguns trabalhos relatam o envolvimento direto de uma certa classe de Hsps (Hsps de menor peso molecular) na proteção à hipertermia letal (Loomis e Weeler, 1982; Berger e Woodward, 1983; Nover e Scharf, 1984), embora recentemente tenha sido mostrado que a Hsp26 não é necessária para a aquisição da termotolerância em leveduras (Petko e Lindquist, 1986). Em células em cultura de fibroblastos de hamster chinês, o aumento da síntese da Hsp70 está correlacionado com o aumento da sobrevivência ao calor (Li, 1984). Em S.cerevisiae, parece ser a proteína de choque térmico de 48 kDa a responsável pela termotolerância (Iida e Yahara, 1984a,b).

Uma vez que durante a esporulação algumas Hsps (Hsp76, Hsp70 e Hsp39a) são constitutivamente expressas, seria esperado uma maior termorresistência para as células desta fase. Contudo, estas células são aparentemente tão termossensíveis quanto células germinantes ou em

crescimento. Portanto, se estas Hsps exercem algum papel na termoproteção elas o desempenham em consonância com outras Hsps. Portanto, é provável que a maioria das Hsps induzidas em Blastocladiella não esteja especificamente envolvida na aquisição da termotolerância. Nossos resultados demonstraram que apenas um grupo de sete Hsps (de um total de 22) parece estar envolvido no fenômeno de termoproteção.

3. Efeito do choque térmico na fosforilação da proteína ribossomal S6 de *B. emersonii*

Dados obtidos anteriormente em nosso laboratório demonstraram que o nível de fosforilação da proteína ribossomal S6 varia de intermediário a máximo durante o desenvolvimento e em resposta a alterações do meio externo destas células (Bonato et al., 1984). Como em Blastocladiella a resposta ao choque térmico também está sob o controle do desenvolvimento, com conjuntos específicos de Hsps sendo induzidos em cada fase do desenvolvimento (item III.2.1.; Bonato et al., 1987), este organismo poderia então ser utilizado para verificar se os diferentes níveis de fosforilação de S6 estariam correlacionados com a tradução de mensagens específicas - tanto mRNAs de choque térmico ou normais - durante o choque térmico, recuperação do choque térmico e indução da termotolerância nos diferentes estágios do ciclo de vida.

O nível de fosforilação de S6 em células expostas a hipertermia (38°C) durante a esporulação, germinação e início do crescimento foi então examinado. O estado de fosforilação de S6 pode ser medido de acordo com sua migração eletroforética em géis bidimensionais de poliacrilamida e uréia corados com azul de Coomassie. Quanto mais fosforilada estiver a S6 menor é a sua migração em ambas as dimensões do gel (Lastick e McConkey, 1976; Gressner e Wool, 1974).

Durante a esporulação à temperatura normal observa-se um grau intermediário para a fosforilação de S6 (Fig.39A), em contraste aos derivados altamente fosforilados obtidos na primeira hora do crescimento em meio nutriente (Fig.39C,E). A forma não-fosforilada de S6 é predominante durante a esporulação a 27°C, podendo ser visualizados os derivados S6a, S6b e S6c em quantidades decrescentes (Fig.39A). A germinação pode ser induzida em meio nutriente (AL) ou solução inorgânica e, embora a cinética de germinação seja idêntica em ambos os casos (cerca de 95% de germes após 45-60 min), os níveis de fosforilação de S6 são significativamente diferentes (Fig.39C,G). Em solução inorgânica apenas os derivados S6a e S6b podem ser fracamente visualizados enquanto derivados altamente fosforilados são gradualmente induzidos após 60 e 90 min da indução da germinação em meio de crescimento (Fig.39C,E). Quando todos esses tipos celulares são aquecidos a 38°C por 30 min, observa-se uma completa desfosforilação de S6 (Figs.39B,D,F,H). Os derivados fosforilados de S6 desaparecem completamente ocorrendo um aumento substancial da forma não-fosforilada. O choque térmico não apenas bloqueia a indução da fosforilação de S6 (Figs.39C,D), como é responsável pela rápida desfosforilação verificada quando células com máximo grau de fosforilação de S6 (90 min de crescimento) são aquecidas (Figs.39E,F). Portanto, o choque térmico por 30 min a 38°C induz completa desfosforilação de

Figura 39 - Legenda na página seguinte

Figura 39 - Desfosforilação da proteína ribossomal S6 durante o choque térmico na esporulação, germinação e início do crescimento. Ribossomos foram isolados e as proteínas ribossomais foram analisadas através de eletroforese bidimensional (básico/ácido). São mostrados os géis corados com azul de Coomassie de (A) células esporulantes após 90 min de indução da esporulação a 27°C; (B) células esporulantes submetidas ao choque térmico no intervalo 60-90 min da esporulação; (C) células germinantes obtidas após 60 min da indução da germinação de zoósporos a 27°C em meio AL; (D) células germinantes submetidas ao choque térmico durante o intervalo 30-60 min da germinação em meio AL; (E) células após 120 min de crescimento a 27°C em meio AL; (F) células em crescimento em meio AL submetidas ao choque térmico durante o intervalo 90-120 min; (G) células germinantes após 60 min de germinação a 27°C em solução inorgânica; (H) células germinantes em solução inorgânica, submetidas ao choque térmico durante o intervalo 30-60 min. a, b, c e d indicam as diferentes formas fosforiladas de S6.

S6, independente do estado inicial de fosforilação de S6 ser intermediário ou máximo.

Para investigar se a proteína S6 permanece desfosforilada quando as células são induzidas a adquirir termotolerância, comparamos o estado de fosforilação de S6 de células expostas diretamente à temperatura letal ou expostas gradualmente a temperaturas supra-ótimas capazes de induzir termotolerância. O tratamento das células por 30 min a 42°C provoca morte celular, contudo a pré-exposição a 34°C por 30 min e 38°C por mais 30 min confere às células uma resistência à incubação letal de 30 min a 42°C, como apresentado no item III.2.3 (Silva et al., 1987b). A figura 40 mostra que em células em crescimento submetidas a termotolerância, a S6 está também completamente desfosforilada. É interessante notar a desfosforilação incompleta de S6 nas células expostas diretamente a 42°C, sugerindo que uma atividade de fosfatase parece ter sido parcialmente inibida nesta temperatura letal. Quando a termotolerância foi induzida durante a esporulação ou germinação, também foi observada a desfosforilação de S6, enquanto a exposição direta a 42°C também provocou uma incompleta desfosforilação de S6 (resultados não mostrados), apesar dos níveis de fosforilação característicos de cada uma destas fases.

Com objetivo de verificarmos se a recuperação ao choque térmico estaria associada com a refosforilação de S6, examinamos os padrões de síntese proteica e o estado de

Figura 40 - Desfosforilação de S6 durante a termotolerância. (A) Zoósporos foram induzidos a germinar em meio AL por 30 min e em seguida transferidos para 34°C por 30 min, para 38°C por 30 min, e finalmente para 42°C por 30 min. (B) Células após 90 min de crescimento em meio AL foram transferidas diretamente para 42°C por 30 min. (C) Células após crescimento por 120 min a 27°C. São mostradas regiões dos géis de proteínas ribossomais corados com azul de Coomassie.

fosforilação de 56 após vários tempos de retorno das células à temperatura normal, após um choque térmico de 30 min de duração durante a esporulação e início do crescimento. Esta análise não pode ser feita durante a germinação porque, após 45 min da indução da germinação em meio AL, os processos de germinação e crescimento são superpostos. Como apresentado no item III.2.1., durante o choque térmico a 38°C não ocorre uma completa inibição da síntese proteica normal, mas existe uma clara indução de conjuntos específicos de proteínas de choque térmico, dependendo da fase do desenvolvimento. As Hsps 82a, 82b, 76, 70, 60, 50, 45a, 45b, 45c, 39a, 30b, 30d, 25 e 17b são induzidas durante o crescimento (Fig.41A) e as Hsps 84, 82a, 82b, 76, 70, 60, 45a, 45b, 45c, 39a, 39b, 39c, 39d, 30a, 25, 17a e 17b são induzidas durante o início da esporulação (Fig.41D). Quando estas células retornam à temperatura normal (27°C) a síntese de Hsps é gradualmente e diferencialmente inibida. Após 60 min a 27°C a síntese das Hsps não é mais detectada em células em crescimento (Fig.41C). O mesmo ocorre após 90 min de recuperação das células esporulantes (Fig.41E). Como mostrado na Fig.42, a cinética de refosforilação de 56 coincide com a interrupção da síntese de Hsps e com a completa recuperação do padrão de síntese proteica normal, durante o início do crescimento e durante a esporulação.

A desfosforilação da proteína ribossomal 56 em resposta ao choque térmico demonstrou ser um fenômeno bastante específico, não sendo simplesmente um evento geral de

Figura 41 - Legenda na página seguinte

Figura 41 - Recuperação da síntese de proteínas após tratamento térmico de 30 min em células em crescimento e células esporulantes. Após 60 min de crescimento a 27°C, as células foram submetidas a tratamento térmico a 38°C (A) e retornadas para 27°C por 30 min (B) e 60 min (C). Após 30 min de indução da esporulação a 27°C, as células foram incubadas a 38°C por 30 min (D) e em seguida retornadas para 27°C por 60 min (E) e 90 min (F). Em todos os casos as células foram marcadas com [³⁵S]metionina nos 20 min finais da incubação nos tempos indicados. As proteínas foram separadas através de eletroforese bidimensional IEF/SDS. As setas à direita dos auto-radiogramas (lado ácido) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo). Os números indicam as Hsps.

