UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização e expressão de dois genes codificando
ATPases do tipo P em *Blastocladiella emersonii***

Luciano Gomes Fietto
Tese de Doutorado

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Suely Lopes Gomes

**São Paulo
03/2001**

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**Caracterização e expressão de dois genes codificando
ATPases do tipo P em *Blastocladiella emersonii***

Luciano Gomes Fietto
Tese de Doutorado

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Suely Lopes Gomes

**São Paulo
03/2001**

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

F468c Fietto, Luciano Gomes
Caracterização e expressão de dois genes codificando
ATPases do tipo P em *Blastocladiella emersonii* / Luciano
Gomes Fietto. -- São Paulo, 2001.
104p.

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

1. Biologia molecular 2. Microbiologia I. T. II.
Gomes, Suely Lopes, orientador.

574.88 CDD

**“Caracterização e Expressão de Dois Genes
Codificando ATPases do Tipo P em
Blastocladiella emersonii”**

LUCIANO GOMES FIETTO

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

Aprovado por:

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

Prof. Dr. SERGIO VERJOVSKI DE ALMEIDA
IQ - USP

Profa. Dra. MARI CLEIDE SOGAYAR
IQ - USP

Prof. Dr. WILSON ROBERTO NAVEGA LODI
FM - RP - USP

Prof. Dr. JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA FILHO
Unifesp

SÃO PAULO
23 DE MARÇO 2001.

AGRADECIMENTOS

À Suely Lopes Gomes pela orientação e exemplo de dedicação ao trabalho.

Aos professores do Departamento de Bioquímica que contribuíram para minha formação. Em especial à professora Maria Júlia Manso Alves pela ajuda na produção e análise dos anticorpos.

Ao apoio financeiro das agências FAPESP e CNPq.

À FAPESP pela bolsa concedida durante a realização deste trabalho.

Ao Professor Sérgio Verjovski-Almeida e ao Eduardo pela contribuição no meu aprendizado com as ATPases.

À Fabiana, Juliana e Flávio por dividirem o nosso Dia a Dia.

Aos grandes amigos Alexandre e Márcia pelo convívio de família e é claro pela cerveja ($\pm$ gelada) dos finais de semana.

Aos companheiros da Pós: Luís, Leo, Alexandre, Alcides e Ricardo por compartilharem dos mesmos ideais.

Ao Deodoro pela amizade e pelos papos cabeça.

À Denise porque se não ela vai reclamar até as próximas gerações, mas também porque ela merece.

Ao Antônio por tornar o ambiente do laboratório mais divertido.

À Rita e ao Tatá pela amizade, convívio e cumplicidade.

À Luciana Pugliese pela amizade, ajuda com os RNAs e pelas discussões sobre o nosso modelo *Blastocladiella*.

Aos amigos do laboratório que apesar de não trabalharmos mais juntos estamos sempre em contato: Marcelo, Cíntia, Rosane Regina, Lucivanda, Adriana, Ana, Marílis, Dênis.....

À Sandra e Neusa pela amizade e competência no trabalho

Aos amigos recentes: Terumi, Cris, Beto, Michele, Tie, Karina e Ariel que apesar do pouco tempo tenho certeza que torceram por mim nesta etapa final.

Aos Professores Rogério e Ieso da Universidade Federal de Ouro Preto pelo estímulo.

Aos Amigos Nelson e Rodrigo que fizeram parte de toda minha formação moral.

À Annamélia por me dar de presente uma nova família: Tatiana, Gabriela, Alessandra, Nello, Bruno e Bernardo.

Aos meus irmãos: Deo, Tininha e Taquinho pela infância que deixou saudade e pela amizade e reconhecimento.

Às crianças que sempre me ensinaram a naturalidade da vida: Larissa, Taiana, Vinícios, Lia, Luizinho, Gabriel, Fernandinho, Leleo e Mariana.

Ao Matheus pelo prazer que é amá-lo.

À Juliana por estar comigo.

Aos meus Pais: Ildeu e Darcy por serem PAIS de verdade e me ensinarem o verdadeiro valor do trabalho e da vida.

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

ABREVIATURAS

ATP:Adenosina trifosfato

ATPase:Adenosina trifosfatase

BSA:Albumina acetilada de soro bovino

cAMP:Adenosina monofosfato cíclico

cpm:Contagens por minuto

C₁₂E₈: polietileno 8 lauril éter – detergente não iônico (C₂₈H₅₈O₉)

dATP, dCTP, dGTP e dTTP: 2'-desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfato de adenosina, citidina, guanidina e timidina, respectivamente.

DEPC:Dietilpirocarbonato

DNA:Ácido desoxiribonucléico

DO:Densidade óptica

DTT:Ditiotreitol

EDTA:Ácido etilenodiaminotetracético

g:aceleração da gravidade

IPTG: Isopropil β-D-galactopiranosídeo

kb:Quilobases

kDa:Quilodáltons

min:minutos

ml:mililitro

MOPS:Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

mRNA:Ácido ribonucléico mensageiro

PAGE:polyacrylamide gel electrophoresis

pb:Pares de bases

PCR:Reação de polimerase em cadeia

PEG:Polietilenoglicol

PMSF:Fluoreto de fenilmetilsulfonila

RNA:Ácido ribonucléico

RNase:Ribonuclease

RNAsin:Inibidor de RNase

rpm:Rotações por minuto

SDS:Dodecil sulfato de sódio

TAE:Tris Acetato EDTA

TBE:Tris Borato EDTA

TCA:Ácido tricloro acético

Tris:Tris-(hidroxometil)-aminometano

x:Vezes concentrado

X-gal:5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D-galactosídeo

RESUMO

ATPases do tipo P são proteínas integrais de membrana que usam a energia química contida na molécula de ATP para o transporte de cátions através de membranas. O nosso trabalho apresenta a clonagem e o sequenciamento de um gene (BePAT2) e a caracterização da expressão de dois genes (BePAT1 e BePAT2) codificando isoformas de uma ATPase do tipo P no fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. As proteínas codificadas por estes genes, surpreendentemente se mostraram mais similares às Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases de eucariotos superiores do que a outras ATPases de fungos. Experimentos de “Northern blot”, imunoprecipitação e “Western blot” demonstraram que as ATPases (BePAT1 e BePAT2) são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento de *B. emersonii*. Os resultados obtidos mostraram que o aumento da transcrição dos genes refletiu em um aumento da síntese e do acúmulo das ATPases, sugerindo um controle pré-traducional da expressão de BePAT1/2. Estudos de formação de fosfoenzima na presença de diferentes íons e inibidores, utilizando as enzimas imunopurificadas, sugerem que as proteínas codificadas por estes genes tenham uma atividade semelhante às Na^+/K^+ -ATPases. Os nossos resultados de expressão e atividade mostram pela primeira vez, evidências da funcionalidade de genes codificando uma proteína similar às Na^+/K^+ -ATPases em um eucarioto inferior.

SUMMARY

P- type ATPases are integral membrane proteins which use the energy stored in the ATP molecule to drive the transport of cations through biological membranes. In this work we report the cloning and sequencing of the BePAT2 gene and the characterization and expression of two genes (BePAT1 and BePAT2) encoding isoforms of a P-Type ATPase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. Surprisingly the putative BePAT1 and BePAT2 proteins are more similar to Na⁺/K⁺- and H⁺/K⁺-ATPases from animal cells than to other P-type ATPases from fungi. Northern blot, immunoprecipitation and Western blot experiments demonstrated that these ATPases (BePAT1 and BePAT2) are developmentally regulated in *B. emersonii*. The results showed that the increase in the BePAT1/2 transcription reflects in an increase in the synthesis and accumulation of the proteins, suggesting a transcriptional control of the BePAT1/2 expression. Studies of phosphoenzyme formation using the immunopurified enzymes in the presence of different ions and inhibitors suggested a Na/K-ATPase like activity. Our results demonstrate for the first time biochemical evidences of functionality of genes encoding a Na⁺/K⁺-ATPase like protein in an eucaryotic microorganism.

ÍNDICE

ITEM	PÁGINAS
Abreviaturas	I
Resumo	III
Summary	IV
Introdução	1
1 <i>Blastocladiella emersonii</i>	1
2 ATPases tipo P	4
2.1 propriedades gerais	5
2.1.1 Subfamília I	7
2.1.2 Subfamília II	9
2.1.3 Subfamília III	11
2.1.4 Subfamília IV	12
2.1.5 Subfamília V	12
3 ATPase tipo P em <i>B. emersonii</i>	13
Objetivos	15
Materiais e Métodos	16
1 Reagentes	16
2 Enzimas	16
3 Material radioativo	16
4 Oligonucleotídeos	16
5 Linhagens de <i>E. coli</i>	17
6 Manutenção das culturas de <i>B. emersonii</i>	17
7 Extração de DNA total de <i>B. emersonii</i>	18
8 Extração de RNA total de <i>B. emersonii</i>	19
9 Preparação de extrato de proteína	20
10 Preparação de frações particuladas de zoósporos	20

11 Marcação de proteínas com [^{35}S] metionina	21
12 Imunoprecipitação	21
13 Preparação de DNA plasmidial	22
14 Reações de digestão de DNA	22
15 Purificação de fragmentos a partir de gel de agarose	23
16 Ligação de fragmentos de DNA a plasmídeos	23
17 Obtenção de células competentes para transformação	23
17.1 Método do cloreto de Cálcio	23
17.2 Preparação de células para eletroporação	24
18 Experimentos de transformação	24
18.1 eletroporação	25
19 Marcação de sondas radioativas	25
20 "Southern blot"	26
21 "Northern blot"	26
22 Expressão de proteína recombinante	27
23 Produção de anticorpos policlonais	28
24 "Western blot"	29
25 Microscopia de imunofluorescência confocal	30
26 Reação da polimerase em cadeia (PCR)	31
27 Construção de um banco genômico parcial	32
28 Hibridação de colônias em membranas de nitocelulose	32
29 Varredura da biblioteca de cDNA	32

29.1 Plaqueamento dos clones positivos	32
29.2 Extração de DNA de fago	33
30 Preparo de DNA fita simples para sequenciamento	33
31 Reação de sequenciamento com a enzima sequenase	34
32 Sequenciamento de DNA dupla fita por PCR	34
33 Eletroforese em gel de poliacrilamida uréia para sequenciamento	35
34 Reações de sequenciamento automático de DNA	35
35 Gradiente de sacarose	35
36 Preparação de Carvão ativado	36
37 Medida de atividade ATPásica	36
38 Linhagens de levedura	36
39 Transformação de leveduras	37
39.1 Transformação da cepa SY4	37
40 Preparação de extrato de proteínas de levedura	38
41 Purificação por imunoafinidade e fosforilação das ATPases	38
41.1 Purificação por imunoafinidade	38
41.2 reação de fosforilação	39
41.3 Fosforilação de extratos totais	39
42 Medida da atividade ATPásica pelo método colorimétrico	40
43 Purificação das ATPases em coluna de troca iônica	40
44 Métodos computacionais	41

Resultados e discussão	42
1 Clonagem do gene BePAT2	42
2 Mapa de restrição e sequenciamento do clone genômico <i>HindIII/SacI</i>	45
3 Análise da sequencia do gene BePAT2	45
4 Análises evolutivas e de comparação	48
5 Caracterização do padrão de expressão de BePAT1/2 durante o desenvolvimento de <i>B. emersonii</i>	61
5.1 Experimentos de "Northern blot"	61
5.2 Obtenção de um anti soro policlonal	65
5.3 Síntese e acúmulo das proteínas BePAT1/2	67
6 Imunolocalização	70
7 Expressão diferencial dos genes BePAT1 e BePAT2 durante a esporulação de <i>B. emersonii</i>	70
8 Expressão heteróloga da proteína BePAT1 em <i>S. cerevisiae</i>	76
9 Caracterização da atividade das ATPases em gradiente de sacarose	77
10 Caracterização da atividade das ATPases solubilizadas em $C_{12}E_8$	85
11 Purificação e caracterização do intermediário fosforilado a partir das proteínas Imunopurificadas	91
Conclusões	93
Bibliografia	95
Curriculum Vitae	104

I - INTRODUÇÃO

1 - O modelo de estudo *Blastocladiella emersonii*:

Blastocladiella emersonii é um fungo aquático não filamentoso que pertence à classe dos Quitridiomicetos. Estudos baseados na sequência do RNA ribossomal propuseram que *B. emersonii* está situado na base da árvore evolutiva dos fungos (Van der Auwera e De Wachter, 1996), o que o torna um bom modelo para estudos evolutivos. Além desta peculiaridade, *B. emersonii* possui também um desenvolvimento espetacular (figura 1), apropriado para o estudo da regulação gênica associada a processos de diferenciação celular. Uma das vantagens deste organismo é possuir um ciclo de vida curto (de aproximadamente 24 horas), onde se alternam um estágio vegetativo, imóvel e outro com esporos flagelados. A formação destes dois tipos celulares envolve dois processos de diferenciação celular: 1- a esporulação, quando a célula vegetativa origina um grande número de zoósporos e, 2- a germinação, quando cada zoósporo origina uma nova célula vegetativa (Lovet, 1975).

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

Quando o zoósporo encontra condições nutricionais adequadas inicia-se a fase de germinação. A célula retrai o flagelo, torna-se arredondada e começa a formar uma parede celular rica em quitina. A síntese da parede de quitina ocorre nos primeiros 20 minutos de germinação e independe de síntese de proteínas e RNA, o que mostra que este evento está sob regulação pós-traducional (Soll e Sonneborn, 1971). A formação de um tubo germinal primário, que dará origem a um sistema de rizóides, é o evento posterior à síntese da parede, sendo necessária nesta fase a síntese de proteínas, mas não de RNA. Nesta etapa a célula utiliza mRNAs que provavelmente são armazenados

no capacete nuclear dos zoósporos durante os últimos 30 minutos da esporulação (Jaworski e Stumhofer, 1984). A partir deste ponto todos os eventos que se sucedem necessitam tanto de tradução quanto de transcrição. Aproximadamente 2 horas após a indução da germinação ocorre a primeira divisão nuclear, sendo que, durante todo o crescimento vegetativo ocorrem inúmeras divisões nucleares sem que ocorra divisão celular, culminando com a formação de um coenócito. Além de meio nutriente foram identificados uma série de compostos indutores da germinação. Entre eles estão os cátions mono e divalentes, em especial KCl numa concentração de 50 mM (Gottschalk and Sonneborn, 1982), inibidores de fosfodiesterase de cAMP, tais como teofilina e cafeína (Gomes *et al.*, 1980), nucleotídeos cíclicos (Gomes *et al.*, 1980; Gottschalk and Sonneborn, 1982).