Figura 42 - Mudança no estado de fosforilação de S6 durante a recuperação do choque térmico em células em crescimento e células esporulantes. A germinação dos zoósporos foi induzida em meio de crescimento AL e as células foram submetidas a tratamento térmico no intervalo 60-90 min (A) e em seguida retornadas para 27°C por 30 (B) e 60 min (C). Células esporulantes foram aquecidas a 38°C durante o intervalo 30-60 min da esporulação (D) e em seguida retornadas para 27°C por 60 min (E) ou 90 min (F). São mostradas regiões de géis de proteínas ribossomais corados com azul de Coomassie.

desfosforilação de proteínas que estaria ocorrendo durante o choque térmico. Quando células marcadas com ^{32}P foram expostas a 38°C por 30 min, o padrão de proteínas obtido através da eletroforese bidimensional em gel de poliacrilamida (IEF/SDS) é bastante similar àquele obtido com as células controle, exceto para três proteínas (80, 72 e 48 kDa) cuja fosforilação foi aumentada e outra (42 kDa) cuja fosforilação sofreu um decréscimo (Fig.43).

3.1. Discussão

Independente do estado inicial da fosforilação de S6 (intermediário ou máximo), verificamos que o choque térmico provoca sempre uma completa e específica desfosforilação de S6. A desfosforilação de S6 coincide com a resposta ao choque térmico, sendo que a S6 também permanece desfosforilada durante a termotolerância. A recuperação do choque térmico é acompanhada de um aumento na fosforilação de S6, que termina por retornar aos níveis típicos de cada estágio do desenvolvimento. Nossos resultados confirmam uma correlação entre a desfosforilação de S6 e a tradução de uma classe definida de proteínas (Hsps), e mostram que a refosforilação de S6 (mesmo a níveis intermediários) está associada com a retomada da síntese proteica normal e com a interrupção da síntese de proteínas de choque térmico, como previamente estabelecido para células HeLa e células de tomate (Scharf e Nover, 1982; Kennedy et al., 1984).

Figura 43 - Eletroforese bidimensional IEF/SDS de proteínas totais fosforiladas em células normais e aquecidas a 38°C. Após 30 min da indução de esporulação as células foram transferidas para 38°C e mantidas nesta temperatura por 30 min (B). Em (A) células esporulantes de 60 min, como controle. A marcação com ^{32}P foi feita durante todo crescimento e esporulação. As setas à direita dos autoradiogramas (lado ácido) representam os marcadores de peso molecular (67, 55, 45 e 25 kDa, de cima para baixo).

Portanto, derivados de S6 altamente fosforilados parecem não ser necessários à retomada da síntese proteica normal durante a recuperação do choque térmico.

Durante a germinação dos zoósporos, a retomada da síntese proteica que ocorre em solução inorgânica ou meio nutriente é também independente do grau de fosforilação de S6, uma vez que em solução inorgânica a S6 é quase que completamente desfosforilada enquanto que a germinação em meio nutriente - tanto na presença de extrato de levedura (meio DM3) (Bonato et al., 1984) ou de uma certa mistura de aminoácidos (meio AL) - leva a um aumento da fosforilação de S6 e os derivados d e c são as formas predominantes. Contudo, nós observamos diferenças no padrão de síntese proteica durante a germinação em meio AL e em solução inorgânica (ítem III. 1.2; Silva et al., 1987a). Todos estes resultados, se considerados juntos, indicam que a fosforilação de S6 poderia ter um papel na seleção de mensagens específicas durante a tradução. Algumas mensagens requerem a S6 desfosforilada (por exemplo mensagens para Hsps), outras mensagens (certas mensagens de crescimento) exigiriam máximos níveis de fosforilação, e outras seriam traduzidas em qualquer condição (como por exemplo as mensagens normais cuja tradução não é totalmente interrompida durante o choque térmico). No entanto esta é apenas uma mera especulação, já que não temos nenhuma evidência molecular do envolvimento da fosforilação de S6 na seletividade da tradução.

A fosforilação de S6 não é o único candidato a ser responsabilizado pela tradução seletiva dos mRNAs de choque térmico. Variações no estado de fosforilação de fatores de iniciação (eIF-2 α e eIF-4B) como também fatores solúveis poderiam estar afetando a tradução das mensagens de choque térmico (Duncan e Hershey, 1984; De Benedetti e Baglioni, 1986; Sanders et al., 1986). Além disso os mRNAs de choque térmico possuem algumas características na região 5' não-codificadora que poderiam ser responsáveis pela sua tradução preferencial (Klemenz et al., 1985; McGarry e Lindquist, 1985).

Nossos resultados também mostram que superposto ao controle do desenvolvimento exercido sobre a fosforilação de S6, o choque térmico induz uma completa e específica desfosforilação de S6. Contudo durante a recuperação, este controle do desenvolvimento é restabelecido. Assim, uma importante característica da fosforilação de S6 parece ser a sua rápida resposta às variações nas condições ambientais, sendo estas variações tanto capazes de estimular a fosforilação de S6, tais como nutrientes ou fatores de crescimento (Thomas et al., 1982; Trevillyan et al., 1985; Blennis et al., 1984; Maller et al., 1985), ou capazes de estimular a desfosforilação como o choque térmico (Glover, 1982; Scharf e Nover, 1982; Kennedy et al., 1984) ou outros estresses como por exemplo condições de hipertonicidade, (Kruppa e Clemens, 1984).

4. DISCUSSÃO FINAL

O ciclo de vida de Blastocladiella emersonii apresenta características particularmente interessantes, que o tornam um conveniente modelo experimental para estudos sobre os mecanismos envolvidos no processo de diferenciação celular. Durante as duas fases de diferenciação deste microorganismo, esporulação e germinação, ocorrem profundas mudanças na arquitetura celular, com alto grau de sincronia. Ao longo do processo de esporulação, que é induzido pela carência nutricional, ocorre uma série de mudanças morfológicas cujos principais marcos são: aparecimento de um septo basal (60-90 min), formação da papila (100-120 min), início da formação do flagelo ($\approx$ 150 min), clivagem do citoplasma ($\approx$ 180 min) e liberação dos zoósporos (210-240 min). Os zoósporos são células móveis e inativas com relação à síntese de RNA e proteínas. Quando colocados em uma solução apropriada (meio inorgânico contendo potássio ou meio nutriente), os zoósporos rápida e sincronicamente retraem seu flagelo, formam uma fina parede de quitina e convertem-se em germes, num processo que requer menos de 60 minutos. Após a germinação os germes podem crescer se as condições nutricionais forem adequadas (Lovett, 1975).

Os nossos resultados demonstraram que o processo de esporulação reflete uma drástica mudança no programa de expressão gênica. Rápidas variações no padrão de proteínas sintetizadas nos diferentes estágios da esporulação foram

verificadas através de eletroforese bidimensional, sendo que muitas destas variações são acompanhadas de uma variação também na população de mRNAs. Estes dados sugerem que o controle da expressão gênica durante esta fase de diferenciação celular ocorre principalmente ao nível de transcrição diferencial, uma vez que o aumento da síntese da maioria das proteínas reflete diretamente a abundância do seu mRNA. Dentre as proteínas cuja síntese é regulada pelo desenvolvimento, identificamos a actina, α e β -tubulinas, além de três proteínas de choque térmico como será discutido adiante. O aumento na síntese dessas proteínas acompanha o acúmulo dos seus respectivos mRNAs. É interessante observar que o aumento na síntese de actina coincide com o início da citodiferenciação dos zoósporos que resulta em uma célula altamente organizada. O aumento da síntese das tubulinas coincide com o período de formação do flagelo, e de fato estas proteínas foram encontradas entre os componentes do flagelo.

A intensa renovação de proteínas que ocorre durante a esporulação correlaciona-se bem com os dados anteriores da literatura, de que a degradação de proteínas é um evento essencial na conversão das células vegetativas em zoosporângios (Correa et al., 1978).

Observamos também, que a maior parte dos RNAs que são sintetizados durante a esporulação não são conservados nos zoósporos; estes resultados confirmam os dados de Jaworski e Thomson (1980) de que o RNA que é armazenado nos zoósporos é

sintetizado apenas nos 30 min finais da esporulação. Desta observação surge um interessante aspecto. O processo de germinação dos zoósporos é pré-programado durante o final da esporulação apresentando um interessante paralelo com os sistemas de embriogênese animal (Davison, 1976). A maior parte do processo de germinação não requer transcrição concomitante, e uma boa parte do aumento na síntese proteica que ocorre durante a germinação é resultado da tradução dos mRNAs transcritos durante a esporulação e armazenado no zoósporo (Soll e Sonneborn, 1971a; Leaver e Lovett, 1974; Jaworski e Thomson, 1980; Silva et al., 1987a). Demonstramos que o RNA contido nos zoósporos pode ser extraído em uma forma traduzível "in vitro", e aparentemente não existe distinção entre a população de RNA poli(A)⁺ e poli(A)⁻.

Contudo, embora durante o início da germinação não tenhamos observado mudanças qualitativas no padrão de síntese proteica, indicando que os eventos iniciais da germinação são inteiramente dirigidos pelos mRNAs armazenados nos zoósporo, na germinação tardia verificamos a síntese de novas proteínas, tanto a partir de alguns mRNAs armazenados nos zoósporos que são tardia e seletivamente ativados para a tradução, como a partir de novos RNAs. Estas novas proteínas específicas da germinação devem ser responsáveis por eventos relacionados ao processo de germinação que não são facilmente percebidos ao nível de rearranjos morfológicos, uma vez que actinomicina D não inibe a transição zoósporo --> germe. Elas podem também

estar envolvidas na elongação e ramificação do rizóide que, como observado por Leaver e Lovett (1974), parece depender de síntese de novos mRNAs.

Quando a germinação foi induzida em meio nutriente, observou-se a síntese de alguns polipeptídios exclusivos desta condição de crescimento. Uma classe de genes, envolvidos no controle da proliferação celular, também é seletivamente transcrita durante o crescimento em D. discoideum (Kopachik et al., 1985).

Os eventos precoces do processo de germinação aparentemente podem ocorrer mesmo na presença de cicloeximida (Lovett, 1968; Soll e Sonneborn, 1971b). Assim esta fase da germinação pode ser considerada um exemplo de diferenciação celular na ausência de síntese proteica. Algumas modificações (variações de carga, degradação específica) das proteínas preexistentes no zoósporos foram detectadas. Assim, o processo de germinação compreende múltiplos níveis de controle envolvendo controle ao nível de pós-tradução, tradução e transcrição diferencial de genes. Recentemente, foi relatado que a síntese proteica durante a germinação aeróbica de M. racemosus, aparentemente, é regulada em múltiplos níveis compreendendo transcrição diferencial, processamento e tradução seletiva de RNAs (Linz e Orlowski, 1987).

Uma questão fundamental na biologia do desenvolvimento, é a natureza dos mecanismos que são responsáveis pelo "liga/desliga" de genes envolvidos na progressão ordenada do

processo de diferenciação celular. A observação de que em Blastocladiella ambas as fases de diferenciação celular envolvem transcrição diferencial de genes, cujos produtos proteicos são estágio-específicos, além de caracterizar melhor este sistema biológico, abre a perspectiva para o isolamento de genes envolvidos no processo de diferenciação celular baseado na sua expressão diferencial durante o ciclo de vida de B.emersonii. Este tipo de abordagem tem sido usada no isolamento de genes específicos do processo de formação de conídios em A.nidulans (Zimmerman et al., 1980) e Neurospora crassa (Berlin e Yanofski, 1985b) bem como de genes regulados pelo desenvolvimento de D.discoideum que estão envolvidos no processo de germinação de esporos (Kelly et al., 1983) ou na agregação celular (Chung et al., 1981).

O fato de que os genes relacionados com o desenvolvimento são expressos de uma maneira ordenada exclui a possibilidade de que eles sejam regulados de um modo independente e sugere algum tipo de controle hierárquico, no qual genes controladores orquestrariam a atividade de grupos de genes estruturais (Gehring, 1985).

A expressão gênica diferencial que ocorre durante a esporulação em B.subtilis é controlada pela expressão de diferentes fatores sigma que redirecionam a especificidade da RNA polimerase para diferentes promotores (Losick e Youngman, 1984). O controle da expressão de um grande número de genes, no caso da biogênese do flagelo em E.coli e C.crescentus, envolve uma cascata de fatores proteicos agindo

em "trans", que afetariam de uma maneira hierárquica a transcrição dos genes envolvidos na biogênese do flagelo e na expressão de funções quimiotáticas (Komeda, 1982; Champer et al., 1987). A descoberta dos "homeo box" (sequências conservadas de 180 pares de base que foram encontradas nos genes homeóticos de Drosophila e que hipoteticamente codificam para uma proteína que poderia se ligar ao DNA, sendo responsável pela ativação de conjuntos específicos de genes) aponta na direção de que devam existir proteínas reguladoras, responsáveis pela ativação dos genes de desenvolvimento em eucariotos (Gehring, 1985, 1987).

Uma outra questão que procuramos responder foi saber até que ponto células diferenciadas respondem igualmente às variações ambientais, como por exemplo choque térmico, que envolvem uma mudança abrupta no padrão de expressão gênica dessas células.

Observamos que a resposta ao choque térmico em Blastocladiella é dependente do estágio de desenvolvimento. Conjuntos específicos de Hsps (de um total de 22) são induzidos em cada fase do desenvolvimento (esporulação, germinação e crescimento), demonstrando, assim, uma expressão não coordenada dos genes de choque térmico. Estes conjuntos específicos de Hsps são também induzidos durante a termotolerância. Porém, do total de 22 Hsps, apenas sete (Hsp82a, Hsp82b, Hsp76, Hsp70, Hsp60, Hsp25, Hsp17b) são induzidas pelo choque térmico em qualquer fase do desenvolvimento. Esta observação nos levou a proposição de

que estas sete Hsps é que estariam de fato envolvidas com o fenômeno de termoproteção induzido neste fungo.

Além disso, verificamos que durante fases específicas da esporulação, à temperatura fisiológica, ocorre a síntese de três proteínas de choque térmico (Hsp70, Hsp76 e Hsp39a). Todos os nossos dados apontam para uma identidade entre a Hsp70 induzida pelo choque térmico e a Hsp70 que aparece durante o desenvolvimento de Blastocladiella. Contudo, uma comprovação mais definitiva de que não se tratam de genes cognatos virá da análise da sequência gênica.

Nossos resultados somam-se aos recentes dados da literatura que relatam a existência, também em outros organismos, de uma regulação do desenvolvimento superposta à ativação transitória dos genes de choque térmico pelo calor. Existem fases do desenvolvimento ou tipos celulares onde certos genes hsps são ativos em condições fisiológicas normais e outros onde certos genes hsps não são induzidos mesmo após o choque térmico (Zimmerman et al., 1983; Bensaude et al., 1983; Bensaude e Morange, 1983; Mason et al., 1984; Kurtz e Lindquist, 1984; Bienz, 1984; Morimoto e Fodor, 1984). Recentes observações feitas em nosso laboratório mostram que na bactéria C.crescentus ocorre a síntese de quatro Hsps (70, 62, 24b e 23b) em condições normais de temperatura e que esta síntese está sob o controle do ciclo celular (Gomes et al., 1986). Mais especificamente durante a esporulação, foi verificada a indução de Hsps em outros organismos como B.subtilis (Hsp84 e Hsp31) e em levedura

(Hsp84, Hsp26 e proteínas da família da Hsp70) (Todd et al., 1985; Kurtz et al., 1986). Além disso, a hipertermia exerce um papel na ativação da morfogênese em fungos patogênicos como Histoplasma capsulatum (Lambowitz et al., 1983) e em tripanosomatídeos como Leishmania e Trypanosoma, induzindo a diferenciação destes organismos para suas formas patogênicas (Hunter et al., 1984; Lawrence e Robert-Gero, 1985; Vander-Plag et al., 1985).

Os mecanismos que regulariam a expressão espontânea, não coordenada de genes de choque térmico bem como, a sua não indutibilidade pelo calor em certas fases do desenvolvimento não são conhecidos. Bienz (1985) propôs a existência de dois tipos de mecanismos, baseando-se na descoberta da sequência consenso HSE, existente nos promotores de vários genes de choque térmico, e também do fator HSTF, normalmente existente nas células e que, quando ativado, é capaz de reconhecer o elemento HSE (Pelham, 1985; Parker e Topol, 1984). Uma primeira possibilidade seria que quantidades limitantes de HSTF ativado, específicas para certos tipos celulares, associadas à variabilidade na potência da região promotora de cada gene hsp, determinariam quais genes seriam ativados. Esta possibilidade poderia explicar a expressão do gene hsp83 sob condições normais, em Drosophila - este gene possui um promotor forte contendo três HSEs, o que o tornaria indutível mesmo em concentrações extremamente baixas de HSTF ativo, tal como estaria ocorrendo em células não estressadas. Outra possibilidade

seria a existência de outros fatores, específicos de certos tipos de células, que reconheceriam elementos promotores, distintos de HSE, que estariam adjacentes apenas a certos genes hsp.

Recentemente foi demonstrado que a estimulação mitogênica por adição de soro a células humanas em cultura induz um aumento da transcrição de genes hsp70 (Wu e Morimoto, 1985) e através de análise de deleções foi verificado que a região promotora destes genes contém pelo menos dois domínios regulatórios, um correspondente ao elemento HSE, que é responsável pela ativação do gene durante o choque térmico e um outro contendo uma sequência rica em purinas (GAAGGGGAAAAG) que é responsável pela ativação do gene em resposta à estimulação por soro (Wu et al., 1986).

Nossos dados, apesar da ausência de informações acerca da função das proteínas de choque térmico, reforçam a idéia de que as proteínas de choque térmico não estão meramente associadas com a proteção à hipertermia, devendo também exercer funções metabólicas e estruturais importantes na célula. Como as necessidades estruturais e metabólicas do organismo variam durante o processo de desenvolvimento, a resposta ao estresse ambiental deve ser adaptada à situação interna da célula no momento da agressão, levando à síntese de outras proteínas de choque térmico em adição àquelas que sempre seriam necessárias para o início da resposta ao choque térmico. Tem sido proposto que a função das proteínas

de choque térmico é eliminar ou reparar proteínas danificadas, anormais ou desnaturadas, sendo que Hsp70 teria um papel no reparo dos nucleolos danificados durante o choque térmico (Pelham, 1985). Após o choque térmico, a Hsp70 inicialmente liga-se fortemente ao componente nuclear e em seguida ao nucléolo (Velasquez e Lindquist, 1984; Welch e Feramisco, 1984; Collier e Schlesinger, 1986). A Hsp70 tem uma alta afinidade por ATP (Welch e Feramisco, 1985) e a proteína análoga de E.coli (produto do gene dnaK) tem uma atividade de ATPase (Zylicz et al., 1983).