A qualquer momento do crescimento exponencial, se as células forem submetidas à carência nutricional inicia-se o processo de esporulação, que se caracteriza por intenso rearranjo de organelas levando à formação dos zoósporos. No decorrer deste processo podem ser observados fenótipos bem característicos: na primeira hora após o carenciamento observa-se a formação de um septo basal, que separa os rizóides do citoplasma. Uma hora após a formação do septo há o aparecimento de uma papila no ápice da célula vegetativa por onde os zoósporos serão liberados para o meio no final da esporulação (figura 1).

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

Figura 1 - Esquema do ciclo de vida de *B. emersonii*. Estão representados os dois processos de diferenciação celular: a germinação e a esporulação (ver detalhes no texto). Modificado de Lovet (1975).

Nos últimos anos, estudos de alguns genes isolados de *B. emersonii*, confirmaram a forte influência do desenvolvimento no padrão de expressão gênica deste organismo. Os genes que codificam para as subunidades catalítica e regulatória da proteína quinase dependente de cAMP (PKA), por exemplo, tem sua expressão aumentada durante a esporulação.

Experimentos de “Northern blot” demonstraram que estes genes possuem uma regulação coordenada ao longo do desenvolvimento do fungo (Marques e Gomes, 1992; de Oliveira *et al.*, 1994). Outro gene bem caracterizado é o que codifica a proteína de choque térmico Hsp70 (Stefani e Gomes, 1995), gene este que tem sua expressão controlada tanto por choque térmico como durante o desenvolvimento.

2 - ATPases tipo P:

Nos organismos vivos, a distribuição assimétrica de íons nos diferentes compartimentos celulares é de vital importância para a manutenção da homeostase. Esta distribuição assimétrica é possível graças a enzimas que são capazes de transformar a energia química contida na molécula de ATP em uma outra forma de energia como, por exemplo, o gradiente de cátions através das membranas. Este gradiente, por sua vez, cria um potencial eletroquímico que força o retorno do cátion em questão para o interior da célula, fornecendo energia para a realização de alguma forma de trabalho, como o transporte de nutrientes. Entre as enzimas que são capazes de acoplar a energia da molécula de ATP com alguma forma de trabalho, destacam-se as ATPases tipo P, que diferem das ATPases transportadoras existentes nos vacúolos (ATPases-V) e nas mitocôndrias (ATPases-F) por apresentarem um resíduo de aspartato que é fosforilado durante o processo de transporte (Pedersen e Carafoli, 1987).

Desde que Peter Mitchel formulou a teoria quimiosmótica (Mitchel, 1961), o papel das ATPases no acoplamento da energia com o transporte de nutrientes tem sido descrito em várias espécies de bactérias, fungos, animais e plantas, estando estas enzimas envolvidas no transporte de uma grande variedade de íons. Exemplos bem

estudados incluem a Na^+/K^+ -ATPase de membrana plasmática em eucariotos superiores, a Ca^{++} -ATPase de retículo sarcoplasmático e a H^+ -ATPase de fungos e plantas. As ATPases tipo P são definidas por três características básicas: (1) a unidade catalítica é um monômero que varia de 70 a 200 kDa. (2) são inibidas por vanadato na faixa de μM e (3) formam, como dito anteriormente, um intermediário acil-fosfato através da transferência do fosfato- γ do ATP para um resíduo de aspartato (Møller *et al.*, 1996).

Dentre os diversos tipos de íons transportados pelas ATPases tipo P, a extrusão de prótons é considerada como sendo o principal sistema de transporte eletrogênico em microrganismos e todos os fungos estudados até o momento possuem em sua membrana plasmática uma H^+ -ATPase, que produz um gradiente de prótons que é utilizado na importação de nutrientes, via simporte H^+ /nutrientes.

2.1 - Classificação e propriedades gerais das ATPases tipo P:

Análise das seqüências primárias das ATPases tipo P revelaram 5 seqüências curtas de aminoácidos altamente conservadas, situadas nas duas principais alças hidrofílicas destas proteínas (figura 2) (para revisão ver Møller *et al.*, 1996). Dentro destas seqüências está o motivo TGES localizado na alça hidrofílica menor, cuja função ainda não está bem definida, e quatro outros motivos localizados na alça hidrofílica maior, que compreende a região do resíduo de aspartato que é transitoriamente fosforilado durante o processo catalítico (DKTGTLT), e os domínios implicados na ligação do ATP (KGA, MV/LTGD; GDGVND).

Recentemente foi descrita a primeira estrutura de alta resolução (2,6 Å) de uma ATPase tipo P (Toyoshima *et al.*, 2000). A estrutura foi determinada por difração de raio-X de cristais da Ca^{++} -ATPase de retículo sarcoplasmático (SERCA-ATPase) obtidos na presença de cálcio. A estrutura proposta confirmou a presença de 10 α -hélices transmembranares conectadas a um grande domínio citoplasmático. Revelou ainda que o domínio citoplasmático pode ser dividido em três sub-domínios: 1 – o

domínio P que ocupa a região central do domínio citoplasmático e que contém o resíduo de aspartato que é fosforilado durante o processo catalítico. Este domínio é composto por duas regiões separadas na sequência primária da proteína que vai do resíduo N330 ao N359, região esta que está conectada à transmembrana 4, e a parte carboxila do domínio que vai do resíduo K605 ao D737 que está conectada à transmembrana 5. 2 - O domínio N que contém o sítio de ligação a ATP e está inserido entre as duas regiões da sequência primária que compõe o domínio P. 3 – O domínio A que está situado entre as transmembranas 2 e 3. Este domínio não possui uma função bem definida, embora existam evidências do seu envolvimento no acoplamento entre a hidrólise de ATP e o transporte de Ca^{++} (Clarke *et al.*, 1990).

Figura 2 - Esquema geral e motivos característicos das P2-ATPases representados no plano pelas sequências encontradas na proteína BePAT1 (de Souza e Gomes, 1998). Muitos dos motivos representados acima estão presentes em todas as subfamílias das ATPases tipo P (ver texto). Os números de 1 a 10 indicam as 10 hélices transmembranares preditas para algumas ATPases tipo P como a Na^+/K^+ ATPase e outras. A letra P indica a posição do resíduo de aspartato fosforilado durante o processo catalítico. As letras A e C representam as alças hidrofílicas menor e maior respectivamente. O esquema foi adaptado de Møller e colaboradores (1996).

Outro avanço importante obtido com a cristalização da cálcio-ATPase foi o mapeamento dos resíduos implicados na coordenação dos íons cálcio. A cristalografia confirmou vários dados bioquímicos (Clarke *et al.*, 1989) de que as regiões transmembranas 4, 5, 6 e 8 fazem parte dos dois sítios de ligação a cálcio, sendo que os resíduos N768, E771, T799, D800 coordenam a ligação do íon no sítio I e os resíduos E309, N796 e D800 atuam no sítio II. Evidências bioquímicas determinaram que estas regiões são importantes na coordenação dos íons em outras P-ATPases (Møller *et al.*, 1996; Jorgensen *et al.*, 1998), sendo que as transmembranas 5 e 6 parecem ser as responsáveis pela especificidade de ligação aos diferentes íons transportados pelas diferentes P-ATPases (Jorgensen *et al.*, 1998).

De acordo com critérios estruturais, como as semelhanças e diferenças no perfil de hidrofobicidade e algumas seqüências características, as ATPases tipo P foram agrupadas em 5 subfamílias (figura 3), que ainda são subdivididas em diferentes tipos (Lutsenko e Kaplan, 1995; Møller *et al.*, 1996; Catty *et al.*, 1997; Palmgren e Axelsen, 1998; Axelsen e Palmgren, 1998). Algumas destas subfamílias serão descritas em detalhe a seguir.

2.1.1 - Subfamília I

Tipo IA :

Este tipo de ATPase é representado por uma das subunidades (subunidade B) que forma o sistema de alta afinidade para a captação de potássio (sistema KDP) em algumas bactérias (Møller *et al.*, 1996).

Tipo IB :

As proteínas pertencentes a este tipo foram denominadas P1-ATPases (Lutsenko e Kaplan, 1995). Os membros desta subclasse incluem principalmente as ATPases procarióticas: Cd-ATPase (Nucifora *et al.*, 1989), CopA e CopB (Odermatt *et al.*, 1993) entre outras. Neste grupo estão também as ATPases de cobre associadas às

Figura 3 – Visão geral das estruturas das subfamílias das P-ATPases. As subfamílias estão representadas por algarismos romanos e pelos íons que elas transportam. Os retângulos indicam as hélices transmembranas; os círculos pretos representam sítios inibitórios que são alvos de indutores (como cálcio-calmodulina nas de tipo IIB ou fosforilação nas de tipo IIIA); círculos brancos representam sítios para ligação de metais pesados. Abreviaturas: FL-fosfolipídeos; ND-não determinado; flb-fosfolamban. A subunidade γ foi descrita apenas nas Na^+/K^+ -ATPases. O proteolípídeo representado por uma interrogação nas de tipo IIIA ainda é alvo de discussão (o esquema foi adaptado de Axelsen e Palmgren, 1998).

doenças de Menkes e Wilson (Vulpe *et al.*, 1993; Tanzi, 1993; Bull *et al.*, 1993) e as codificadas por dois genes (CCC2 e PCA1) de *S. cerevisiae* que estão envolvidos no transporte de Cu^{++} . As P-ATPases do tipo IB possuem de 6 a 8 regiões transmembranares, sendo que 2 estão localizadas na região carboxila depois da alça hidrofílica maior. Uma das principais características das IB-ATPases é a presença de uma extensa região hidrofóbica antes do domínio TGES que se constitui por 2 a 3 pares de regiões transmembranares, enquanto que as outras ATPases tipo P possuem apenas um par. Uma outra característica importante é a presença de motivos de ligação a metais, GTMCXXC que se localiza na porção amino terminal destas proteínas. O número de cópias deste motivo pode variar de 1 a 6 vezes, o que explica a grande diferença de massa molecular entre os representantes desta subclasse (para revisão ver Lutsenko e Kaplan, 1995).

Todas as ATPases tipo P conhecidas (mais de 300) possuem um resíduo de prolina localizado 43 aminoácidos antes do motivo DKTGT. Esta prolina está situada no meio de uma região transmembranar e nas P1-ATPases ela é flanqueada, invariavelmente, por um resíduo de cisteína do lado amino-terminal e por uma cisteína, histidina ou serina do lado carboxila-terminal. Devido à sequência “CPx” ser característica desta subclasse de ATPases, elas foram também chamadas de CPx-ATPases (Solioz e Vulpe, 1996).

2.1.2 - Subfamília II

As ATPases desta subfamília possuem de 8 a 10 regiões transmembranares. Este grande grupo de ATPases pode ainda ser subdividido em 4 tipos: IIA, IIB, IIC e IID.

Tipo IIA :

Este grupo é representado pelas Ca^{++} -ATPases do tipo SERCA, que transportam íons de cálcio do citoplasma para o lúmen do retículo endoplasmático e exercem um importante papel na fisiologia muscular. Esta ATPase é uma das mais estudadas e muito do que se sabe hoje, a respeito dos prováveis resíduos implicados na ligação e

translocação do(s) cátion(s) através de membranas biológicas advém dos estudos feitos com esta enzima. O íon Ca^{2+} é sabidamente um regulador importante de processos celulares, atuando como segundo mensageiro em processos de transdução de sinais, mas pode ser tóxico em altas concentrações no citossol. A Ca^{++} -ATPase de retículo juntamente com a Ca^{++} -ATPase de membrana plasmática têm a função de manter as concentrações citossólicas de cálcio na faixa de micromolar.

Tipo IIB :

O tipo IIB é representado pelas Ca^{++} -ATPases de membrana plasmática. Além de algumas características na sequência primária de aminoácidos, a principal característica estrutural das ATPases tipo IIB, que permite distingui-las das de tipo IIA, é a presença de uma extensão carboxila-terminal à qual está associada uma função regulatória. Há evidências de que esta cauda hidrofílica interage com os domínios catalíticos da enzima inibindo sua atividade, e que esta auto-inibição seria revertida pela ação de moduladores como Ca^{++} /calmodulina.

Tipo IIC :

Este tipo está representado pelas Na^+/K^+ ATPases e H^+/K^+ ATPases. Neste grupo podemos também incluir a ATPase de *B. emersonii* (BePAT1) (de Souza e Gomes, 1998) que será discutida em detalhe mais adiante.

As Na^+/K^+ -ATPases foram descritas apenas em animais e apresentam grande similaridade entre elas. A Na^+/K^+ -ATPase está presente na membrana plasmática de todas as células animais e é essencial para a regulação do volume e pH intracelular, para a manutenção do potencial de membrana e para os processos de absorção de nutrientes. Um inibidor específico muito importante da Na^+/K^+ -ATPase é o glicosídeo cardíaco Ouabaína, que é capaz de se ligar à região amino terminal da proteína de maneira competitiva com o íon K^+ (Rossier *et al.*, 1987).

Além da cadeia típica das ATPases tipo P (figura 2), as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases possuem uma subunidade β de aproximadamente 50 kDa (Sachs *et al.*, 1992),

cuja função está relacionada com a maturação e transporte da holoenzima para a membrana plasmática (para a revisão ver Geering, 1991). Os estudos feitos com a Na^+/K^+ -ATPase tornaram-se de vital importância para a cardiologia e a neurologia, e o primeiro cientista a descrever uma Na^+/K^+ -ATPase, o dinamarquês Jens C. Skou foi agraciado com o prêmio Nobel de Química em 1997.

Tipo IID :

As Na^+ -ATPases, cujos genes foram descritos inicialmente em *S. cerevisiae*, fazem parte deste subgrupo. Os 4 genes denominados ENA1 a ENA4 (Haro *et al.*, 1991; Garciadeblas *et al.*, 1993) dispostos *in tandem* no genoma de *S. cerevisiae* e alguns outros poucos representantes são os únicos codificantes de ATPases que transportam somente íons Na^+ , ou provavelmente, promovem a troca Na^+/H^+ (Benito *et al.*, 1997).

2.1.3 - Subfamília III

Tipo IIIA :

Este tipo é representado pelas H^+ -ATPases de fungos e plantas. Estas ATPases controlam o pH intracelular e geram um gradiente eletroquímico usado para o transporte de nutrientes através da membrana via simporte próton/nutriente, além de participar do controle de vários mecanismos fisiológicos, como por exemplo, a abertura estomática em plantas (Goffeau e Slayman, 1981; Hopkins, 1995). Entre os fungos, a ATPase de prótons de *S. cerevisiae* é uma das mais estudadas. O gene *pma1* foi o primeiro gene codificando uma ATPase tipo P clonado e seqüenciado em levedura (Serrano *et al.*, 1986), sendo que recentemente, o sequenciamento completo do genoma de *S. cerevisiae* mostrou a presença de 16 quadros abertos de leitura codificando para ATPases tipo P (Catty *et al.*, 1997). A H^+ -ATPase codificada pelo gene *pma1*, localiza-se na membrana plasmática e é essencial para a viabilidade da levedura (Serrano *et al.*, 1986). Além deste gene, um outro gene chamado *pma2* codifica uma isoforma que é

pouco expressa e não é essencial, sendo que a sua interrupção causa apenas crescimento retardado da levedura (Schlesser *et al.*, 1988; Viegas *et al.*, 1994). ATPases de prótons foram clonadas também em *Neurospora crassa* (Hager *et al.*, 1986), *Schizosaccharomyces pombe* (Ghislain *et al.*, 1987) e *Candida albicans* (Monk *et al.*, 1991), sendo altamente conservadas na sua sequência de aminoácidos.

2.1.4 - Subfamília IV :

Em 1996, Tang e colaboradores demonstraram que um certo grupo de ATPases possuía algumas características em comum que poderiam agrupá-las em um nova classe de ATPases que estariam envolvidas na translocação de aminofosfolipídeos. Atualmente, já se conhece cerca de 10 proteínas que possuem sequências características deste subgrupo. Dentro destas sequências estão o motivo LDGET que é uma variante do motivo altamente conservado (localizado na alça hidrofílica menor) TGES e duas sequências localizadas no domínio hidrofílico maior: GxT(A/G)(I/V)ED(K/R)LQxxV e (A/S)xSPDExA(L/I)(V/I). Outro motivo muito importante é o domínio P(I/V/L)SL, onde o resíduo de glutamato (E) carregado presente no domínio (PEG/SL) característico das P-ATPases (figura 2) é substituído por um resíduo apolar.

2.1.5 - Subfamília V :

A existência desta nova subclasse de ATPases foi proposta recentemente por Catty e colaboradores (1997). Após conclusão do projeto genoma de *S. cerevisiae* estes autores encontraram 2 genes (YEL031W e YOR291W) que codificam para ATPases não relacionadas com as outras subclasses conhecidas. Dezesseis (16) P-ATPases conhecidas podem ser agrupadas nesta nova subclasse. Uma característica estrutural bem distinta neste grupo, que ainda não foi observada em outras ATPases é a presença de uma longa inserção que varia de 100 a 200 aminoácidos localizados entre os domínios transmembranares 1 e 2. Além desta inserção, foram identificadas algumas sequências características que estão presentes em todos os 16 membros do grupo.

3 - ATPase tipo P em *B. emersonii*:

Recentemente, um gene codificando uma ATPase tipo P em *Blastocladiella emersonii* foi clonado e sequenciado (de Souza e Gomes, 1998). Além deste gene, que representa um fragmento genômico *Bam*HI-*Hind*III de 4,3 kb, foi clonado um outro fragmento *Hind*III- *Bam*HI de 2,4 kb que contém parte de um quadro aberto de leitura que parecia codificar uma ATPase muito semelhante à do clone de 4,3 kb. O gene contido no fragmento de 4,3 kb foi chamado de BePAT1 e o gene do fragmento de 2,4 kb de BePAT2 (Figura 4).

Figura 4 – Mapa de restrição parcial dos fragmentos genômicos *Bam*HI/*Hind*III representando os genes BePAT1 e BePAT2 isolados por de Souza (1995). As regiões codificadoras estão representadas em cinza e um intron no gene BePAT1 está em preto. As linhas representam as regiões 3' e 5' não traduzidas.

A região codificadora de BePAT1 foi totalmente sequenciada e possui 3246 pares de bases, sendo que foi encontrado um íntron de 103 pb interrompendo a sequência codificadora. A proteína deduzida a partir da sequência de nucleotídeos possui 1081 resíduos de aminoácidos. Do fragmento de 2,4 kb foram sequenciados apenas 540 pb, sendo que as regiões que foram sequenciadas nos dois genes possuem

alta identidade quando se compara a sequência de aminoácidos deduzida (>90%) (de Souza, 1995). Em BePAT1 verificou-se uma inserção (em relação a outras ATPases) de cerca de 60 aminoácidos, com forte caráter hidrofílico, localizada após a provável sexta hélice transmembranar da proteína (de Souza e Gomes, 1998).

A sequência de aminoácidos deduzida para a proteína BePAT1 apresenta maior similaridade com as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases de células animais e a ocorrência deste tipo de ATPase nunca foi descrita em fungos. Uma evidência curiosa foi observada em experimentos eletrofisiológicos, utilizando microeletrodos, feitos com *B. emersonii* (Van Brunt *et al.*, 1982), sugerindo que este fungo seria uma exceção em relação aos outros microrganismos quanto ao principal sistema eletrogênico. Estes experimentos sugeriram que ao invés de uma H^+ -ATPase este microrganismo possuía um sistema ativo de acumulação de K^+ e que este sistema seria o principal gerador de potencial de membrana.

II - OBJETIVOS

Durante o seu ciclo de vida *B. emersonii* passa por dois estágios de diferenciação celular: a germinação e a esporulação, sendo que as transições de um estágio a outro são determinadas pela disponibilidade de nutrientes no meio. Tendo em vista que as ATPases tipo P criam o gradiente eletroquímico necessário à captação de nutrientes do meio, espera-se que estas ATPases exerçam um papel fundamental no ciclo de vida deste fungo.

O objetivo principal do nosso trabalho foi estudar a expressão dos genes BePAT1 e BePAT2 durante o ciclo de vida do fungo, bem como, determinar qual ou quais íons são transportados por estas ATPases.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Reagentes

Todos os Reagentes utilizados foram de grau analítico.

2 - Enzimas

As enzimas de uso freqüente em Biologia Molecular: Endonucleases de restrição, T4 DNA Ligase, DNA polimerases, T4 polinucleotídeo quinase entre outras foram obtidas da New England Biolabs, Amersham Pharmacia Biotech, Gibco-BRL ou da PE Biosystems.

3 - Material radioativo

Os nucleotídeos radioativos [γ - ^{32}P]-ATP, [α - ^{32}P]-dATP, [α - ^{32}P]-dCTP, [α - ^{35}S]-dATP, [^{35}S]-metionina foram obtidos da NEN ou Amersham Pharmacia Biotech.

4 - Oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos sintéticos utilizados neste trabalho foram obtidos da Bio-Synthesis (importado pela Promicro) ou da Gibco-BRL.

Nome	Seqüência
rt3fatp1	5' CGA CGC ACA TTT TCA AGA AC 3'
rt3ratp1	5' GTG GAG GAA GAG GAG GGG 3'
rt3fatp2	5' TTC GCC CTT TAC GAT GCA C 3'
rt3ratp2	5' CGC CAC ATA CCA CGA CCA C 3'
NdeI2	5' CTC CTT CCC CAT ATG GCC AAA GAC AAA CAG 3'
HindIII	5' TAT AAG CTT ATG GCC AAA GAC AAA CAG 3'
rtbeta1	5' GCG CGC ACG CAT ACG TGC 3'
rtbepat2	5' CGC CGA CGC TCC CCC TAC 3'
comp	5' CTG GTT CTT CGG CAT CTT C 3'
atpIIr(B/S)	5' GGT GCT GTC GCA CAA GGT C 3'
atpIIr(B/S)	5' CTG ACG TTC GGC GAG CGC 3'
Bam/Sac rev	5' TTC TGT CAC GCA ATA TTG 3'
LF3	5' GAG CAG GAG GAA GTT GAA 3'

LF1	5' CCA CAA GAT GGC CCA CGC CAA 3'
LF2	5' TTG ACG AGG TCC GAG GCG 3'
oligo2	5' ACG CCG TCG CCG GTG ACA 3'
oligo3	5' TAA CGA CTC GCC CGC GCT 3'
SacI	5' TAT GAG CTC TTA CGC GGC AGA CCA GCG 3'
4K5	5' TTT GGC CAT AGC GGG AAG 3'
2K5	5' CAT CGT GGA GGG TCG CTG 3'
Pst/Sac rev 2	5' CCA TCC GCA GCA TTC AGC 3'
Pst/Sac fow 2	5' TCG TGG ACT GGA ACA CGC 3'
cDNA fow	5' GTC GAC ACC GAG TCG ATC 3'
cDNA rev	5' GCG GCG ACG ACC GGT TAC 3'

5 - Linhagens de *E. coli*

TG-1: *supE*, *hsd* Δ 5, *thi* Δ (*lac-proAB*)F' [*traD*36, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ* Δ M15]

Y1090: Δ *lacU*169, *proA*⁺, Δ *lon*, *araD*139, *strA*, *supF*[*trpC*22::Tn10], *hsdR*⁻, *hsdM*⁺ (pMC9)

DH5 α : *supE*44, *lacU*69 (80*lacZ* M15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*11, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1

6 - Manutenção das culturas de *B. emersonii* :

O fungo aquático *Blastocladiella emersonii* (*B. e.*) foi mantido em placa de petri contendo meio PYG-ágar (1,25g de extrato de levedo; 1,25g de peptona bacteriológica; 3g de glicose; 10g de ágar bacteriológico; água qsp 1000ml). As culturas foram renovadas diariamente através do repique de zoósporos diluídos em H₂O Milli-Q estéril. Após o repique, as placas foram mantidas a 19°C por aproximadamente 20h. Após este tempo os zoosporângios já maduros foram colocados a 27°C para a indução da esporulação. Após a esporulação os zoósporos foram recolhidos com H₂O Milli-Q estéril e repicados novamente. O ciclo do fungo foi acompanhado diariamente através de observação em microscópio óptico invertido.

7 - Extração de DNA total de *Blastocladiella emersonii* :

Foram inoculados $1,4 \times 10^8$ zoósporos em 2 litros de PYG líquido. Após o crescimento sob agitação a 24°C durante 14 horas, as células foram coletadas por filtração em rede de náilon (poros de 30µm) e ressuspensas em 1,2 litros de solução de esporulação (Tris-maleato 1mM pH 6,8 contendo CaCl_2 1mM). As células foram incubadas a 27°C por 3,5 horas. Neste ponto as células foram filtradas novamente em rede de náilon e o filtrado que continha os zoósporos foi centrifugado por 5 minutos a 1000xg e os zoósporos ressuspensos em 20ml de solução de esporulação (SE) e novamente centrifugados por 3 minutos a 1000xg. Os zoósporos foram então ressuspensos em 7,2ml de SE.

À solução de zoósporos foram adicionados 7,25ml de solução A (Tris-HCl 50mM pH 8 contendo EDTA 10mM, NaCl 1M e SDS 2%) e 14,5ml de fenol saturado em solução A. A mistura foi agitada por 30min a temperatura ambiente e centrifugada por 15 minutos a 8000xg. A fase aquosa foi recuperada e a ela foram adicionados 2,5 volumes de etanol absoluto. A mistura foi então deixada precipitar em banho de acetona e gelo seco por 20 minutos. O precipitado foi lavado com etanol 70 %, seco a vácuo e ressuspenso em 3ml de 1× SSC (NaCl 0,15M, citrato de sódio 0,015M, pH 7) e a amostra foi dialisada durante a noite contra 2 litros de 0,1×SSC.

Ao conteúdo do saco de diálise foram adicionados 0,145ml de 20× SSC (concentração final 1×SSC); α-amilase de *Bacillus subtilis* (100µg/ml); RNase A (200µg/ml) e RNase T1 (26µg/ml). A diálise foi trocada para 1× SSC e o sistema foi incubado a 37°C por 3 horas, seguindo-se uma nova troca do tampão de diálise (1×SSC). A hidrólise do RNA foi acompanhada pelo aumento da absorbância a 260nm da solução de fora do saco de diálise . Após duas horas a 37°C, a diálise (1×SSC) foi novamente trocada e incubada durante a noite a temperatura ambiente.

No dia seguinte, a diálise foi novamente trocada e adicionou-se a enzima pronase (350 µg/ml). O sistema foi então incubado a 37°C por 2 horas. Após este período a amostra foi retirada e a ela foram adicionados: 3,6 ml de fenol saturado em Tris-HCl 500 mM pH 8 contendo EDTA 10 mM, NaCl 10mM e SDS 0,5%. A mistura

foi mantida sob agitação por 15 minutos e centrifugada por 15 minutos a $3000\times g$. À fase aquosa adicionou-se 2 volumes de etanol 100% seguindo-se incubação em banho de gelo seco/etanol por 30 minutos. O precipitado resultante foi coletado por centrifugação a $8000\times g$ por 30 minutos e ressuspensão em 1 ml de $0,1\times SSC$ e dialisado contra $0,1\times SSC$ durante a noite a $4^{\circ}C$. No dia seguinte a quantidade de DNA na solução foi estimada em espectrofotômetro com leituras a 260 e 280 nm. Obteve-se cerca de 1 mg de DNA em 2 ml de solução.

8 - Preparação de RNA total de *Blastocladiella emersonii* :

Cerca de $1,5 \times 10^8$ zoósporos obtidos de placas de PYG (item 6 de materiais e métodos) foram inoculados em 500 ml de DM4 (Maia e Camargo, 1974) e incubados durante a noite (14 horas) à $19^{\circ}C$ e sob agitação de 150rpm. As células foram lavadas e ressuspensas em 300 ml de SE (Tris-maleato 1mM pH 6,8, $CaCl_2$ 1mM). Amostras de 60 ml (2×10^7 células) foram colhidas em diferentes tempos durante a esporulação e filtradas sob vácuo em papel de filtro Watmann nº 1. As células foram raspadas do papel e colocadas em graal de porcelana (em banho de gelo seco). As células foram maceradas juntamente com nitrogênio líquido. Logo a seguir 1,5 ml de TRIZOL-LS® (GIBCO-BRL) foram adicionados. A mistura congelada foi levada a um banho Maria a $65^{\circ}C$ até liquefazer. Após esta etapa as amostras foram transferidas para tubos eppendorff (1,5 ml) adicionando-se 500 µl de H_2O milli-Q - DEPC. A mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos e incubada à temperatura ambiente por 5 min. foram então adicionados 200µl de clorofórmio e as amostras foram novamente agitadas vigorosamente por 10 segundos e deixadas a temperatura ambiente por mais 3 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 12.000rpm por 15min a $4^{\circ}C$. A fase aquosa obtida (600 µl) foi precipitada com 500 µl de isopropanol por 10 min à temperatura ambiente. As amostras foram então centrifugadas a 12000rpm por 10 min a $4^{\circ}C$. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% e novamente centrifugada a 7500 rpm por 5 min a $4^{\circ}C$. Os RNAs foram ressuspensos em 200 µl de H_2O milli-Q - DEPC.