Além disso tem sido proposto que o sistema de degradação das proteínas ligado a ubiquitina, que também é uma proteína induzida por choque térmico (Bond e Schlesinger, 1985), seria responsável pelo disparo da resposta ao choque térmico (Munro e Pelham, 1985). Estes autores propuseram que certas proteínas como HSTF poderiam ser mantidas na célula ligadas a ubiquitina, num sistema de equilíbrio dinâmico; o aumento na concentração de proteínas danificadas durante a hipertermia levaria a uma queda do nível de ubiquitina, resultando no aumento da concentração de HSTF na forma não ubiquitinada e que corresponderia à forma ativa do fator. Durante a esporulação em Blastocladiella ocorre uma intensa renovação de proteínas (Silva et al., 1986) o que poderia ser correlacionado com a indução espontânea de algumas Hsps durante este processo.

A nossa observação de que em Blastocladiella a resposta ao choque térmico é dependente do desenvolvimento

proporcionou a oportunidade de investigar se existiria alguma relação entre o estado da fosforilação da proteína ribossomal S6 e a tradução de mensagens específicas, que no caso estariam representadas pelas mensagens de choque térmico. Dados anteriores, obtidos em nosso laboratório, demonstraram que, neste fungo, o estado de fosforilação da proteína ribossomal S6 varia durante o desenvolvimento e em resposta a certos sinais nutricionais, por exemplo adição de extrato de levedura (Bonato et al., 1984). Estes resultados já mostravam que derivados altamente fosforilados de S6 não eram necessários para o aumento da síntese proteica durante o crescimento do germe.

Nossos resultados sugerem uma correlação entre a desfosforilação de S6 e a tradução de uma classe definida de proteínas (Hsps), como encontrado por outros (Scharf e Nover, 1982; Kennedy et al., 1984), e que derivados de S6 altamente fosforilados parecem não ser essenciais à retomada da síntese proteica normal durante a recuperação do choque térmico (Silva et al., 1987c).

É provável que o papel da fosforilação de S6 na regulação da tradução seja um tipo de controle muito mais fino do que previamente imaginado (ou seja, que fosse essencial para a iniciação da síntese proteica), ocorrendo em consonância com outros possíveis mecanismos de controle, tais como estado de fosforilação dos fatores de iniciação, existência de diferentes sequências líderes nos mRNAs, etc. Para esclarecer a regulação da fosforilação de S6 bem como

se estudar "in vitro" a função dessa fosforilação é essencial a purificação e a caracterização da proteína quinase responsável pela fosforilação de S6. Nesse sentido, estamos investigando a existência de uma proteína quinase específica para S6 em Blastocladiella e resultados preliminares mostraram a presença, em germes obtidos em meio DM3, de uma enzima que fosforila preferencialmente a subunidade 40S.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abe, S.S. e Lovett, J.S. (1982) Microtubular proteins and tubulin pool changes during zoospore germination in the fungus Blastocladiella emersonii. Arch. Microbiol. 131:323-329.
- Adelman, T.G. e Lovett, J.S. (1974) Evidence for a ribosome-associated translation inhibitor during differentiation of Blastocladiella emersonii. Biochim. Biophys. Acta 335: 236-245.
- Affara, N.A., Robert, B., Jacquet, M., Buckingham, M.E. e Gros, F. (1980) Changes in gene expression during myogenic differentiation. I. Regulation of messenger RNA sequences expressed during myotube formation. J. Mol. Biol. 140:441-458.
- Alton, T.H. e Lodish, H.F. (1977) Developmental changes in messenger RNAs and protein synthesis in Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 60:180-206.
- Arce, C.A., Rodrigues, J.A., Barra, H.S. e Caputto, R. (1975) Incorporation of L-tyrosine, L-phenylalanine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine as single units into rat brain tubulin. Eur. J. Biochem. 59:145-149.
- Atkinson, B.G. e Walden, D.B. (eds.) (1985) Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. Acad. Press, Inc. Orlando, Flórida.
- Aviv, H. e Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-1412.
- Ballinger, D.G. e Hunt, T. (1981) Fertilization of sea urchin eggs is accompanied by 40S ribosomal subunit phosphorylation. Dev. Biol. 87:277-285.
- Barbieri, C.L. e Camargo, E.P. (1975) Esterase activity during the life cycle of Blastocladiella emersonii. J. Bacteriol. 124:1626-1627.
- Bardwell, J.C.A e Craig, E.A. (1984) Major heat shock gene of Drosophila and Escherichia coli inducible dnaK gene are homologous. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:848-852.
- Barstow, W.E. e Lovett, J.S. (1974) Apical vesicles and microtubules in rhizoids of Blastocladiella emersonii. Effects of actinomycin D and cicloheximide on development during germination. Protoplasma 82:103-117.

- Belasco, J.G., Beatty, J.T., Adams, C.W., Von Gabain, A. e Cohen, S.N. (1985) Differential expression of photosynthesis genes in R. capsulata results from segmental differences in stability within the polycistronic rxcA transcript. Cell 40:171-181.
- Bensaude, O., Babinet, L., Morange, M. e Jacob, F. (1983) Heat shock protein, first major products of zygotic gene activity in mouse embryo. Nature 305:331-333.
- Bensaude, O. e Morange, M. (1983) Spontaneous high expression of heat-shock proteins in mouse embryonal carcinoma cells and ectoderm from day 8 mouse embryo. EMBO J. 2:173-177.
- Ben Ze'ev, A. (1986) The relationship between cytoplasmic organization, gene expression and morphogenesis. Trends Biochem. Sci. 11:478-481.
- Ben Ze'ev, A., Farmer, S.R. e Penman, S. (1979) Mechanism of regulating tubulin synthesis in cultured mammalian cells. Cell 17:319-325.
- Berger, E.M. e Woodward, M.P. (1983) Small heat shock proteins in Drosophila may confer thermal tolerance. Exp. Cell Res. 147:437-442.
- Berlin, V. e Yanofski, C. (1985a) Protein changes during the asexual cycle of Neurospora crassa. Mol.Cell.Biol. 5:839-848.
- Berlin, V. e Yanofski, C. (1985b) Isolation and characterization of genes differentially expressed during conidiation of Neurospora crassa. Mol. Cell. Biol. 5:849-855.
- Bienz, M. (1984) Developmental control of the heat shock response in Xenopus. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3138-3142.
- Bienz, M. (1985) Transient and developmental activation of heat-shock genes. Trends Biochem. Sci. 10:157-161.
- Bienz, M. e Gurdon, J.B. (1982) The heat shock response in Xenopus oocytes is controlled at the translational level. Cell 29:811-819.
- Blenis, J., Spivack, J.G. e Erickson, R.L. (1984) Phorbol ester, serum, and Rous sarcoma virus transforming gene product induce similar phosphorylation of ribosomal protein S6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6408-6412.

- Blerkom, J.V. (1981) Structural relationship and post-translational modification of stage-specific proteins synthesized during early preimplantation development in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:7629-7633.
- Bommer, V.A., Noll, F., Lutsch, G. e Bielka, H. (1980) Immunochemical detection of proteins in the small subunit of rat liver ribosomes involved in binding of ternary initiation complex. *FEBS Lett.* 111:171-174.
- Bonato, M.C.M., Maia, J.C.C. e Juliani, M.H. (1985) Analysis of Blastocladiella emersonii ribosomal proteins in four two dimensional gel electrophoresis systems. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 18:143-150.
- Bonato, M.C.M., Silva, A.M., Maia, J.C.C. e Juliani, M.H. (1984) Phosphorylation of ribosomal protein S6 in the aquatic fungus Blastocladiella emersonii. *Eur. J. Biochem.* 144:597-606.
- Bonato, M.C.M., Silva, A.M., Gomes, S.L., Maia, J.C.C. e Juliani, M.H. (1987) Differential expression of heat-shock proteins and spontaneous synthesis of HSP70 during the life cycle of Blastocladiella emersonii. *Eur. J. Biochem.* 163:211-220.
- Bond, U. e Schlesinger, M.J. (1985) Ubiquitin is a heat shock protein in chicken embryo fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 5:949-956.
- Brandhorst, B.P. (1976) Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* 52:310-317.
- Brochelto-Braga, M.R., Gomes, S.L. e Maia, J.C.C. (1982) Studies on the adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase of Blastocladiella emersonii. *Arch. Biochem. Biophys.* 217:295-304.
- Burdon, R.H. (1986) Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem. J.* 240:313-324.
- Burkhard, S.J. e Traugh, J.A. (1983) Changes in ribosome function by cAMP-dependent and cAMP-independent phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 258:14003-14008.
- Burland, T.G., Gull, K., Schedl, T., Boston, R.S. e Dove, W.F. (1983) Cell type-dependent expression of tubulins in Physarum. *J. Cell Biol.* 97:1852-1859.

- Burnette, W.N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* 112:195-203.
- Champer, R., Dingwall, A. e Shapiro, L. (1987) Cascade regulation of Caulobacter flagellar and chemotaxis genes. *J. Mol. Biol.* 194:71-80.
- Chapppell, T.G., Welch, W.J., Schlossman, D.M., Palter, K.B., Schlesinger, M.J. e Rothman, J. (1986) Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins. *Cell* 45:3-13.
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J., e Rutter, W.J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18:5294-5299.
- Chisholm, R.L., Fontana, D., Theibert, A., Lodish, H.F. e Devreotes, P. (1984) Development of Dictyostelium discoideum: chemotaxis, cell-cell adhesion and gene expression. In: *Microbial Development*. R. Losick e L. Shapiro (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 219-254.
- Chung, S., Landfear, S.M., Blumberg, D.D., Cohen, N.S. e Lodish, H.F. (1981) Synthesis and stability of developmentally regulated Dictyostelium mRNAs are affected by cell-cell contact and cAMP. *Cell* 24:785-797.
- Clayton, L., Pogson, C.I. e Gull, K. (1979) Microtubule proteins in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett.* 106:67-70.
- Clayton, L., Quinlan, R.A., Roobol, A., Pogson, C.I. e Gull, K. (1980) A comparison of tubulins from mammalian brain and Physarum polycephalum using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and peptide mapping. *FEBS Lett.* 115:301-305.
- Cleveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M.W. e Laemmli, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252:1102-1106.
- Cleveland, D.W., Lopata, M.A., Sherline, P. e Kirschner, M.W. (1981) Unpolymerized tubulin modulates the level of tubulin mRNA. *Cell* 25:537-546.
- Cleveland, D.W. e Sullivan, K.F. (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Ann. Rev. Biochem.* 54:331-365.