9 – Preparação de extrato de proteína pelo método de precipitação por TCA :

Zoósporos ($1,5 \times 10^8$) obtidos de placas de PYG (item 6 de materiais e métodos) foram inoculados em 500 ml de meio mínimo DM4 (Maia e Camargo, 1974) e incubados durante a noite (14 horas) a 19°C e sob agitação de 150 rpm. As células foram lavadas e ressuspensas em 300 ml de SE. Aliquotas de células de 18 ml foram coletadas em diferentes tempos durante a esporulação e zoósporos. Às aliquotas foram adicionados 2 ml de TCA 100% (concentração final 10%) e as amostras foram mantidas em gelo por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas a 3000xg por 10 minutos a 4°C, e o precipitado lavado com 5 ml de acetona gelada seguindo-se nova centrifugação. A lavagem com acetona foi repetida por três vezes. O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 1 ml de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 contendo EDTA 5mM e NaCl 150mM) além de inibidores de proteases (PMSF 150µg/ml, Benzamidina 2mM). Para os zoósporos os extratos foram obtidos após agitação vigorosa, e para as demais células (por possuírem parede celular) os extratos foram obtidos por sonicação com 3 pulsos de 20 segundos a 20% da potência máxima do aparelho, com intervalos de 1 minuto entre os pulsos. Os extratos foram submetidos a uma breve centrifugação de 500xg por 5 min e o sobrenadante novamente centrifugado a 24000xg por 60 minutos. O sobrenadante obtido foi guardado como controle e o precipitado ressuspenso em 100µl de tampão de amostra para gel SDS-PAGE (Laemmli, 1970) contendo 0,7 M de β-mercaptoetanol. Após incubação a temperatura ambiente por 20 minutos as amostras foram resolvidas em em gel de SDS-PAGE e analisadas por “Western blot”.

10 - Preparação de frações particuladas de zoósporos de *B. emersonii* :

Zoósporos de cultura em placa foram inoculados na concentração de 7×10^7 zoósporos / litro de meio PYG-P (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,15%; KH_2PO_4 2,5 mM e K_2HPO_4 2,5 mM pH 6,8) em um frasco de cultivo Fernbach e incubados com agitação (150 rpm) por 15 h a 21°C. Após este período as células

foram filtradas em uma tela de nylon (poro 30 μ m), lavadas em 2 volumes de SE (Tris-maleato 1 mM, pH 6,8 contendo CaCl₂ 1mM) e ressuspensas em 400 ml desta mesma solução e incubadas a 27°C com agitação de 150 rpm. Após 4 horas, a solução SE foi filtrada sendo os zoósporos recolhidos no filtrado após centrifugação a 3500 $\times$ g por 10 min. Estes zoósporos foram ressuspensos numa proporção de 2 $\times$ 10⁸/ml em uma solução de lise (NaHCO₃ 1 mM; PMSF 150 μ g/ml; Benzamidina 1 mM) e congelados em banho de gelo seco-etanol e em seguida descongelados, este procedimento leva a uma lise total dos zoósporos. O lisado foi submetido a uma breve centrifugação (5min.; 500 $\times$ g) e o sobrenadante foi centrifugado a 100.000 $\times$ g por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 200 μ l de tampão de amostra (Laemmli, 1970). Esta preparação foi denominada de precipitado de 100.000 $\times$ g. Em alguns casos este precipitado foi lavado com carbonato de cálcio 0,1 M.

11 - Marcação de proteínas *in vivo* com pulsos de [³⁵S]-metionina:

Zoósporos (1,5 $\times$ 10⁸) obtidos de placas de PYG (item 6 de Materiais e Métodos) foram inoculados em 500 ml de DM4 (Maia e Camargo, 1974) e incubados durante a noite (14 horas) a 19°C, sob agitação de 150 rpm. As células foram lavadas e ressuspensas em 300 ml de SE (Tris-maleato 1mM, CaCl₂ 1mM). Aliquotas de 20 ml (6 $\times$ 10⁶ células) foram incubadas por 15min a 27°C com 40 μ Ci de [³⁵S]-metionina (2 μ Ci/ml). Foram colhidas amostras nos tempos 0-15min, 60-75min, 120-135min, 150-165min, 165-180min, 180-195min, 195-210min, 210-225min durante a esporulação. Cada amostra foi centrifugada a 3500 $\times$ g por 10 min e o precipitado foi congelado em banho de gelo seco-etanol e guardados a -70°C.

12 – Imunoprecipitação de proteínas:

As células marcadas com [³⁵S]-metionina, como descrito anteriormente, foram ressuspensas em 1 ml de tampão A (Tris-HCl pH 7,5 50 mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM) contendo inibidores de proteases (PMSF 150 μ g/ml, Benzamidina 2mM). Os

zoósporos foram agitados vigorosamente, e os demais fenótipos (por possuírem parede celular) foram sonicados por 3 vezes de 20 segundos a 20% da potência máxima do aparelho, com intervalos de 1 minuto entre as sonicações. O lisado foi submetido a uma breve centrifugação de 400×g por 5 min e o sobrenadante centrifugado a 17000×g por 60 minutos. O sobrenadante foi guardado como controle e o precipitado ressuspenso em 500µl de RIPA buffer (Tris-HCl pH 7,5 10 mM, EDTA 2mM, NaCl 150mM, 0,1% SDS, 1% NP-40, 1% Dioxicolato) contendo PMSF 150µg/ml e Benzamidina 2mM. O material insolúvel foi removido por centrifugação (10000 rpm por 5 min em uma microcentrífuga). O sobrenadante foi incubado por 1 h com proteína-A agarose. As esferas de proteína-A agarose foram removidas por centrifugação (12000 rpm, 30 segundos) e o sobrenadante, após igualadas as contagens, foi incubado durante a noite a 4°C com o soro anti-BePAT1 diluído 100x. No dia seguinte o imunoprecipitado foi lavado três vezes com tampão RIPA, 1 vez com RIPA contendo 0,5M de NaCl, e uma vez com H₂O. As proteínas foram liberadas das esferas de proteína-A agarose com tampão de amostra (Laemmli, 1970) contendo 1,4 M de βmercaptoetanol e incubadas a temperatura ambiente por 20 minutos e em seguida separadas em gel de SDS-PAGE 8%. O gel foi fixado e revelado por fluorografia e exposição em filme de Raio-X a -70°.

13 - Mini-preparação de DNA plasmidial :

A preparação de DNA plasmidial foi realizada segundo o método de lise alcalina, como descrito em Sambrook *et al.* (1989).

14 - Reações de digestão de DNA utilizando enzimas de restrição :

O DNA total de *B.e.* ou plasmídeos foram digeridos com as endonucleases de restrição adequadas nos tampões recomendados pelo fabricante. Nas reações foram utilizadas cerca de 2 unidades de enzimas para cada µg de DNA e a mistura de reação foi incubado por 2 horas a 37 °C. O volume final da reação variou conforme a quantidade de DNA digerida.

15 - Purificação de fragmentos de DNA em gel de agarose :

Para isolar fragmentos de interesse, cerca de 10µg do plasmídeo contendo o fragmento foram digeridos em um volume total de 50 µl, conforme descrito no item 3. A seguir o DNA digerido foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1mM). Após a corrida, a banda correspondente ao fragmento de interesse foi visualizada mediante coloração com brometo de etídeo (0,5µg/ml), cortada do gel e submetida a eletroeluição.

Uma fatia do gel contendo o fragmento a ser purificado foi colocada em um saco de diálise contendo 0,5×TBE (Tris-borato 90 mM e EDTA 2 mM, pH 8) e submetido a uma eletroeluição com voltagem de 100 V por 2 horas. A polaridade da eletroforese foi invertida por 2 minutos e o conteúdo do saco de diálise foi então recolhido e submetido a uma extração com fenol/clorofórmio. A seguir o DNA foi precipitado, durante a noite, com 2 volumes de etanol 100 % e 0,1 volume de acetato de sódio 3 M. O DNA foi coletado por centrifugação a 11000×g por 15 min, seco a vácuo e ressuspenso em 50 µl de TE (Tris-HCl 10mM pH8; EDTA 1 mM).

16 - Ligação de fragmentos de DNA a plasmídeos:

Todas as ligações foram feitas utilizando aproximadamente 10ng de vetor e 100ng de fragmento em tampão de ligase 1× (Tris-HCl 200mM pH 7,5; MgCl₂ 50mM; DTT 50mM; 500 µg/ml de BSA) e 5 U de T4 DNA ligase em um volume final de 20 µl. As reações foram incubadas a 19°C durante 14h.

17 - Obtenção de células competentes para transformação :

17.1 – Método do cloreto de Cálcio :

As células utilizadas em experimentos de transformação foram preparadas de acordo com método de CaCl₂, descrito em Sambrook *et al.*(1989).

17.2 – Preparação de células para eletroporação :

Foi inoculada uma colônia de *E. coli* (DH5 α) em 5 ml de meio SOC (bactotripton 2%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 10mM, KCl 2,5mM, MgCl₂ 20mM, MgSO₄ 20mM e glicose 20mM) e incubada a 37° C, com agitação de 200 rpm durante a noite. Na manhã seguinte foi inoculado 5 ml da cultura (crescida durante a noite) em 500 ml de meio SOC, esta cultura foi mantida sob agitação de 200 rpm, 37° C até atingir uma D.O.₆₀₀ entre 0,45 e 0,6. As células foram coletadas por centrifugação em rotor GSA – Sorvall, 7.000 rpm, 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 ml de H₂O milli-Q estéril gelada. As células foram novamente centrifugadas e ressuspensas em 100 ml de glicerol 10% estéril gelado e em seguida foram transferidas para tubos Falcon. As células foram centrifugadas por 10 minutos 3.000xg a 4°C e depois foram ressuspensas novamente em 1 ml de glicerol 10%. Aliquotas com 30 μ l de células foram feitas e congeladas a -70°C.

18 - Experimentos de transformação :

As transformações com plamídeos como o pUC19, foram feitas incubando-se 10 μ l da reação de ligação, com 200 μ l de células TG-1 competentes durante 30 minutos a 4°C. Após este tempo, o sistema foi incubado a 42 °C por 1 minuto e as células foram então recuperadas por 1 hora em LB líquido, e plaqueadas em LB contendo o antibiótico apropriado juntamente com 30 μ l de IPTG 100mM (Isopropiltiogalactopiranosídeo) e 30 μ l de X-gal (5-bromo-4cloro-3indolil- β -D-galactosídeo) 2%. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite. As colônias que apresentavam cor branca (incapazes de degradar X-gal) foram coletadas, os plasmídeos isolados e analisados por digestão com enzimas de restrição, para verificarmos a presença do inserto de interesse. Para transformação utilizando vetores virais (M13mp18 e M13mp19), os procedimentos iniciais foram idênticos aos descritos para vetores não virais. O procedimento de plaqueamento é que foi diferente: ao sistema contendo a ligação, as células competentes, o IPTG e o X-gal, foram adicionados 100 μ l

de células TG-1 crescidas durante a noite e 3 ml de LB *soft* agar derretido (*soft* agar = meio LB contendo agarose 0,35%). Cada mistura foi vertida sobre uma placa de LB seguindo-se incubação durante a noite a 37°C. Os clones recombinantes do M13 aparecem como placas brancas no meio de um tapete de células formado no *soft* ágar.

18.1 – Eletroporação :

As células preparadas para eletroporação (materiais e métodos 17.2) foram descongeladas em gelo e a elas foram acrescentados 1 a 2 µl de ligação. A mistura foi colocada em uma cubeta de eletroporação de 0,1 cm de diâmetro e em seguida submetida a eletroporação em aparelho Gene pulserTM da Bio-Rad , nas seguintes condições: 12,5kV/cm, 25 µF e 200 ohms. Após a eletroporação as células foram então recuperadas por 1 hora em LB líquido, e plaqueadas em LB contendo o antibiótico apropriado juntamente com 30 µl de X-gal (5-bromo-4cloro-3indolil-β-D-galactosídeo) 2%. As placas foram incubadas a 37 °C durante a noite. As colônias que apresentavam cor branca (incapazes de degradar X-gal) foram coletadas, os plasmídeos isolados e analisados por digestão com enzimas de restrição para verificarmos a presença do inserto de interesse

19 - Preparação de sonda radioativa :

A marcação de sondas radioativas foi feita pela técnica de síntese por oligonucleotídeos de seqüências aleatórias (*random primed synthesis*) (Feinberg e Volgestein, 1984). Cada reação de marcação foi preparada utilizando cerca de 50 ng do fragmento a ser utilizado e cerca de 6 ng de iniciadores aleatórios. Esta mistura foi fervida por 2 minutos e imediatamente colocada em gelo. Foram então adicionados 5µl de tampão NT 10× concentrado (Tris-HCl 0,5M pH7,2; MgCl₂ 100mM e DTT 10mM), 2µl de dTTP(500µM), 2µl de dGTP(500µM), 50 µCi de α-³²P-dATP e 50 µCi de α-³²P-dCTP e 1 µl de DNA polimerase Klenow. A reação foi incubada a 19 °C por 2 horas e 30 minutos e interrompida com a adição de 50 µl de TE. A sonda marcada foi

purificada (para retirar nucleotídeos livres) em uma coluna com 0,9 ml de Sephadex G-50 (Pharmacia), equilibrada com STE (Tris-HCl 10mM pH8; EDTA 1 mM; NaCl 100mM).

20 – Experimentos de “Southern blot”. Hibridação com sonda radioativa e lavagem:

Amostras contendo o DNA digerido foram submetidas à eletroforese em gel de agarose TAE 1% e o DNA foi transferido para membrana de nitrocelulose pelo método descrito por Southern (1975). O gel foi tratado por 45 minutos em solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) e 30 minutos em solução de neutralização (TrisHCl 0,5 M pH 7,5, NaCl 1,5 M). A membrana de nitrocelulose foi previamente embebida em 2×SSC. A transferência foi realizada com solução 10×SSC. Após 16 horas de transferência o DNA foi fixado na membrana colocando-se a mesma por 2 horas a 80°C.

Os filtros de náilon ou nitrocelulose, com o DNA já fixado foram incubados em 10 ml de solução de pré-hibridação (tampão fosfato de potássio pH6,2 60 mM; 6×SSC; EDTA 10mM; SDS 0,4%; formamida 30% e leite desnatado 5%) por 2 horas a 37 °C. Após este tempo, a solução foi substituída por outros 10 ml da mesma solução contendo a sonda radioativa desnaturada por fervura. As hibridações foram realizadas a 37 °C em um forno de hibridação “Hybaid”, por aproximadamente 15 horas.

As lavagens foram feitas sempre em condições de alta estringência: 2 lavagens com SSC 0,5× e SDS 0,1% por 10 minutos a 37 °C, seguidas de 2 lavagens nas mesmas condições de salinidade à 55 °C. Após as lavagens os filtros foram expostos a filme de raios-X a -70 °C.

21 - Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e “Northern blot”:

O RNA total (15 µg) extraído de células de *B. emersonii* nos diferentes estágios do seu ciclo de vida (ver item 8 de materiais e métodos) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2,2 M. As amostras de

RNA foram aplicadas juntamente com tampão de amostra para RNA (MOPS 20mM pH7; EDTA 0,1M; e brometo de etídeo). Após 3 horas de corrida a 80 volts, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

O gel foi tratado com uma solução de NaOH 50 mM por 30 minutos, lavado com H₂O e incubado por 30 minutos com uma solução Tris-HCl pH 7,5; 0,15 M de NaCl. O gel foi lavado novamente com H₂O e transferido a vácuo para uma membrana de nylon. O RNA transferido para a membrana foi fixado por “crosslinking” com luz ultra-violeta por 6 minutos. As membranas foram tratadas com solução de pré-hibridação (Na₂HPO₄ pH7,2 0,12 M; NaCl 0,25M; EDTA 1mM; formamida 50%; SDS 7%) por 2 horas a 37°C. Ao fim deste tempo, a solução de pré-hibridação foi retirada e uma nova solução foi adicionada juntamente com a sonda radioativa desnaturada por fervura. A mistura foi incubada por 16h a 37°C.

A membrana foi então lavada com:

- SSC 1,0×, SDS 0,1% por 30 minutos a 42°C;
- SSC 0,5×, SDS 0,1% por 30 minutos a 42°C;
- SSC 0,1×, SDS 0,1% por 30 minutos a 55°C.

Após a lavagem a membrana foi seca à temperatura ambiente e exposta a uma luz ultravioleta para fixar o RNA. A membrana foi então exposta a um filme de raio X.

22 - Expressão e purificação da proteína recombinante BePAT1-His :

O fragmento de PCR amplificado inicialmente na clonagem do gene BePAT1, foi clonado no vetor pTRC-His B (Invitrogene) para a expressão de parte da proteína BePAT1. Os procedimentos para a clonagem foram feitos assim como descritos em itens anteriores. Os clones positivos foram inoculados em 2 ml de LBA e crescidos durante a noite. No dia seguinte esta cultura foi inoculada em 10 ml de LBA de modo que a DO₆₀₀ inicial fosse 0,1. O clone foi então crescido a 37 graus até DO₆₀₀ entre 0,25 - 0,3. Retirava-se então amostras de 1 ml em 0, 2 e 3 horas após adição de IPTG 1 mM. Estas amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 11000 rpm e o precipitado foi

ressuspenso em 100, 200 e 200 µl de tampão de amostra para eletroforese , respectivamente. Os extratos protéicos foram separados por SDS-PAGE (Gel de poliacrilamida desnaturante) segundo Laemli (1970).

Para a purificação da proteína induzida, um experimento similar ao descrito acima foi feito só que em uma escala maior, ou seja, cerca de 0,5 ml de uma cultura crescida durante a noite foram inoculados em 50 ml de meio LBA, quando a DO₆₀₀ alcançava 0,3 IPTG (1mM) foi adicionado. Após 2 horas as células foram recolhidas por centrifugação e o pellet foi ressuspenso em 1 ml de tampão de lise (Tris-HCl pH7 10 mM; NaCl 100 mM; imidazol 20mM; inibidores de proteases, PMSF e benzamidina) e sonicado 3× por 15". O lisado foi centrifugado e ao sobrenadante foram adicionados 200 µl de uma resina de agarose-níquel equilibrada em tampão de lise. O extrato foi incubado a 4 graus sob agitação durante 1 hora. A resina foi, então lavada 3× com tampão de lise a proteína recombinante foi eluída com concentrações de 50, 75, 100 e 150 mM de imidazol em tampão de lise.

Nas purificações em grande escala, as quantidades do experimento descrito acima foi multiplicado por 5.

23 – Imunização de Coelho para obtenção de soro policlonal :

A proteína recombinante BePAT1-His obtida como descrito no item anterior foi utilizada para imunizar um coelho fêmea de cerca de 2 meses de idade. Dez dias antes da imunização, 5 ml de sangue foram retirados pela veia marginal da orelha , incubado a 37°C por 30 minutos e centrifugado 10 minutos a 2500 rpm numa centrífuga de mesa, para separação do coágulo. O soro pré-imune foi recolhido e congelado em alíquotas a -20°C.

A primeira injeção foi feita com cerca de 0,5 mg de proteína em 0,5 ml de tampão TBS adicionado de 0,5 ml de adjuvante de Freund completo (Sigma), subcutaneamente no dorso do animal. Após 20 dias a imunização foi repetida nas mesmas condições, exceto pelo uso do adjuvante de Freund incompleto (Sigma). Cerca de 10 ml de sangue foram retirados após uma semana e tratados como descrito para o

pré-imune. O soro obtido foi utilizado em ensaios de “Western blot” nas diluições 1:100, 1:200, 1:500, 1:1000 contra extratos particulados de zoósporos. Depois de passados doze dias, nova retirada de sangue foi realizada, obtendo-se cerca de 50 ml de sangue. A capacidade do soro de imunoprecipitar as ATPases de *B. emersonii* também foi analisada. Em todos os testes o soro funcionou muito bem e determinamos uma Diluição de 1:500 para ensaios de Western blot e uma diluição de 1:100 para ensaios de imunoprecipitação.

24 – “Western blot”:

Proteínas separadas eletroforéticamente em gel de poliacrilamida-SDS, foram transferidas para filtro de nitrocelulose, como descrito por Towbin *et al.* (1979). A transferência das proteínas para a membrana foi realizada utilizando o sistema Novablot (Amershan Pharmacia Biotech). Após a transferência as proteínas na membrana foram coradas com Ponceau S 0,1% em ácido acético 10% e descorado com água destilada. O filtro foi bloqueado por 20 minutos a 30 minutos em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado. A solução foi trocada e os anticorpos adicionados nas concentrações adequadas, sendo a membrana incubada por 2 horas à temperatura ambiente com agitação suave. Após incubação as membrans foram lavadas por 5 minutos 2 vezes em TBS-T (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150mM; Tween 20 0,05%) e uma vez em TBS por 10 minutos, procedendo-se então à incubação com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina ou peroxidase, seguida de nova lavagem como descrito acima.

Para a revelação com a fosfatase alcalina, foram utilizados BCIP (5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato; 0,3 mg/ml) e NBT (nitroblue tetrazolium; 0,15 mg/ml) em tampão Tris-HCl 10 mM pH 9,0; NaCl 100 mM e $MgCl_2$ 5 mM. A revelação para o conjugado com peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit ECL (Amershan Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante.

25 – Microscopia de imunofluorescência confocal :

Zoósporos obtidos de placas foram coletados e lavados com água estéril. Após a lavagem os zoósporos foram fixados com para-formaldeído 4% durante duas horas a temperatura ambiente. Para tanto 0,5 grama de para-formaldeído foi ressuspenso em 6,25 ml de água (concentração final de 8%) e colocado em banho Maria a 65°C, para a dissolução foram adicionadas gotas de NaOH 5 M seguido de agitação até completa dissolução do para-formaldeído. O p-formaldeído 8% foi diluído em TBS para 4% e então usado para a fixação das células. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes com TBS e incubadas 30 minutos com TBS contendo Triton 0,1%. As células foram lavadas novamente com TBS e colocadas sobre lâminas novas previamente tratadas com poli-lisina. Para tanto as lâminas novas e limpas foram cobertas no local de observação com solução de 0,1% de poli-lisina e incubadas 5 min á temperatura ambiente seguido de incubação por 1 hora a 60°C. As lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas a temperatura ambiente até secarem totalmente. Após as células estarem sobre as lâminas elas foram incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram lavadas com TBS contendo BSA 1% e Azida 0,05% e bloqueadas na mesma solução por 30 minutos seguindo-se da incubação com o soro policlonal anti-BePAT1-His numa diluição de 1:200 (em TBS/BSA/Azida) durante a noite em ambiente úmido. Na manhã seguinte as lâminas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos com TBS/BSA/Azida e incubadas durante 2 horas com anticorpo anti IgG de coelho conjugado com Fluoresceína (FITC) numa diluição de 1:50 em TBS/BSA/Azida. Após a incubação as lâminas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos com TBS e secas a temperatura ambiente. Por fim foi colocado sobre as células algumas gotas de solução de montagem (0,9 ml de glicerol e 0,1 ml de uma solução composta de 10mg de p-fenilenodiamina diluída em 1 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5) e em seguida as lâminas foram cobertas com lamínulas. As lamínulas foram pressionadas levemente sobre a solução de montagem para a retirada do excesso e de bolhas, e em seguida foram coladas às lâminas com esmalte de unha.

As lâminas foram guardadas a -20°C até o dia da observação. As observações foram feitas em um microscópio confocal a laser com o auxílio do Dr. Renato Mortara da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

26 - Reação da polimerase em cadeia (PCR) para obtenção de sondas específicas para os genes BePAT1 e BePAT2:

Foram realizadas reações de PCR com os plasmídeos contendo os genes BePAT1 e BePAT2 com o objetivo de amplificar a região 5' não traduzível, diferente entre os genes, e usar os fragmentos resultantes como sondas em experimentos de “Northern blot” e “Southern blot”.

Os oligonucleotídeos utilizados como iniciadores foram:

oligonucleotídeo reverso do pUC19 – GGAAACAGCTATGACCATG

oligonucleotídeo direto do pUC19 – GTAAAACGACGGCCAGT

oligonucleotídeo 2k5 – CGTGGAGGGTCGCTGGAC

oligonucleotídeo 4k5 - AGCGGGAAGGAGGGGGAG

Os oligonucleotídeos 4k5 e 2k5 correspondem às 18 primeiras bases antes do códon ATG iniciador dos genes BePAT1 e BePAT2 respectivamente. As condições de reação foram :

- 2 mM de MgCl_2
- 0,2 mM de cada dNTPs
- 50 pmoles de cada oligonucleotídeo
- tampão para PCR
- 10 ng dos plasmídeos
- 1 unidade de taq-DNA polimerase
- H_2O milli-Q para 50 μl final.

As etapas de amplificação seguiram as seguintes condições: Uma incubação inicial de 5 minutos a 95°C , 30 ciclos de: desnaturação 95°C , 30 s; pareamento 55°C , 30 s e extensão a 72°C por 30 s.

27 - Construção de um banco genômico parcial:

Um banco parcial foi construído com o intuito de clonar o gene BePAT2. Para a construção do banco cerca de 100µg de DNA total de *Blastocladiella emersonii* foi digerido com *Hind*III e *Sac*I. O sistema de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e os fragmentos contidos na região entre 4 e 6 kb foram eletroeluídos do gel (veja item 15) , os fragmentos foram então ligados ao vetor pUC 19 digerido com *Hind*III e *Sac*I, e as ligações foram usadas para a transformação de *E. coli* DH5α por eletroporação.

28 - Hibridação de colônias em membranas de nitrocelulose:

As colônias obtidas no final do experimento descrito no item anterior foram transferidas para membranas de nitrocelulose conforme a técnica denominada “replica plate” descrita em Sambrook *et al.*, (1982).

29 – Varredura da biblioteca de cDNA :

As células de *E. coli* Y1090 foram crescidas em meio LBA contendo glicose 0,2% e MgSO₄ 10mM até DO. 1. Estas células foram ressuspensas para DO₆₀₀ = 2 em 10mM MgSO₄.

Para o plaqueamento do banco de cDNA construído em λgt11, 50 µl das células preparadas como descrito anteriormente foram incubadas com os fagos do banco, em uma quantidade suficiente para obtermos o máximo de placas de lise, sem no entanto obtermos lise confluyente, em 150 µl de MgSO₄ 10mM por 15 minutos a 37°C. A esta mistura foram adicionados 3 ml de LB *Soft* que posteriormente foram revertidos sobre placas de petri contendo meio LB sólido e incubadas durante a noite a 37°C.

29.1 - Plaqueamento dos clones positivos:

Para o plaqueamento, 50 µl das células preparadas como descrito anteriormente foram incubadas, com o clone do fago λ isolado do banco, em uma quantidade

suficiente para obtenção de lise confluyente, em 150 µl de MgSO_4 10mM por 15 minutos a 37°C. A esta mistura foram adicionados 3 ml de LB *Soft* que posteriormente foram revertidos sobre placas de petri contendo meio LB sólido e incubadas durante a noite a 37°C.

29.2 - Extração de DNA de fago λ -recombinante:

Às placas contendo os fagos foram adicionados 3 ml de tampão de lambda e 25µl de clorofórmio. As placas foram mantidas sob leve agitação durante 1 hora a 37°C.

Foram recuperadas 2 alíquotas de 800 µl de cada placa. Estas alíquotas foram centrifugadas a 12000 ×g por 5 minutos a temperatura ambiente. Ao sobrenadante foram adicionados DNase e RNase a 1 µg/ ml seguido de incubação a 37°C por 20 minutos. Após a incubação foram adicionados 450 µl de PEG 8000 20% contendo NaCl 2,5 M e novamente seguiu-se uma incubação a 4°C por 1 hora. A mistura foi então submetida a uma centrifugação (12000×g) por 15 minutos à 4°C. O precipitado obtido foi ressuspensão em 150 µl de tampão Tris-HCl 200mM pH 8,5 contendo EDTA 20mM , SDS 0,3% e 15µl de uma solução DEPC 10% em etanol. Esta mistura foi incubada a 65°C por 10 minutos e logo após a incubação adicionou-se 1 volume de fenol. Novamente foi feita uma centrifugação e a fase aquosa foi recuperada. Esta operação foi repetida mais uma vez e uma última com fenol:clorofórmio 1:1.

O DNA contido na fase aquosa foi precipitado com etanol (2 vezes o volume) e LiCl 0,8M em gelo seco/etanol por 20 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 100µl de água e a operação de precipitação foi repetida. Em seguida o DNA foi lavado com etanol 80% e ressuspensão em 20 µl de TE.

30 - Preparo de DNA fita simples para seqüenciamento :

Os fagos M13 contendo fragmentos de interesse foram inoculados em 2 ml de LB (1% de tripton; 0,5% de extrato de levedura; 1% de NaCl em água destilada)

contendo cultura de TG-1 em fase de crescimento exponencial. Após 6 horas de incubação a 37°C sob agitação, as culturas foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos a 4°C. Os precipitados contendo células com M13 fita dupla foram guardados como estoque a 20°C. Ao sobrenadante contendo as formas DNA fita simples do fago, foram adicionados 200µl de uma solução de NaCl 2,5 M contendo 20% de PEG 8000. Após uma incubação por 30 minutos no gelo os tubos foram centrifugados a 12000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram cuidadosamente retirados. Os precipitados contendo as partículas virais foram ressuspensos em 100µl de TE e submetidos a uma extração de proteínas com fenol (para quebrar as capas protéicas dos fagos). A fase aquosa foi recolhida e submetida a uma extração com fenol:clorofórmio 1:1, e precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e 0,1 volumes de acetato de sódio 3M. O DNA foi lavado com etanol 70%, seco a vácuo e ressuspenso em 15µl de TE.

31 - Reação de seqüenciamento com a enzima Sequenase (USB-Amershan):

As reações de seqüenciamento foram feitas segundo descrito no manual de instrução do “Kit” “Sequenase Version 2.0- DNA sequencing (USB-Amershan).