- Collatz, E., Plesset, J., Foy, J.J. e McLaughlin, C.S. (1985) Expression of the Drosophila 70000 dalton heat shock protein is translationally controlled in yeast. Yeast 1:49-56.
- Collier, N.C. e Schlesinger, M.J. (1986) The dynamic state of heat shock proteins in chicken embryo fibroblasts. J. Cell Biol. 103:1495-1507.
- Correa, J.U., Lemos, E.M. e Lodi, W.R. (1978) Inhibition of sporulation in the water mold Blastocladiella emersonii by antipain. Dev. Biol. 66:470-469.
- Correa, J.U., Rodrigues, V. e Lodi, W.R. (1979) Proteases of Blastocladiella emersonii: developmental patterns and sensitivity to inhibitors in vitro and in vivo. In: International Conference on Limited Proteolysis in Microorganisms. G.N. Cohen e H. Holzer (eds.), U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C., pp. 127-130.
- Craig, E.A. (1985) The heat shock response. CRC Crit. Rev. Biochem. 18:239-280.
- Craig, E.A., Ingolia, T.D. e Manseau, L.J. (1983) Expression of Drosophila heat-shock cognate genes during heat-shock and development. Dev. Biol. 99:418-426.
- Craig, E.A. e Jacobsen, K. (1985) Mutations in cognate genes of Saccharomyces cerevisiae hsp70 result in reduced growth rates at low temperatures. Mol. Cell. Biol. 5:3517-3524.
- Davison, J.N. (1976) Gene activity in early development. Academic Press, Inc., New York.
- De Benedetti, A. e Baglioni, C. (1986) Activation of hemin-regulated initiation factor-2 kinase in heat-shocked HeLa cells. J. Biol. Chem. 261:338-342.
- Desmarquets, G., Cortay, J.C. e Cozzzone, A.J. (1984) Two-dimensional analysis of proteins phosphorylated in E.coli cells. FEBS Lett. 173:337-341.
- Diggins, M.A. e Dove, W.F. (1987) Distribution of acetylated alpha-tubulin in Physarum polycephalum. J. Cell. Biol. 104:303-309.
- Duncan, R. e Hershey, J.W.B. (1984) Heat shock-induced translational alterations in HeLa cells. Initiation factor modifications and the inhibition of translation. J. Biol. Chem. 259:11882-11889.

- Duncan, R. e McConkey, E.H. (1982) Rapid alterations in initiation rate and recruitment of inactive RNA are temporally correlated with S6 phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 123:539-544.
- Eipper, B.A. (1972) Rat brain microtubule protein: Purification and determination of covalently bound phosphate and carbohydrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:2283-2287.
- Erickson, E. e Maller, J.L. (1986) Purification and characterization of a protein kinase from Xenopus eggs highly specific for ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 261:350-355.
- Farmer, S.R. (1986) Actin. A regulator of cell growth and differentiation. In: *Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton*. J.W. Shay (ed.), Plenum Press, New York, pp. 131-149.
- Freer, S.N. e Van Etten, J.L. (1978) Changes in messenger RNAs and protein synthesis during germination of Rhizopus stolonifer sporangiospores. *Exp. Mycol.* 2:313-325.
- Fink, K. e Zeuthen, E. (1978) Heat shock proteins in Tetrahymena. *ICN-UCLA Sympos. Mol. Cell. Biol.* 12:103-115.
- Garrels, J. e Hunter, T. (1979) Post-translational modification of actins synthesized in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* 564:517-525.
- Gehring, W.J. (1985) The homeo box: A key to the understanding of development? *Cell* 40:3-5.
- Gehring, W.J. (1987) Homeo box in the study of development. *Science* 236:1245-1251.
- Gerner, E.W. e Schneider, M.J. (1975) Induced thermal resistance in Hela cells. *Nature* 256:500-502.
- Glover, C.V.C. (1982) Heat shock induces rapid dephosphorylation of a ribosomal protein in Drosophila. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:1781-1785.
- Golden, J.W., Robinson, S.J. e Haselkorn, R. (1985) Rearrangement of nitrogen fixation genes during heterocyst differentiation in the cyanobacterium Anabaena. *Nature* 314:419-423.
- Goldstein, A. e Cantino, E.C. (1962) Light-stimulated polysaccharide and protein synthesis by synchronized single generations of Blastocladiella emersonii. *J. Gen. Microbiol.* 28:689-699.

- Gomes, S.L., Juliani, M.H., Maia, J.C.C. e Rangel-Aldao, R. (1983) Autophosphorylation and rapid dephosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase from Blastocladiella emersonii zoospores. J. Biol. Chem. 258:6972-6978.
- Gomes, S.L., Juliani, M.H., Maia, J.C.C. e Silva, A.M. (1986) Heat shock protein synthesis during development in Caulobacter crescentus. J. Bacteriol. 168:923-930.
- Gomes, S.L., Mennuci, L. e 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., Mennuci, L. e Maia, J.C.C. (1980) Induction of Blastocladiella emersonii germination by cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. Cell Differ. 9:169-179.
- Gomes, S.L. e Shapiro, L. (1984) Differential expression and positioning of chemotaxis methylation proteins in Caulobacter. J. Mol. Biol. 178:551-568.
- Gong, C.S. e Lovett, J.S. (1977) Regulation of protein synthesis in Blastocladiella zoospores: factors for synthesis in nonsynthetic spores. Exp. Mycol. 1:138-151.
- Gordon, J., Nielsen, P.J., Manchester, K.L., Towbin, H., Jimenez de Asua, L. e Thomas, G. (1982) Criteria for establishment of the biological significance of ribosomal protein phosphorylation. In: Current Topics in Cellular regulation. B.L.Horecker e E.R. Stadtman (eds.), Acad. Press, New York, vol 21, pp. 89-99.
- Gottschalk, W.K. e Sonneborn, D.R. (1982) Phenotypic dissections of the Blastocladiella emersonii zoospore's developmental choice. Dev. Biol. 93:165-180.
- Green, L.L. e Dove, W.F. (1984) Tubulin proteins and RNA during the myxamoeba-flagellate transformation of Physarum polycephalum. Mol. Cell. Biol. 4:1706-1711.
- Gressner, A.M. e Wool, I.G. (1974) The phosphorylation of liver ribosomal proteins "in vivo" - Evidence that only a single small subunit protein (56) is phosphorylated. J. Biol. Chem. 249:6917-6925.
- Hahn, G.M. e Li, G.C. (1982) Thermotolerance and heat shock proteins in mammalian cells. Radiat. Res. 92:452-457.
- Hallberg, R.L., Wilson, P.G. e Sutton, C. (1981) Regulation of ribosome phosphorylation and antibiotic sensitivity in Tetrahymena thermophila: a correlation. Cell 26:47-56.

- Hall, B.G. (1983) Yeast thermotolerance does not require protein synthesis. *J. Bacteriol.* 156:1363-1365.
- Hardy, S.J.S., Kurland, C.G., Voynow, P. e Mora, G. (1969) The ribosomal proteins of Escherichia coli. I. Purification of the 30S ribosomal proteins. *Biochemistry* 8:2897-2905.
- Hohn, T.M., Lovett, J.S. e Bracker, C.E. (1984) Characterization of the major proteins in gamma particles, cytoplasmic organelles in Blastocladiella emersonii zoospores. *J. Bacteriol.* 158:253-263.
- Hood, L., Kronenberg, M. e Hunkapiller, T. (1985) T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. *Cell* 40:225-229.
- Hunt, C. e Morimoto, R.I. (1985) Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6455-6459.
- Hunter, K.W., Cook, C.L. e Hayunga, E.G. (1984) Leishmanial differentiation in vitro: induction of heat shock proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125:755-760.
- Hussey, P.J. e Gull, K. (1985) Multiple isotypes of α - and β -tubulin in the plant Phaseolus vulgaris. *FEBS Lett.* 181:113-118.
- Iida, H. e Yahara, I. (1984a) Durable synthesis of high molecular weight heat shock proteins in G_0 cells of the yeast and other eucaryotes. *J. Cell Biol.* 99:199-207.
- Iida, H. e Yahara, I. (1984b) A heat shock-resistant mutant of Saccharomyces cerevisiae shows constitutive synthesis of two heat shock proteins and altered growth. *J. Cell Biol.* 99:1441-1450.
- Ingolia, T.D. e Craig, E.A. (1982a) Four small Drosophila heat shock proteins are related to each other and to mammalian alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2360-2364.
- Ingolia, T.D. e Craig, E.A. (1982b) Drosophila gene related to the major heat shock-induced gene is transcribed at normal temperatures and not induced by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:525-529.
- Ingolia, T.D., Craig, E.A. e McCarthy, B.J. (1980) Sequence of three copies of gene for the major Drosophila heat shock induced protein and their flanking regions. *Cell* 21:669-679.