32 - Seqüenciamento de DNA dupla-fita por PCR:

Fragmentos de interesse inseridos no vetor pBluescript SK tiveram sua seqüência de nucleotídeos determinadas por PCR seguindo o método descrito no kit “*ΔTaq* Cycle Sequencing Kit”, da Amershan.

As reações foram preparadas segundo as instruções do fabricante, sendo que a quantidade de amostra foi igual a 1µl das mini-preparações de plasmídeos (mini-prep. por lise alcalina, recuperadas por gene clean). Os “primers” utilizados foram os que hibridam com a região do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo SK: M13/pUC (-20) 17mer (Biolabs) e “Reverse” M13 (*lacZ*) (Perkin Elmer). O seqüenciamento ocorreu a partir dos “primers” marcados radioativamente com [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP, seguindo o método de terminação por dideoxinucleotídeos (Sanger *et al.*, 1977).

33 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-uréia para seqüenciamento de DNA:

As reações de seqüenciamento, previamente aquecidas a 80 °C por 2 minutos, foram aplicadas em géis de poliacrilamida 7,5% contendo uréia 8,3 M em TBE. Após a corrida o gel foi transferido para uma folha de papel “Whatman 3 MM” e seco a vácuo a 80 °C em um secador de géis da BioRad por 2 horas. Os géis foram expostos a filme de raios-X, a temperatura ambiente, durante 12 horas.

34 – Reações de seqüenciamento automático de DNA.

Os DNAs dos clones de interesse foram seqüenciados automaticamente utilizando o kit Big dye terminator (Perkin Elmer), seguindo Manual do fabricante.

35 – Gradiente de sacarose.

Foram inoculados $1,4 \times 10^8$ zoósporos em 2 litros de PYG-P (1,25 g de extrato de levedura; 1,25 g de peptona bacteriológica; 3 g de glicose; 10 g de ágar bacteriológico; 0,34 g de KH_2PO_4 ; 0,434 g de K_2HPO_4 ; água qsp 1000 ml). Após o crescimento sob agitação (150 rpm) a 21°C durante 14 horas, as células foram coletadas por filtração em rede de náilon (poros de 30µm) lavadas e ressuspensas em 1,2l de solução de esporulação (SE) (Tris-maleato 1mM pH 6,8; contendo 1mM de CaCl_2). As células foram incubadas a 27°C por 4 h. Neste ponto as células foram filtradas novamente em rede de náilon e o filtrado contendo os zoósporos foi centrifugado por 5 minutos a 1000 ×g. Os zoósporos foram então ressuspensos em 4 ml de tampão de extração (0,25 M de sacarose; 1 mM EDTA; 1mM EGTA; 25 mM Tris/HCl pH7,5; 15µg/ml de PMSF e 1mM de Benzamidina) e rompidos por sonicação (2 pulsos de 10seg. a 20% da potência máxima do sonicador Branson®). O extrato foi centrifugado 600xg por 5 minutos a 4°C para retirar células não quebradas. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000xg 1h a 4°C. O precipitado de membrana foi ressuspenso em 3 ml de sacarose 60% em Tris/HCl 10mM e colocado no fundo de um tubo ultra-clear™ (25x89mm)(Beckman) e em seguida foram colocados lentamente sobre o extrato 3 ml

de solução contendo sacarose 54, 50, 46, 42, 38, 34, 30, 26, 22, 18 e 15% de respectivamente. O tubo foi então centrifugado a 25.000 rpms a 4°C por 2h em um rotor SW28 (Beckman). Foram colhidas 30 frações de aproximadamente 1 ml de baixo para cima com auxílio de uma bomba peristáltica. Amostras de 5 µl das frações foram analisadas por western blot e as de interesse foram armazenadas em frações de 200 µl a -70°C.

36 - Preparação de carvão ativado em HCl 0,1N

25g de carvão ativado (MERCK) foram lavados com 150 ml de HCl 0,1N e centrifugados a 5000 rpm por 10 minutos. Este passo foi repetido 3 vezes e após a última lavagem o carvão foi ressuspensso em 95ml de HCl 0,1N.

37 – Medida da atividade ATPásica

A atividade atpásica das frações do gradiente foi determinada por método radioativo. 5µl de cada fração foram misturados a 5 µl de um tampão 50mM Mops pH7,0; 0,13% DOC (Desoxicolato) e incubados por 30 minutos em gelo. Os 10 µl resultantes foram adicionados a 90 µl de um cocktail contendo ATP 10-500µM; MgCl₂ 2mM; Azida 1 mM; Tris/HCl pH7,0 25 mM; [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (atividade específica 0,5µCi/nmol) contendo diferentes concentrações de Na, K, Ca e Na/K. Após incubação por 5 minutos a 37°C a reação foi interrompida pela adição de 500µl de carvão ativado ressuspensso em HCl 0,1N (item 36 de materiais e métodos). A mistura foi centrifugada 5 minutos a 10.000xg e 60 µl do sobrenadante foram adicionados a 1ml de líquido de cintilação e analisados em contador de cintilação.

As reações foram feitas em duplicata para cada concentração de íon ou inibidor.

38 – Linhagens de leveduras utilizadas para a expressão do gene BePAT1:

CY162: MAT α ura3-52 his3 Δ 200 his4-15 trk1 Δ 1 trk2 Δ 1::HIS3

DBY746: MAT α ura3-D1 leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp1-289

RH16.6: MAT α his3-D1 leu2-3 leu2-112 ura3-52 trp1-289 ena1 Δ ::LEU2::ena4 Δ
 W303 1^A: MATa his3-11 leu2-3 leu2-112 trp1-1 ade2-1 ura3-1
 SY4: a URA leu2-3 112his4-619 GAL2 GAL::PMA1 sec6-4TS

39 – Transformação de levedura segundo o método do cloreto de lítio:

As leveduras foram crescidas a 30°C durante a noite em 10 ml de meio YP (extrato de levedo 1%; peptona 2%) contendo fonte de carbono (glicose na concentração de 2% v/v) até cerca de 2×10^7 células/ml. O meio contendo as células foi centrifugado por 5 minutos a 2000rpm e o precipitado foi lavado com $1/2$ volume (inicial) de 0,1M LiAc em TE pH=7,5. As células foram ressuspensas em $1/100$ volume de 0,1M LiAc em TE e transferidas para um eppendorf que foi incubado a 30°C durante 1 hora.

Para transformação utilizamos 1 μ g de DNA plasmidial para 100 μ l de células, juntamente com 50 μ g de carreador de DNA (DNA de espermatozoides de salmão) que foram incubados a 30°C durante 30 minutos. Após o tempo de incubação adicionamos 700 μ l de uma solução 40% PEG 3300 / 0,1M LiAc em TE e incubamos por mais 1 hora a 30°C. O choque térmico foi dado a 42°C por 5 minutos, depois centrifugamos por 5 segundos para as células sedimentarem. As células, então, foram lavadas com 1ml de TE, ressuspensas em 200 μ l de TE e plaqueadas em meio sólido SD seletivo (0,67% de YNB (difco); 2% glicose ou galactose; contendo por litro 10 mg de adenina, arginina, histidina, lisina, metionina, triptofano, tirosina e uracila; 30 mg de valina e treonina; 50 mg de fenilalanina e 60mg de isoleucina. Sendo que o meio seletivo é indicado a marca axotrófica presente no vetor. Por exemplo : SD_{URA} (SD menos uracila).

39.1 - Transformação da cepa SY4 de *S. cerevisiae*:

O procedimento com a cepa SY4 foi muito semelhante às outras cepas, a diferença foi que a temperatura de incubação foi a 22°C (Ambesi, *et al.*, 1997).

40 - Preparação de extrato protéico de levedura:

As leveduras foram crescidas a 30°C durante a noite em 10 ml de meio SD seletivo até cerca de 2×10^7 células/ml. Centrifugamos o meio contendo as células a 2000rpm por 5 minutos a 4°C e lavamos as células com 5ml de água milli Q. As células foram, então, ressuspensas em 300µl de tampão A (10mM Tris-HCl pH=7,5 / 2mM EDTA / 150mM NaCl) com inibidores de proteases (PMSF - 150µg/ml, benzamidina - 2mM, antipaína - 10µg/ml) e transferidas para um tubo de ensaio. Ao tubo adicionamos 300µl de pérolas de vidro e agitamos vigorosamente em vortex 5 vezes de 30 segundos em intervalos de 1 minuto, mantendo o tubo sempre em gelo. Recolheu-se o sobrenadante num eppendorf, separando-se uma alíquota para correr num gel de proteína SDS-PAGE (Laemmli, 1970), o restante centrifugamos em 17000×g por 1 hora a 4°C, separando-se o extrato total em precipitado e sobrenadante, que também foram aplicados no mesmo gel de proteína.

41 – Purificação por imunoafinidade e fosforilação das ATPases :

41.1 – Purificação por imunoafinidade:

zoósporos (2×10^8) foram ressuspensos em 1ml de tampão 1 (50mM MOPS pH 7; 1mM CaCl_2 ; 1mM KCl; 0,15 M sorbitol) contendo inibidores de protease PMSF, Antipaína, Benzamidina. A suspensão foi sonicada 2 vezes por 10 segundos (20% da potência máxima do aparelho). O extrato foi centrifugado a 500 xg por 5min e o sobrenadante foi centrifugado a 17000 xg por 1h a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 20 µl de tampão 2 (20% glicerol v/v, 10 mM Tris-HCl pH 7, 1 mM DTT) e estocado a -70°C.

O extrato bruto de membrana foi ressuspenso em 200 µl de tampão de solubilização (50mM Mops pH7; 1mM CaCl_2 ; 0,15M de sorbitol; contendo PMSF, Antipaína, Benzamidina e um detergente não iônico C_{12}E_8 na concentração de 25 mg por ml) e incubado sob agitação por 1h a 4°C . O extrato foi então centrifugado a 10.000 xg por 3min e ao sobrenadante foi adicionado anti-ATPase 1:100, seguido de

incubação sob agitação por 2h a 4°C. Após a incubação foi adicionado proteína A-agarose (10% v/v) equilibrada com tampão de solubilização contendo C₁₂E₈ 1mg por ml e foi feita uma nova incubação por 1h nas mesmas condições. O extrato foi centrifugado e as esferas de agarose recuperadas e lavadas 3 vezes com 0,5 ml de tampão de lavagem (50mM Mops pH7; 0,1mM CaCl₂; 10mM MgCl; contendo C₁₂E₈ 1mg/ml).

41.2 – Reação de fosforilação:

A ATPase ligada a proteína A-agarose foi ressuspensa sob agitação em vortex em 30 µl de tampão de fosforilação (50mM Mops pH7; 10mM MgCl; 50µM de ATP; 20µCi γ-³²P-ATP; 30% glicerol contendo a concentração adequada de íons, quelantes e inibidores a serem usados) incubada por 10 segundos em gelo. A reação foi interrompida com 500µl de TCA 10% contendo ATP 200µM. A reação foi centrifugada 5 min 11.000 xg e o precipitado foi lavado 2 vezes com 500µl de TCA gelado 2% e uma vez com tampão de lavagem (50mM Mops pH7; 0,1mM CaCl₂; 10mM MgCl; contendo C₁₂E₈ 1mg por ml). O precipitado foi então ressuspensa em 30 µl de tampão de amostra desnaturante ácido (3,5mM NaH₂PO₄; 1,5 mM Na₂HPO₄; 0,005% SDS; 5% LDS; 0,14M β-mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol; 30% glicerol). e a amostra foi aplicada em gel ácido (6% poliacrilamida; 70mM NaH₂PO₄; 30mM Na₂HPO₄; 0,1 % SDS). O gel seco a vácuo e exposto a um filme de raio-x a -70°C.

41.3 – Ensaios de fosforilação com extratos totais:

Os extratos de proteína solubilizados C₁₂E₈ foram ressuspensos em 50 µl de tampão de fosforilação (50mM Mops pH7; 10mM MgCl; 30% glicerol contendo a concentração adequada de íons, quelantes e inibidores a serem usados). A reação foi disparada com 50µM de ATP (20µCi γ-³²P-ATP) e incubada por 10 segundos em gelo. A reação foi interrompida com 500µl de TCA 10% contendo ATP 200µM. A reação

foi centrifugada 5 min 11.000 xg e o precipitado foi lavado 1 vez com 500µl de sacarose 30%. O precipitado foi então ressuspensionado em 30 µl de tampão de amostra desnaturante ácido (3,5mM NaH₂PO₄; 1,5 mM Na₂HPO₄; 0,005% SDS; 5% LDS; 0,14M β-mercaptoetanol; 0,05% azul de bromofenol; 30% glicerol) e aplicado em gel ácido (6% poliacrilamida; 70mM NaH₂PO₄; 30mM Na₂HPO₄; 0,1 % SDS). O gel seco a vácuo e exposto a um filme de raios-X a -70°C.

42 – Medida da atividade ATPásica pelo método colorimétrico (Taussky e Shorr, 1953):

As medidas das atividades ATPásicas foram feitas em um meio de reação contendo tampão de atividade (MOPS pH7,0 20 mM; MgCl₂ 5 mM; KCl 1mM; CaCl₂ .5 mM) e uma quantidade desconhecida de proteína. A reação foi iniciada com a adição de ATP para uma concentração final de 3 mM e incubada por 40 min a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 1 volume de ácido clorídrico (HCl) 0,2M. A quantidade de P_i liberado foi determinada espectrofotometricamente de acordo com Taussky e Shorr, 1953.

43 – Purificação das ATPases de *B.emersonii* utilizando colunas de troca iônica:

Foram inoculados $1,4 \times 10^8$ zoósporos em 2 litros de PYG líquido. Após o crescimento sob agitação a 24°C durante 14 horas. As células foram coletadas por filtração em rede de náilon (poros de 30µm) e ressuspensas 1,2 l de solução de esporulação (Tris-maleato pH 6,8 1 mM; CaCl₂ 1 mM). As células foram incubadas a 27°C por 3 horas e meia. Neste ponto as células foram filtradas novamente em rede de náilon e o filtrado contendo os zoósporos foi centrifugado por 5 minutos a 1000 xg. Os zoósporos foram ressuspensos em 8 ml de tampão de extração (0,25 M; de sacarose; EDTA 1 mM; EGTA 1 mM; Tris-HCl 25 mM pH7,5; PMSF 1mM e Benzamidina 5 mM) e sonificados por 2 vezes de 10 segundos em um sonicador Branson® em uma potência de 20%. O extrato foi centrifugado 600 xg por 5 minutos a 4°C, para

precipitar células não quebradas. O sobrenadante foi centrifugado a 100.000xg por 40 minutos e o precipitado resultante foi ressuspensão em 1,5 ml de uma solução tampão (Para purificações em colunas Mono-Q o tampão usado foi: Tris-HCl 20 mM pH 8,0; glicerol 20% v/v; 1mM CaCl₂. Para purificações em colunas Mono-S o tampão usado foi: MES 20mM pH 5,5; glicerol 20% v/v; 1mM CaCl₂) contendo C₁₂E₈ 20 mg/ml. O extrato foi novamente centrifugado 100.000xg por 40 minutos e o sobrenadante foi aplicado em uma coluna de troca iônica (Mono-Q ou Mono-S) equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8,0; glicerol 20% v/v; C₁₂E₈ 0,5 mg/ml (Mono-Q) ou com tampão MES 20mM pH 5,5; glicerol 20% v/v; C₁₂E₈ 0,5 mg/ml (Mono-S). As proteínas foram eluídas em frações de 1 ml em um gradiente de 0 a 100% de tampão para Mono-Q ou Mono-S acrescentados de NaCl 0,5M.

Revelamos a presença das ATPases de *B. emersonii* através de experimentos de “western blot”. As atividades ATPásicas presentes nas frações foram caracterizadas utilizando os métodos descritos nos itens 37 e 42.

44 – Métodos Computacionais :

As análises das seqüências de DNA e proteínas, cálculo de massa molecular, perfis de hidrofobicidade, análise de estrutura de RNA, evolução entre outras foram feitas com o conjunto de programas disponível pelo GCG (Genetics computer Group).

As seqüências das proteínas utilizadas no trabalho foram obtidas através do GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) e os respectivos números de acesso estão devidamente listados no texto.

IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 - Clonagem do gene BePAT2 de *B. emersonii*:

A região codificadora que foi seqüenciada para os dois genes, BePAT1 e BePAT2 é praticamente idêntica. De fato, experimentos iniciais de “Southern blot” genômico utilizando como sonda um fragmento do gene BePAT1, mostrou a presença de dois genes muito similares (de Souza, 1995). Para obtermos uma sonda que reconhecesse especificamente o gene BePAT2, amplificamos por PCR a região 5' não codificadora do clone *HindIII/BamHI*, que é diferente entre os genes (de Souza, 1995) (figura 5A). O fragmento amplificado foi chamado de 5'-BePAT2 e usado como sonda em um experimento de Southern blot genômico (figura 5B). Neste experimento verificamos que a sonda 5'-BePAT2 reage especificamente com o gene BePAT2, ao contrário da sonda *PstI/BamHI*, que reconhece tanto BePAT1 quanto BePAT2.

Baseando-se na especificidade da sonda 5'-BePAT2 e com o intuito de obter um clone genômico que contivesse toda a região codificadora do gene BePAT2, digerimos o DNA genômico de *B. emersonii* com a enzima de restrição *HindIII* em conjunto com outras enzimas de restrição, já que, sabíamos que a enzima *HindIII* possuía um sítio a 5' do gene (figuras 4 e 5A). O DNA total de *B. emersonii* foi digerido com as diferentes enzimas e resolvido em um gel de agarose (Figura 6A). Após eletroforese o DNA foi transferido para uma membrana de náilon e hibridado com a sonda 5'-BePAT2 marcada com ^{32}P . Dos fragmentos que se mostraram positivos, resolvemos isolar o fragmento *HindIII/SacI* de aproximadamente 5 kb (figura 6B), que possivelmente conteria toda a região codificadora de BePAT2.

Para isolarmos o fragmento *HindIII/SacI* de aproximadamente 5 kb digerimos cerca de 50 μg de DNA total de *B. emersonii* e após eletroforese em gel de agarose, recortamos do gel a região correspondente aos fragmentos compreendidos entre 4 e 6 kb. Estes fragmentos foram eletroeluídos do gel, purificados e usados para a construção de uma biblioteca genômica parcial. A varredura desta biblioteca utilizando a sonda 5'-BePAT2 permitiu o isolamento de 4 clones positivos. Os clones positivos foram analisados com enzimas de restrição e a confirmação de que se tratava do gene BePAT2 foi feita através do seqüenciamento da extremidade *HindIII* dos clones.

Figura 5 – Análise por “Southern blot” revelando a especificidade da sonda (5'-BePAT2). **A** – Esquema mostrando o mapa de restrição parcial do clone contendo parte do gene BePAT2 de onde foram isolados os fragmentos de DNA: 5'-BePAT2 de 230 pb e *PstI/BamHI* de 700 pb. Estes fragmentos foram utilizados como sonda em experimentos de Southern blot. A sonda 5'-BePAT2 foi obtida através da amplificação por PCR da região 5' não codificadora do clone *HindIII/BamHI* (item 26 de materiais e métodos) e a sonda *PstI/BamHI* de 0,7 kb foi obtida por digestão com enzimas de restrição (*PstI/BamHI*). **B** - 5µg de DNA genômico de *B. emersonii* foram digeridos com as enzimas de restrição indicadas na figura. O DNA digerido foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1% e transferido para membrana de náilon. A membrana obtida foi hibridada primeiramente com a sonda 5'-BePAT2 marcada com ^{32}P e exposta a um filme de raio-X (item 20 de materiais e métodos). Após a revelação do filme, a mesma membrana foi hibridada com a sonda *PstI/BamHI* de 0,7 kb. O resultado mostra a especificidade da sonda 5'-BePAT2.

Figura 6 – Análise por Southern blot genômico do DNA total de *B. emersonii* hibridado com a sonda 5'-BePAT2. **A-** Gel de agarose mostrando o DNA genômico digerido por diferentes enzimas de restrição (1 – *Bam*HI/*Hind*III; 2 - *Hind*III; 3 – *Hind*III/*Sac*I; 4 – *Hind*III/*Kpn*I; 5 – *Hind*III/*Not*I e 6 – *Hind*III/*Sac*II) e corado com brometo de etídeo. **B** – O gel mostrado em A foi transferido para uma membrana de náilon. A figura mostra o autorradiograma da membrana após hibridação com a sonda 5'-BePAT2 marcada com ³²P (A metodologia para a realização dos experimentos de Southern blot está descrita detalhadamente no item 20 de materiais e métodos). A canaleta 7 no painel A mostra o marcador de tamanho molecular (1kb DNA ladder da GIBCO-BRL) e as setas indicam o tamanho molecular correspondente a cada fragmento do padrão.

2 - Mapa de restrição e seqüenciamento do clone genômico *HindIII/SacI* :

Com o objetivo de caracterizar e sequenciar completamente o gene BePAT2, fizemos o mapa de restrição do clone *HindIII/SacI* utilizando algumas enzimas de restrição que já sabíamos digerir o fragmento (figuras 4 e 5A) e algumas outras disponíveis no laboratório. Partindo do mapa de restrição (figura 7), subclonamos os fragmentos *HindIII/SalI*, *SalI/PstI*, *PstI/BamHI*, *BamHI/SacI*, *BamHI/PstI*, *PstI/SacI*, no plasmídeo SK. Estes subclones resultantes foram seqüenciados utilizando os oligonucleotídeos direto e reverso do pUC18, além de alguns outros desenhados especificamente para determinadas regiões do clone. A região compreendida entre os sítios *HindIII/BamHI* foi seqüenciada manualmente e o restante do gene, que vai do sítio *BamHI* até o sítio *SacI*, foi determinado por seqüenciamento automático (ABI 377).

3 - Análise da seqüência do gene BePAT2:

Como sugeriu o seqüenciamento parcial do clone BePAT2 feito por de Souza (1995), a análise da seqüência completa do gene BePAT2 confirmou que *B. emersonii* possui dois genes que codificam ATPases com auto grau de similaridade. A ocorrência de isoformas para P-ATPases é muito comum *S. cerevisiae*, por exemplo, possui dois genes que codificam para H⁺-ATPase, sendo que o gene *pma1* é cerca de 500 vezes mais expresso do que o gene *pma2* (Schlesser *et al.*, 1988). Os genes *pma1* e *pma2* apresentam cerca de 90% de identidade, sendo que alguns trabalhos demonstraram diferenças catalíticas entre elas como a afinidade pelo ATP e a ativação por glicose (Supply *et al.*, 1993).

Outro exemplo da ocorrência de isoformas para P-ATPases são os genes que codificam as Ca⁺⁺-ATPases do tipo SERCA nos vertebrados, onde existem pelo menos 3 genes codificando 5 diferentes isoformas originadas pelo processamento alternativo de alguns introns (Burk *et al.*, 1992). A diversidade de isoformas ocorre também na Na⁺/K⁺-ATPase, onde já foram descritas 3 diferentes isoformas, denominadas de $\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\alpha 3$. As isoformas correspondentes entre diferentes organismos, como mamíferos e aves, são mais similares entre si, do que as diferentes isoformas de um mesmo organismo.

Figura 7 – Mapa de restrição parcial dos clones genômicos contendo as regiões codificadoras dos genes BePAT1 e BePAT2. A figura mostra uma comparação das estruturas dos dois genes estudados neste trabalho. Podemos ver que o gene BePAT2 tem a sua região codificadora interrompida por dois introns enquanto o gene BePAT1 é interrompido apenas uma vez. O segundo intron interrompe os dois genes exatamente na mesma posição (na segunda base do códon da valina em uma região altamente conservada nas ATPases tipo-P: GDGVND). Podemos notar também alguns sítios de restrição que se localizam na mesma posição nos dois genes, isto se deve à alta identidade que existe entre eles quando comparamos a sequência de nucleotídeos (>90%). As setas na parte inferior do esquema representando o gene BePAT2 indicam as direções do sequenciamento utilizando os oligonucleotídeos, universais, direto e reverso. As sequências assim obtidas foram utilizadas para o desenho de oligonucleotídeos representados por setas na parte superior do esquema.

Estes dados sugerem que a duplicação gênica que originou as diferentes isoformas de Na/K-ATPase ocorreu antes da separação evolutiva entre aves e mamíferos (Takeyasu *et al.*, 1990).

O mapa de restrição do clone *HindIII/SacI*, que contém toda região codificadora de BePAT2, além de uma comparação com o clone contendo o gene BePAT1 pode ser visto na figura 7. Podemos observar que o gene BePAT2 tem sua região codificadora interrompida por dois introns, enquanto o gene BePAT1 é interrompido apenas uma vez. As extremidades 5' e 3', bem como o sítio de ramificação dos introns presentes nos dois genes seguem muito bem o consenso obtido para outros introns encontrados em genes de *B. emersonii* (de Oliveira *et al.*, 1994) (Tabela 1).

Intron	5'	Sítio de ramificação	3'
HSP70	G'gtacg	124---gctcac---26	ctag'A
C (I)	G'gtacg	30---gctgat---14	gtag'C
C (II)	G'gtact	36---gctgac---19	gtag'A
C (III)	G'gtacg	33---gctgac---17	gtag'A
R (I)	A'gtacg	370---actaac---22	gtag'C
R (II)	G'gtacg	32---actgac---16	atag'C
BePAT1	T'gtacg	66---actcac---22	gtag'T
BePAT2 (I)	C'gtacg	36---actcat---25	gtag'A
BePAT2 (II)	T'gtacg	44---actcac---16	gtag'T
β -MPP	G'gtacg	180---accaac---14	gtag'C
α -MPP	G'gtgcg	76---gctgac---23	ctag'A
Consenso	'GTACG	PuCTNAC	GTA G'

Tabela 1 – Regiões flanqueadoras e de ramificação de introns de *B. emersonii* e seus respectivos consensos. Os consensos foram deduzidos a partir do sequenciamento dos genes da proteína de choque térmico (HSP70) (Stefani e Gomes, 1995), das subunidades catalítica (C) e regulatória (R) da proteína quinase A (Marques e Gomes, 1992; Oliveira *et al.*, 1994), da subunidades α e β da peptidase processadora mitocondrial (Rocha e Gomes, 1998 e 1999) e das ATPases de *B. emersonii* BePAT1 (Souza e Gomes, 1998) e BePAT2 (este trabalho). Os sítios de ramificação não foram determinados experimentalmente, mas baseados em consensos da literatura (Aebi e Wiessman, 1987).
Pu = purina = A ou G;
N=qualquer nucleotídeo

O segundo intron de BePAT2 interrompe o gene na segunda base do códon da valina⁶⁹² (figura 8) em uma região altamente conservada (⁶⁸⁹GDGVND⁶⁹⁴) em todas as ATPases do tipo P (ver introdução). Este mesmo local é interrompido também pelo único intron do gene BePAT1, indicando que este intron já existia antes do evento de duplicação gênica.

A sequência de DNA obtida do clone contendo o gene BePAT2, além da sequência de aminoácidos deduzida estão mostradas na figura 8. Como podemos observar foram seqüenciados 4.736 pares de base que codificam para uma provável proteína de 119 kDa, muito semelhante à proteína BePAT1 (Souza e Gomes, 1998). O códon para a metionina iniciadora foi determinado empiricamente através da comparação com a sequência de aminoácidos deduzida para o gene BePAT1. Sendo que é a partir deste aminoácido que começa a similaridade entre os dois genes. A figura 8 também mostra os sítios de enzimas de restrição utilizados para subclonagens como esquematizado na figura 7. A comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas para as duas proteínas pode ser vista na figura 9. Podemos observar que as seqüências são praticamente idênticas, sendo que as proteínas possuem uma identidade superior a 90%, ocorrendo apenas a deleção de dois aminoácidos e algumas poucas substituições em BePAT2 em relação a BePAT1. Esta alta identidade entre elas sugere que estas proteínas exerçam um papel muito semelhante em *B. emersonii*.

4 - Análises evolutivas e de comparação com as proteínas BePAT2 e BePAT1:

Assim como a proteína BePAT1 (Souza e Gomes 1998), a proteína BePAT2 possui todas as regiões conservadas características das ATPases do tipo P, sendo que algumas peculiaridades as agrupam na subfamília IIC (ver introdução). Com a intenção de analisar melhor estas peculiaridades das ATPases de *B. emersonii* de serem mais similares às Na⁺/K⁺ e H⁺/K⁺-ATPases de organismos superiores, decidimos procurar na literatura e no banco de dados a existência de outras proteínas em eucariotos inferiores que teriam, também, maior similaridade com as P-ATPases do tipo IIC. A idéia foi tentar sugerir uma razão para a existência deste tipo de proteína em *B. emersonii* e a sua ausência em outros fungos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa*.