- Ingolia, T.D., Slater, M.R. e Craig, E.A. (1982) Saccharomyces cerevisiae contains a complex multigene family related to the major heat shock-inducible gene of Drosophila. Mol. Cell. Biol. 2:1388-1398.
- Jackson, R.J. e Hunt, T. (1983) Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysates for translation of eukaryotic messenger RNA. Meth. Enzym. 96:51-74.
- Jantzen, H. (1981) Control of actin synthesis during development of Acanthamoeba castellanii. Dev. Biol. 82:113-126.
- Jaworski, A.J. (1976) Synthesis of polyadenylic acid RNA during zoospore differentiation and germination in Blastocladiella emersonii. Arch. Biochem. Biophys. 173:201-209.
- Jaworski, A.J. e Stumhofer, P. (1981) Stage specific synthesis of proteins complexed to ribonucleoprotein particles and ribosomes in zoospores of Blastocladiella emersonii. Mol. Cell. Biol. 1:310-320.
- Jaworski, A.J. e Stumhofer, P. (1983) Inhibition of in vitro protein synthesis by subribosomal particles isolated from Blastocladiella emersonii zoospores. Exp. Mycol. 7:47-56.
- Jaworski, A.J. e Stumhofer, P. (1984) Dormant ribosomes in Blastocladiella emersonii zoospores are arrested at elongation. Exp. Mycol. 8:13-24.
- Jaworski, A.J. e Thomson, K. (1980) A temporal analysis of synthesis of mRNA sequestered in zoospores of Blastocladiella emersonii. Dev. Biol. 75:343-357.
- Jaworski, A.J., Wu, W.B.L., Bateman, D.M. (1976) Metabolism of polyadenylic acid sequences during germination of Blastocladiella emersonii zoospores. Arch. Biochem. Biophys. 177:516-524.
- Johnson, S. e Lovett, J.S. (1984a) Base sequence complexity of the polyadenylated and nonpolyadenylated stored RNA in Blastocladiella zoospores. Exp. Mycol. 8:117-131.
- Johnson, S. e Lovett, J.S. (1984b) Gene expression during development of Blastocladiella emersonii. Exp. Mycol. 8:132-145.
- Johnson, S.A., Lovett, J.S. e Wilt, F.W. (1977) The polyadenylated RNA of zoospores and growth phase cells of the aquatic fungus, Blastocladiella. Dev. Biol. 56:329-342.

- Juliani, M.H., Brochetto, M.R. e Maia, J.C.C. (1979) Changes in cyclic AMP binding and protein kinase activities during growth and differentiation of Blastocladiella emersonii. Cell Differ. 8:421-430.
- Juliani, M.H., Maia, J.C.C. e Bonato, M.C.M. (1983) Increased phosphorylation of a ribosomal protein during aggregation of the slime mold Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 154:400-406.
- Kabat, D. (1970) Phosphorylation of ribosomal proteins in rabbit reticulocytes. Characterization and regulatory aspects. Biochemistry 9:4160-4175.
- Kelley, P.M. e Schlesinger, M.J. (1978) The effect of amino-acid analogues and heat shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. Cell 15:1277-1286.
- Kelley, P. e Schlesinger, M.J. (1982) Antibodies to two major chicken heat shock proteins cross-react with similar proteins in widely divergent species. Mol. Cell. Biol. 2:267-274.
- Kelly, L.J., Kelly, R. e Ennis, H.L. (1983) Characterization of cDNA clones specific for sequences developmentally regulated during Dictyostelium discoideum spore germination. Mol. Cell. Biol. 3:1943-1948.
- Kelly, R., Kelly, L.J. e Ennis, H.L. (1985) Dictyostelium discoideum mRNAs developmentally regulated during spore germination have short half-lives. Mol. Cell. Biol. 5:133-139.
- Kennedy, I.M., Burdon, R.H. e Leader, D.P. (1984) Heat shock causes diverse changes in the phosphorylation of ribosomal proteins of mammalian cells. FEBS Lett. 169:267-273.
- Kimmel, A.R. e Firtel, R.A. (1982) The organization and expression of the Dictyostelium genome. In: The Development of Dictyostelium discoideum. W.F. Loomis (ed.), Acad. Press, Inc., New York, pp. 233-324.
- Kindle, K. L. e Firtel, R.A. (1978) Identification and analysis of Dictyostelium actin genes, a family of moderately repeated genes. Cell 15:763-778.
- Kirk, M.M. e Kirk, D.L. (1985) Translational regulation of protein synthesis, in response to light, at a critical stage of Volvox development. Cell 41:419-428.

- Klar, A.J.S., Strathern, J.N. e Hicks, J.B. (1984) Developmental pathways in yeast. In: Microbial Development. R. Losick e L. Shapiro (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York pp. 151-195.
- Klemenzen, R., Hultmark, D. e Gehring, W.J. (1985) Selective translation of heat shock mRNA in Drosophila melanogaster depends on sequence information in the leader. EMBO J. 4:2053-2060.
- Komeda, Y. (1982) Fusions of flagellar operons to lactose genes on a Mu lac bacteriophage. J.Bacteriol. 150:16-26.
- Kopachik, W., Bergen, L.G. e Barclay, S.L. (1985) Genes selectively expressed in proliferating Dictyostelium amoebae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8540-8544.
- Kowit, J.D. e Fulton, C. (1974) Purification and properties of flagellar outer doublet tubulin from Naegleria gruberi and a radioimmune assay for tubulin. J. Biol. Chem. 249:3638-3646.
- Krüger, C. e Benecke, B.J. (1981) In vitro translation os Drosophila heat shock and non-heat shock mRNA's in heterologous and homologous cell-free systems. Cell 23:595-604.
- Kruppa, J. e Clemens, M.J. (1984) Differential kinetics of changes in the state of phosphorylation of ribosomal protein S6 and in the rate of protein synthesis in MPC11 cells during tonicity shifts. EMBO J. 3:95-100.
- Kurtz, S. e Lindquist, S. (1984) Changing patterns of gene expression during sporulation in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:7323-7327.
- Kurtz, S., Rossi, J., Petko, L. e Lindquist, S. (1986) An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. Science 231:1154-1157.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature 227:680-685.
- Lambowitz, A.M., Kobayashi, G.S., Painter, A. e Medoff, G. (1983) Possible relationship of morphogenesis in pathogenic fungus, Histoplasma capsulatum, to heat shock response. Nature 303:806-808.
- Larsen, A. e Sypherd, P.S. (1980) Physiological control of phosphorylation of ribosomal protein S6 in Mucor racemosus. J. Bacteriol. 141:20-25.

- Lastick, S.M. e McConkey, E.H. (1976) Exchange and stability of HeLa ribosomal proteins "in vivo". J. Biol. Chem. 251:2867-2875.
- Lawrence, F. e Robert-Gero, M. (1985) Induction of heat shock and stress proteins in promastigotes of three Leishmania species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:4414-4417.
- Leader, D.P. (1980) The control of phosphorylation of ribosomal proteins. In: Molecular Aspects of Cellular Regulation. P. Cohen (ed.), Elsevier Biochemical, Amsterdam, vol 1, pp. 203-234.
- Leaver, C.J. e Lovett, J.S. (1974) An analysis of protein and RNA synthesis during encystment and outgrowth (germination) of Blastocystis zoospores. Cell Differ. 3:165-192.
- Leff, S.E., Rosenfeld, M.G. e Evans, R.M. (1986) Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. Ann. Rev. Biochem. 55:1091-1117.
- Lemeaux, P.G., Herendeen, S.L., Bloch, P.L. e Neidhart, F.C. (1978) Transient rates of synthesis of individual polypeptides in E.coli following temperature shifts. Cell 13:427-434.
- Lewis, M.J. e Pelham, H.R.B. (1985) Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions of the 70 kd heat shock protein. EMBO J. 4:3137-3143.
- L'Hernault, S.W. e Rosenbaum, J.L. (1985) Chlamydomonas α -tubulin is post-translationally modified by acetylation on the ϵ -amino-group of a lysine. Biochemistry 24:473-478.
- Li, G.C. (1983) Induction of thermotolerance and enhanced heat shock protein synthesis in Chinese hamster fibroblasts by sodium arsenite and by ethanol. J. Cell. Physiol. 115:116-122.
- Li, G.C. (1984) Elevated levels of 70,000 dalton heat shock protein in transiently thermotolerant Chinese hamster fibroblasts and their stable heat resistant variants. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 11:165-177.
- Li, G.C. e Laszlo, A. (1985) Thermotolerance in mammalian cells: A possible role for heat shock proteins. In: Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress. B.G. Atkinson e D.B. Walden (eds.), Acad. Press, Inc., Orlando, Florida, pp. 227-254.

- Li, G.C. e Werb, Z. (1982) Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:3219-3222.
- Lindquist, S. (1980) Translational efficiency of heat-induced messages in D. melanogaster cells. *J. Mol. Biol.* 137:151-158.
- Lindquist, S. (1981) Regulation of protein synthesis during heat shock. *Nature* 293:311-314.
- Lindquist, S. (1986) The heat-shock response. *Ann. Rev. Biochem.* 55:1151-1191.
- Lindquist, S. e DiDomenico, B. (1985) Coordinate and non-coordinate gene expression during heat shock: A model for regulation. In: *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress*. B.G. Atkinson e D.B. Walden (eds.), Acad. Press, Inc., Orlando, Florida, pp. 71-90.
- Linz, J.E. e Orlowski, M. (1982) Stored mRNA in sporangiospores of the fungus Mucor racemosus. *J. Bacteriol.* 150:1138-1144.
- Linz, J.E. e Orlowski, M. (1987) Regulation of gene expression during aerobic germination of Mucor racemosus sporangiospores. *J. Gen. Microbiol.* 133:141-147.
- Loeb, J.E. e Blat, C. (1970) Phosphorylation of some rat liver ribosomal proteins and its activation by cyclic AMP. *FEBS Lett.* 10:105-108.
- Lodi, W.R. e Sonneborn, D.R. (1974) Protein degradation and protease activity during the life cycle of Blastocladiella emersonii. *J. Bacteriol.* 117:1035-1042.
- Loomis, W.F. e Wheeler, S.A. (1980) The heat shock response of Dictyostelium. *Dev. Biol.* 79:399-408.
- Loomis, W.F. e Wheeler, S.A. (1982) Chromatin associated heat shock proteins of Dictyostelium. *Dev. Biol.* 90:412-418.
- Losick, R. e Youngman, P. (1984) Endospore formation in Bacillus. In: *Microbial Development*. R. Losick e L. Shapiro (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 63-88.
- Lovett, J.S. (1968) Reactivation of ribonucleic acid and protein synthesis during germination of Blastocladiella zoospores and the role of 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. 34:345-404.
- Lovett, J.S. (1983) Macromolecular synthesis in Blastocladiella. In: Fungal differentiation. A contemporary synthesis. J.E. Smith (ed.) Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 211-234.
- Lowe, D.G. e Moran, L.R. (1984) Proteins related to the mouse L-cell major heat shock protein and synthesized in the absence of heat shock gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2317-2321.
- Lowry, D.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. e Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275.
- Maia, J.C.C. e Camargo, E.P. (1974) cAMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in Blastocladiella emersonii. Cell Differ. 3:147-155.
- Maia, J.C.C., Gomes, S.L. e Juliani, M.H. (1984) Preparation of (γ - 32 P) and (α - 32 P)- nucleoside triphosphates with high specific activity. In: Genes and antigens of parasites. A laboratory manual. C.M. Morel (ed.) Fundação Oswaldo Cruz, R.J. pp. 139-149.
- Maller, J.L., Foulkes, J.G., Erickson, E. e Baltimore, D. (1985) Phosphorylation of ribosomal protein S6 on serine after microinjection of Abelson murine leukemia virus tyrosine-specific protein kinase into Xenopus oocytes. Proc. Natl. Sci. USA 82:272-276.
- Mangiarotti, G., Lefebvre, P. e Lodish, H.F. (1982) Differences in the stability of developmentally regulated mRNAs in aggregated and disaggregated Dictyostelium discoideum cells. Dev. Biol. 89:82-91.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. e Sambrook, J. (1982) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Margolskee, J.P. e Lodish, H.F. (1980) The regulation of synthesis of actin and two other proteins induced early in Dictyostelium discoideum development. Dev. Biol. 74:50-64.
- Mason, P.J., Hall, L.M.C. e Gausz, J. (1984) The expression of heat shock genes during normal development in Drosophila melanogaster. Mol. Gen. Genet. 194:73-78.

- McAlister, L. e Finkelstein, D.B. (1980a) Heat shock proteins and thermal resistance in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 93:819-824.
- McAlister, L. e Finkelstein, D.B. (1980b) Alterations in translatable ribonucleic acid after heat shock of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 143:603-612.
- McAlister, L., Strausberg, A., Kulaga, A. e Finkelstein, D.B. (1979) Altered patterns of synthesis induced by heat shock in yeast. *Curr. Genet.* 1:63-74.
- McGarry, T.J. e Lindquist, S. (1985) The preferential translation of *Drosophila* hsp70 mRNA requires sequences in untranslated leader. *Cell* 42:903-911.
- McKeithan, T.W., Lefebvre, P.A., Silflow, C.D. e Rosenbaum, J.L. (1983) Multiple forms of tubulin in *Polytomella* and *Chlamydomonas*: evidence for a precursor of flagellar α -tubulin. *J. Cell Biol.* 96:1056-1063.
- Morejohn, L.C. e Fosket, D.E. (1986) Tubulins from plants, fungi and protists. A review. In: *Cell and Molecular Biology of the Cytoskeleton*. J.W. Shay (ed.) Plenum Press, New York, pp. 257-329.
- Morimoto, R. e Fodor, E. (1984) Cell-specific expression of heat shock proteins in chicken reticulocytes and lymphocytes. *J. Cell Biol.* 99:1316-1323.
- Morrissey, J.H. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal. Biochem.* 117:307-310.
- Munro, S. e Pelham, H. (1985) What turns on heat shock genes? *Nature* 317:477-478.
- Murphy, M.N. e Lovett, J.S. (1966) RNA and protein synthesis during zoospore differentiation in synchronized cultures of *Blastocladiella*. *Dev. Biol.* 14:68-95.
- Nakane, P.K. e Kawaoi, A. (1974) Peroxidase labelled antibody: a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22:1084-1091.
- Neidhardt, F.C., VanBogelen, R.A. e Vaughn V. (1984) The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* 18:295-329.
- Nelson, D.R. e Zusman, D.R. (1983) Evidence for long-lived mRNA during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:1467-1471.

- Ng, R. e Abelson, J. (1980) Isolation and sequence of the gene for actin in Saccharomyces cerevisiae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:3912-3916.
- Nover, L. e Scharf, K.D. (1984) Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cells cultures. Eur. J. Biochem. 139:303-313.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250:4007-4021.
- O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M. e O'Farrell, P.H. (1977) High resolution two-dimensional electrophoresis of basic as well as acidic proteins. Cell 12:1133-1142.
- Olsen, A.S., Triemer, D.F. e Sanders, M.M. (1983) Dephosphorylation of S6 and expression of heat shock response in Drosophila melanogaster. Mol. Cell. Biol. 3:2017-2027.
- O'Malley, K. Mauron, A., Barchas, J.D. e Kedes, L. (1985) Constitutively expressed rat mRNA encoding a 70-kilodalton heat-shock-like protein. Mol. Cell. Biol. 5:3476-3483.
- Palatnik, C.M., Wilkins, C. e Jacobson, A. (1984) Translational control during early Dictyostelium development: possible involvement of poly(A) sequences. Cell 36:1017-1025.
- Parker, C.S. e Topol, J. (1984) A Drosophila RNA polymerase II transcription factor binds to the regulatory site of an hsp70 gene. Cell 37:273-283.
- Pelham, H.R.B. (1982) A regulatory upstream promoter element in the Drosophila HSP70 heat shock gene. Cell 30:517-528.
- Pelham, H.R.B. (1984) HSP70 accelerates the recovery of nucleolar morphology after heat shock. EMBO J. 3:3095-3100.
- Pelham, H.R.B. (1985) Activation of heat-shock genes in eukaryotes. Trends Gen. 1:31-35.
- Pelham, H.R.B. e Jackson, R.J. (1976) An efficient mRNA-dependent translational system from reticulocyte lysates. Eur. J. Biochem. 67:247-256.
- Petko, L. e Lindquist, S. (1986) Hsp26 is not required for growth at high temperatures, nor for thermotolerance spore development, or germination. Cell 45:885-894.

- Phillips, T.A., VanBogelen, R.A. e Neidhardt, F.C. (1984) The lon (capR) gene product of Escherichia coli is a heat-shock protein. J. Bacteriol. 159:283-287.
- Plesofski-Vig, N. e Brambl, R. (1985) Heat shock response of Neurospora crassa: protein synthesis and induced thermotolerance. J. Bacteriol. 162:1083-1091.
- Plesset, J., Palm, C. e McLaughlin, C.S. (1982) Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in Saccharomyces cerevisiae. Biochem. Biophys. Res. Commun. 108:1340-1345.
- Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila. Experientia 18:571-573.
- Rosenthal, E.T., Hunt, T. e Ruderman, J.V. (1980) Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, Spisula solidissima. Cell 20:487-494.
- Rosenthal, E.T., Brandhorst, B.P. e Ruderman, J.V. (1982) Translationally mediated changes in patterns of protein synthesis during maturation of starfish oocytes. Dev. Biol. 91:215-220.
- Rubenstein, P. e Deuchler, J. (1979) Acetylated and nonacetylated actins in Dictyostelium. J. Biol. Chem. 254:11142-11147.
- Russell, D.G., Miller, D. e Gull, K. (1984) Tubulin heterogeneity in the trypanosome Crithidia fasciculata. Mol. Cell. Biol. 4:779-790.
- Russnak, R.H., Jones, D. e Candido, E.P.M. (1983) Cloning and analysis of cDNA sequences coding for two 16 kilodalton heat shock proteins (hsps) in Caenorhabditis elegans: homology with the small hsps of Drosophila. Nucleic Acids Res. 11:3187-3205.
- Sanders, M.M., Triemer, D.F. e Olsen, A.S. (1986) Regulation of protein synthesis in heat-shocked Drosophila cells. J. Biol. Chem. 261:2189-2196.
- Sasse, R., Glyn, M.C.P., Birkett, C.R. e Gull, K. (1987) Acetylated α -tubulin in Physarum: immunological characterization of the isotype and its usage in particular microtubular organelles. J. Cell Biol. 104:41-49.
- Scharf, K.D. e Nover, L. (1982) Heat shock-induced alterations of ribosomal protein phosphorylation in plant cell cultures. Cell 30:427-437.

- Scheller, R.H., McAllister, L.B., Crain, Jr., W.R., Durica D.S., Posakony, J.W., Thomas, T.L., Britten R.J. e Davison, E.H. (1981) Organization and expression of multiple actin genes in the sea urchin. *Mol. Cell. Biol.* 1:609-628.
- Schlesinger, M.J. (1986) Heat shock proteins: the search for functions. *J. Cell Biol.* 103:321-325.
- Schlesinger, M.J., Aliperti, G. e Kelley, P.M. (1982) The response of cells to heat shock. *Trends Biochem. Sci.* 7:222-225.
- Schlesinger, M.J., Ashburner, M. e Tissières, A. (1982) Heat shock from bacteria to man. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.
- Schmoyer, I.R. e Lovett, J.S. (1969) Regulation of protein synthesis in zoospores of Blastocladiella. *J. Bacteriol.* 100:854-864.
- Scott, M.P. e Pardue, M.L. (1981) Translational control in lysates of Drosophila melanogaster cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:3353-3357.
- Selitre, C.P. e Sonneborn, D.R. (1977) Alkaline phosphatase of Blastocladiella emersonii: partial purification and characterization. *J. Bacteriol.* 130:249-256.
- Sheir-Neiss, G., Lai, M.H. e Morris, N.R. (1978) Identification of a gene β -tubulin in Aspergillus nidulans. *Cell* 15:639-647.
- Silva, A.M., Maia, J.C.C. e Juliani, M.H. (1986) Developmental changes in translatable RNA species and protein synthesis during sporulation in the aquatic fungus Blastocladiella emersonii. *Cell Differ.* 18:263-274.
- Silva, A.M., Maia, J.C.C. e Juliani, M.H. (1987a) Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in Blastocladiella emersonii. *J. Bacteriol.* 169:2069- 2078.
- Silva, A.M., Juliani, M.H., Costa, J.J. e Bonato, M.C.M. (1987b) Acquisition of thermotolerance during development of Blastocladiella emersonii. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144:491-498.

- Silva, A.M., Juliani, M.H. e Bonato, M.C.M. (1987c) Effect of heat shock on S6 phosphorylation during the development of Blastocladiella emersonii. Mol. Cell. Biochem. no prelo.
- Silverman, P.M. (1976) Regulation of guanylate cyclase during cytodifferentiation of Blastocladiella emersonii. Biochem. Biophys. Res. Commun. 70:381-388.
- Silverman, P.M., Huh, M.M.-O. e Sun, L. (1974) Protein synthesis during zoospore germination in the aquatic phycomycete Blastocladiella emersonii. Dev. Biol. 40:59-70.
- Smith, B.A. e Burke, D.D. (1979) Evidence for the presence of messenger ribonucleic acid in Allomyces macrogynus mitospores. J. Bacteriol. 138:535-541.
- Soll, D.R. e Sonneborn, D.R. (1971a) Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. III. Structural change in relation to protein and RNA synthesis. J. Cell Sci. 9:679-699.
- Soll, D.R. e Sonneborn, D.R. (1971b) Zoospore germination in Blastocladiella emersonii: cell differentiation without protein synthesis? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:459-463.
- Soll, D.R. e Sonneborn, D.R. (1972) Zoospore germination in Blastocladiella emersonii. IV. Ion control over cell differentiation. J. Cell Sci. 10:315-333.
- Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Stadler, J., Gerisch, G., Bauer, G. e Deppert, W. (1985) In vivo acylation of Dictyostelium actin with palmitic acid. EMBO J. 4:1153-1156.
- Storti, R.V., Scott, M.P., Rich, A. e Pardue, M.L. (1980) Translational control of protein synthesis in response to heat shock in D. melanogaster cells. Cell 22:825-834.
- Suprenant, K., Hays, E., LeCluyse, E. e Dentler, W.L. (1985) Multiple forms of tubulin in the cilia and cytoplasm of Tetrahymena termophila. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6908-6912.
- Takahashi, Y. e Ogata, K. (1981) Ribosomal proteins cross-linked to natural mRNA by UV irradiation of rat liver polysomes. J. Biochem. 90:1549-1552.

- Terao, K. e Ogata, K. (1979) Proteins of small subunits of rat liver ribosomes that interact with poly (U). I. Effects of preincubation of poly (U) with 40S subunits on the interactions of 40S subunit proteins with aurintricarboxylic acid and with N,N'-p-phenylene-dimaleimide. *J. Biochem.* 86:597-603.
- Thomas, G., Martin-Perez, J. Siegmann, M. e Otto, A.M. (1982) The effect of serum, EGF, PGF₂ α and insulin on S6 phosphorylation and the initiation of protein and DNA synthesis. *Cell* 30:235-242.
- Tissieres, A., Mitchell, H.K. e Tracy, U.M. (1974) Protein synthesis in salivary glands of Drosophila melanogaster: Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* 84:389-398.
- Todd, J.A., Hubbard, T.J.P., Tavares, A.A. e Ellar, D.J. (1985) Heat shock proteins during growth and sporulation of Bacillus subtilis. *FEBS Lett.* 188:209-214.
- Topol, J., Ruden, D.M. e Parker, C.S. (1985) Sequences required for in vitro transcriptional activation of a Drosophila hsp70 gene. *Cell* 42:527-537.
- Towbin, H., Staehelin, T. e Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4350-4354.
- Traugh, J.A. (1981) Regulation of protein synthesis by phosphorylation. In: *Biochemical Actions of Hormones*. G. Litwack (ed.), Acad. Press, Inc., New York, vol 8, pp. 167-208.
- Traugh, J.A. e Pendergast, A.M. (1986) Regulation of protein synthesis by phosphorylation of ribosomal protein S6 and Aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Nucleic Acid Res.* 33:195-230.
- Trevillyan, J.M., Perisic, D., Traugh, J.A. e Byus, C.V. (1985) Insulin- and phorbol ester-stimulated phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* 260:3041-3044.
- Vale, M.R. e Maia, J.C.C. (1976) Changes in cGMP phosphodiesterase levels during growth and differentiation in Blastocladiella emersonii. *FEBS Lett.* 70:205-208.
- Van der Ploeg, L.H.T., Giannini, S.H. e Cantor, C.R. (1985) Heat shock genes: regulatory role for differentiation in parasitic protozoa. *Science* 228:1443-1446.

- Velazquez, J.M. e Lindquist, S. (1984) Hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 36:655-662.
- Voellmy, R., Brombley, P. e Kocher, H.P. (1983) Structural similarities between corresponding heat-shock proteins from different eucaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 258:3516-3522.
- Volloch, V. e Housman, D. (1981) Stability of globin mRNA in terminally differentiating murine erythroleukemia cells. *Cell* 23:509-514.
- Wadsworth, S.C. (1982) A family of related proteins is encoded by the major Drosophila heat shock gene family. *Mol. Cell. Biol.* 2:286-292.
- Weir-Thompson, E.M. e Dawes, I.W. (1984) Developmental changes in translatable RNA species associated with meiosis and spore formation in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* 4:695-702.
- Welch, W.J. e Feramisco, J.R. (1984) Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259:4501-4513.
- Welch, W.J. e Feramisco, J.R. (1985) Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 5:1229-1237.
- Welch, W.J. e Suhan, P. (1985) Morphological study of the mammalian stress response: characterization of changes in cytoplasmic organelles cytoskeleton, and nucleoli, and appearance of intranuclear actin filaments in rat fibroblasts after heat shock treatment. *J. Cell Biol.* 101:1198-1211.
- Wells, D.E., Showman, R.M., Klein, W.H. e Raff, R.A. (1981) Delayed recruitment of maternal histone H3 mRNA in sea urchin embryos. *Nature* 292:477-478.
- Wettenhall, R.E.H. e Morgan, F.J. (1984) Phosphorylation of hepatic ribosomal protein S6 on 80 and 40 S ribosomes. Primary structure of S6 in the region of the major phosphorylation sites for cAMP-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem.* 259:2084-2091.
- White, E., Tolbert, E.M. e Katz, E.R. (1983) Identification of tubulin in Dictyostelium discoideum: characterization of some unique properties. *J. Cell Biol.* 97:1011-1019.

- Widelitz, R.B., Magun, B.E. e Gerner, E.W. (1986) Effects of cycloheximide on thermotolerance expression, heat shock protein synthesis, and heat shock protein mRNA accumulation in rat fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 6:1088-1094.
- Winkler, M.M., Nelson, E.M., Lashbrook, C. e Hershey, J.W.B. (1985) Multiple levels of regulation of protein synthesis at fertilization in sea urchin eggs. *Dev. Biol.* 107:290-300.
- Wray, W., Boulukas, T., Wray, V.P. e Hancock, R. (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118:197-203.
- Wu, B.J., Kingston, R.E. e Morimoto, R.I. (1986) Human HSP70 promoter contains at least two distinct regulatory domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:629-633.
- Wu, B.J. e Morimoto, R.I. (1985) Transcription of the human hsp70 gene is induced by serum stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6070-6074.
- Wu, C. (1984) "TATA" and upstream regulatory sequences are protected from exonuclease III cleavage in chromatin. *Nature* 309:229-234.
- Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y. e Yura, I. (1978) Transient regulation of protein synthesis in Escherichia coli upon shift up of growth temperature. *J. Bacteriol.* 134:1133-1140.
- Yamamori, T. e Yura, I. (1982) Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:860-864.
- Zimmerman, C.R., Orr, W.C., Leclerc, R.F. Barnard, E.C. e Timberlake, W.E. (1980) Molecular cloning and selection of genes regulated in Aspergillus development. *Cell* 21:709-715.
- Zimmerman, J.C., Petri, W. e Meselson, M. (1983) Accumulation of a specific subset of Drosophila melanogaster heat shock mRNAs in normal development without heat shock. *Cell* 32:1161-1170.
- Zylicz, M., LeBowitz, J.H., McMacken, R. e Georgopoulos, C. (1983) The dnaK protein of Escherichia coli possesses an ATPase and autophosphorylation activity and is essential in an in vitro DNA replication system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:6431-6435.