HindIII

-228 aagcttcgataacgc

ttctcggcgccctgtcggctttgcatggccagccgagccacagccacacttgccctgcctctgtcgtcgaac
 gtgtgcccgtttctgcgggtctacctggcggtccttgttgtccctccctataagaaccccgccgccccgctcg
 ccctctctgatccgctcacttacactcaccgcccggtaccgcacccgcactcgtccagcgaccctccacg

ATG CCC AAG GAC AAA CAG AAA AAG GCG ACG AGC CTC GCG CTC GAC GAG CAC CGG 54
 Met Pro Lys Asp Lys Gln Lys Lys Ala Thr Ser Leu Ala Leu Asp Glu His Arg 18

CTG ACG CTC GAC GAG GTG TGC GCG CGG TAC AAG ACG AGC GCC GAC CCG GTG CAC 108
 Leu Thr Leu Asp Glu Val Cys Ala Arg Tyr Lys Thr Ser Ala Asp Pro Val His 36

CCG GCG CAG TCG GCG GTC ACG CCC GAC GAG GCC GCT CGC CGG CTC GCG ACC GAC 162
 Pro Ala Gln Ser Ala Val Thr Pro Asp Glu Ala Ala Arg Arg Leu Ala Thr Asp 54

GGG CCC AAC CTC ATG GCG CCG CCC AAG ACC AAG CAC CCG CTC GTC CGC TAC CTC 216
 Gly Pro Asn Leu Met Ala Pro Pro Lys Thr Lys His Pro Leu Val Arg Tyr Leu 72

GAG TGC CTC CTC GCC CTC TTC AAC TTC CTC CTG CTC GTC GCC GCC GCC TTC ACG 270
 Glu Cys Leu Leu Ala Leu Phe Asn Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Ala Phe Thr 90

TAC CTG CTC TAC GGC CTC GAC CCC GTC AGC AAC TAC GCC AAC ATC TAC ACG GGC 324
 Tyr Leu Leu Tyr Gly Leu Asp Pro Val Ser Asn Tyr Ala Asn Ile Tyr Thr Gly 108

TCG ATC CTC GTC GCC GTC GCC TTC CTC AAC GCC TTC ATC GAG TAC TAC CAG GTC 378
 Ser Ile Leu Val Ala Val Ala Phe Leu Asn Ala Phe Ile Glu Tyr Tyr Gln Val 126

GCC AAG TCC GAG GCC GCT CTG CGC GCC TTC CTCgtacgtttaccgcgctatcgtccgcggtga 442
 Ala Lys Ser Glu Ala Ala Leu Arg Ala Phe Leu 137

tccgaccgaccactcattccccccgatcgtgcgtgcgcgtgtgtagAAC ATG ATC CCC GCC AAC GCC 509
 Asn Met Ile Pro Ala Asn Ala 144

ACG GCC GTG CGC GGC GGC CAG CTC GTC GTC GTC CCC GCC TCG GAC CTC GTC AAG 563
 Thr Ala Val Arg Gly Gly Gln Leu Val Val Val Pro Ala Ser Asp Leu Val Lys 162

GGC GAC GTG GTC TTC GTG CGC ATG GGC GAC AAG GTG CCC GGT GAC GTG TTC CTG 617
 Gly Asp Val Val Phe Val Arg Met Gly Asp Lys Val Pro Gly Asp Val Phe Leu 180

SalI

TTC AAG ACG GCC GAC ATG AAG **GTC GAC** AAC GCG TCG CTG ACG GGC GAG TCG GAG 671
 Phe Lys Thr Ala Asp Met Lys Val Asp Asn Ala Ser Leu Thr Gly Glu Ser Glu 198

CCG CAG GAC CGC TCC CCC GTC AAC ACG CAC GAG GCC GCC CTC GAG GCG ACC AAC 725
 Pro Gln Asp Arg Ser Pro Val Asn Thr His Glu Ala Ala Leu Glu Ala Thr Asn 216

CTC GCC TTC AAC TCG ACG CTC GTC GTG GCC GGC GAG GGA TAC GGA TTC GTG GTG 779
 Leu Ala Phe Asn Ser Thr Leu Val Val Ala Gly Glu Gly Tyr Gly Phe Val Val 234

CGC ACG GGC GAC GAC ACG GTC ATC GGC CAG ATC GCC AAC ATG ACC CAG ACC GAG 833
 Arg Thr Gly Asp Asp Thr Val Ile Gly Gln Ile Ala Asn Met Thr Gln Thr Glu 252

ACC AAG CGC GTG TCG CCG CTC ACC GAG GAG ATC GAG GGC TTC GTC AAG TTC ATC 887
 Thr Lys Arg Val Ser Pro Leu Thr Glu Glu Ile Glu Gly Phe Val Lys Phe Ile 270

GGC TCG CTC GCC GTG CTC TGC GCC ATC ATC TTC TTC ATC ATC GCC CAG GTC AAG 941
 Gly Ser Leu Ala Val Leu Cys Ala Ile Ile Phe Phe Ile Ile Ala Gln Val Lys 288

ACC AAG GAT ATC GGC ATC TCG TTC AAC TTT GCC GTC GGT GTG CTC GTC GCC TGG 995
 Thr Lys Asp Ile Gly Ile Ser Phe Asn Phe Ala Val Gly Val Leu Val Ala Trp 306

GTC CCC GAG GGT CTC CCC GGC ACC GTC ACC ATG CTG CTC ACC ATC GCC GCC AAG 1049
 Val Pro Glu Gly Leu Pro Gly Thr Val Thr Met Leu Leu Thr Ile Ala Ala Lys 324

CGC ATG GCC GGC CAG CAG GTG CTC GTC AAG GAC CTG ACG GGT GTC GAG ACG CTC 1103
 Arg Met Ala Gly Gln Gln Val Leu Val Lys Asp Leu Thr Gly Val Glu Thr Leu 342

GGC GCC ATC ACG CTG CTC GCC ACG GAC AAG ACC GGC ACG CTC ACG CGC AAC CAG 1157
 Gly Ala Ile Thr Leu Leu Ala Thr Asp Lys Thr Gly Thr Leu Thr Arg Asn Gln 360

ATG ACC GTC TCC AAC GTG TGG ACC CAC TTT AAG ACG TTT GCG CTC GTC GCG GAC 1211
 Met Thr Val Ser Asn Val Trp Thr His Phe Lys Thr Phe Ala Leu Val Ala Asp 378

PstI

GTG CGG TCG **CTG CAG** GAC GGC GAG ATC GCC TTC GAC TCG TCG GTC AAG GGG ATC 1265
 Val Arg Ser Leu Gln Asp Gly Glu Ile Ala Phe Asp Ser Ser Val Lys Gly Ile 396

AAC GAC GTG ATG AAC ATC TCG GCG CTG TGC TCG CGC GCG CGG TTC GAC AAC GTC 1319
 Asn Asp Val Met Asn Ile Ser Ala Leu Cys Ser Arg Ala Arg Phe Asp Asn Val 414

AAC GTG CCC ATC GAC CAG CGC GAG ATC ATT GGC GAC GCG ACC GAG TCG GGC CTG 1373
 Asn Val Pro Ile Asp Gln Arg Glu Ile Ile Gly Asp Ala Thr Glu Ser Gly Leu 432

TAC CGC CTC GCC ACG CAG AAG ATC CGC GAT TTC GAC CAG CTC GCC GAC AAG TAC 1427
 Tyr Arg Leu Ala Thr Gln Lys Ile Arg Asp Phe Asp Gln Leu Ala Asp Lys Tyr 450

CCC AAG GTG CTC GAG ATC CCC TTC AAC TCG GAC ACC AAG TGG CAC ATG TCC ATC 1481
 Pro Lys Val Leu Glu Ile Pro Phe Asn Ser Asp Thr Lys Trp His Met Ser Ile 468

CAC AAG ATG GCC CAC GCC AAG GGG CCC TTC ACC ATG TAC ATC AAG GGC GCG CCC 1535
 His Lys Met Ala His Ala Lys Gly Pro Phe Thr Met Tyr Ile Lys Gly Ala Pro 486

GAG CGC GTG CTG CGC ATC TGC TCG ACG ATC CTC GAC GAC AAC GGC GAC ACG ATC 1589
 Glu Arg Val Leu Arg Ile Cys Ser Thr Ile Leu Asp Asp Asn Gly Asp Thr Ile 504

CCG CTC ACG GAC GAG CAC AAG ATC CAG TTC AAC ACG GCC TAC GAG TAC ATG GCG 1643
 Pro Leu Thr Asp Glu His Lys Ile Gln Phe Asn Thr Ala Tyr Glu Tyr Met Ala 522

TCC AAG GGC CAC CGC GTG CTC GCC TTC GCC AAG TTC GAG CTG CCC GGC ACC GAG 1697
 Ser Lys Gly His Arg Val Leu Ala Phe Ala Lys Phe Glu Leu Pro Gly Thr Glu 540

TAC CCC GAG TCG CAC GTC TTC GAC AAG GAC GCC AAG AAC TTC CCG ATG AGC AAC 1751
 Tyr Pro Glu Ser His Val Phe Asp Lys Asp Ala Lys Asn Phe Pro Met Ser Asn 558

CTG ACC TTC GTC GGG CTC GCC TCG CTC GAG GAC CCG CCC AAG CAC GGC GTG CGC 1805
 Leu Thr Phe Val Gly Leu Ala Ser Leu Glu Asp Pro Pro Lys His Gly Val Arg 576

GAG GCC GTC GGC AAC TGC CGC CGC GCC GGC ATC AAG GTC GTC ATG GTC ACG GGC 1859
 Glu Ala Val Gly Asn Cys Arg Arg Ala Gly Ile Lys Val Val Met Val Thr Gly 594

GAC CAC CCG CTC ACG GCC GAG GCC ATT GGC CGC AAG ATC AAC CTC ATG ATT TCG 1913
 Asp His Pro Leu Thr Ala Glu Ala Ile Gly Arg Lys Ile Asn Leu Met Ile Ser 612

BamHI

GAC ACC AAG GAG AAG GTC GCC AAG AAG GCG **GGA TCC** CCC GTC GCC GAC GTG CGC 1967
 Asp Thr Lys Glu Lys Val Ala Lys Lys Ala Gly Ser Pro Val Ala Asp Val Arg 630

GAG GAG GAC GTC AAG GCC ATC GTC ATC CAC GGC GAG AAG ATC GAC TCG CTC ACC 2021
Glu Glu Asp Val Lys Ala Ile Val Ile His Gly Glu Lys Ile Asp Ser Leu Thr 648

GAG GAG GAC TGG GAC ATC ATC TTC TCC AAG GAC GAG ATC ATC TTC GCC CGC ACC 2075
Glu Glu Asp Trp Asp Ile Ile Phe Ser Lys Asp Glu Ile Ile Phe Ala Arg Thr 666

TCG CCC AAG CAC AAG CTC CAG ATC GTC AAG CGC GCC CAG GCC ATG GGC CAC ATT 2129
Ser Pro Lys His Lys Leu Gln Ile Val Lys Arg Ala Gln Ala Met Gly His Ile 684

GTC GGT GTC ACC GGC GAC GGC GT gtacgtgttttctcgcttcgcgtggacttgacgatcacgaga 2195
Val Gly Val Thr Gly Asp Gly Val 692

accgattactcacctgccgtctgccgaatgtagTAAC GAC TCG CCC GCG CTC AAG AAG GCC GAC 2258
Asn Asp Ser Pro Ala Leu Lys Lys Ala Asp 702

NotI

CTC GGT ATC GCC ATG AAC GTG TCC GGG TCC GAC GTG TCC AAG GAG GCG GCC GCC 2312
Leu Gly Ile Ala Met Asn Val Ser Gly Ser Asp Val Ser Lys Glu Ala Ala Ala 720

ATG ATC CTG CTC GAC GAC AAC TTC GCG TCC ATC ATC AAC GGC ATC CGC GAG GGC 2366
Met Ile Leu Leu Asp Asp Asn Phe Ala Ser Ile Ile Asn Gly Ile Arg Glu Gly 738

CGC CTC ATC TTC TTC AAC CTC AAG AAG TCG CTC CGC TAC GTG GTC ACG CAC TCG 2420
Arg Leu Ile Phe Phe Asn Leu Lys Lys Ser Leu Arg Tyr Val Val Thr His Ser 756

ATC CCC GAG GTC CTG CCG CAG CTC CTG TAC GTC GTG GTC CCG CTG CCC GTC GGC 2474
Ile Pro Glu Val Leu Pro Gln Leu Leu Tyr Val Val Val Pro Leu Pro Val Gly 774

PstI

CTC AAC GCC CTG CAG ATC ATC GCC ATC GAT CTC GGC TTC GAG CTG TTC GCC GCG 2528
Leu Asn Ala Leu Gln Ile Ile Ala Ile Asp Leu Gly Phe Glu Leu Phe Ala Ala 792

PstI

CTG TCG TAC GCG TAC GAG CCG CCC GAG TCG GAG ACG CTC ATG AAG CTG CAG CCG 2582
Leu Ser Tyr Ala Tyr Glu Pro Pro Glu Ser Glu Thr Leu Met Lys Leu Gln Pro 810

CGC CGC CCG GTT GAC GGC GAG TCG ATC GAG CAC CTG CGC GCG CGG CGC GAG TTC 2636
Arg Arg Pro Val Asp Gly Glu Ser Ile Glu His Leu Arg Ala Arg Arg Glu Phe 828

GAC AAC CGG TTC AAG AAC TTT GCT GGC GGC GAC ACG ACC GAC GAG AAC GAG ATT 2690
Asp Asn Arg Phe Lys Asn Phe Ala Gly Gly Asp Thr Thr Asp Glu Asn Glu Ile 846

GTG CGT CCG CTG ACG TTC GGC GAG CGC ATG AAG CGG CTC ACG TCG GGC GAG TTC 2744
Val Arg Pro Leu Thr Phe Gly Glu Arg Met Lys Arg Leu Thr Ser Gly Glu Phe 864

TGG TCC AAG TGG GCG TTC GCG TCG GCC GAC GGC GAC ATG CTC GTG GAC TGG AAC 2798
Trp Ser Lys Trp Ala Phe Ala Ser Ala Asp Gly Asp Met Leu Val Asp Trp Asn 882

ACG CTG TCG TGG TCG TAC CTC GAG GCG GGC GTC ATC CAG TAC GTC GGG GCC CAG 2852
Thr Leu Ser Trp Ser Tyr Leu Glu Ala Gly Val Ile Gln Tyr Val Gly Ala Gln 900

ATC GCC TTC TTC GTC GTC TTC TAC ATG TAC CAG ACC AAG GAC AAG GTG CAA CTC 2906
Ile Ala Phe Phe Val Val Phe Tyr Met Tyr Gln Thr Lys Asp Lys Val Gln Leu 918

AAG ATC ACG CCC ACG GAC CTG TTC AAC TGC GCG TCC AAC GAG GGC TGG ACC GGC 2960
Lys Ile Thr Pro Thr Asp Leu Phe Asn Cys Ala Ser Asn Glu Gly Trp Thr Gly 936

AAG AAG AGC TGC ACG CTC GGC AAC GGC ATG GTG TAC TCG GTC GCC GAC CAG AAC 3014
Lys Lys Ser Cys Thr Leu Gly Asn Gly Met Val Tyr Ser Val Ala Asp Gln Asn 954

GAG TCG CTC GCC CAG GCC CAG TCG GTC TGG TTC TTC GGC ATC TTC GTC ATG CAG 3068
 Glu Ser Leu Ala Gln Ala Gln Ser Val Trp Phe Phe Gly Ile Phe Val Met Gln 972

GCG TGG AAC CTC TTC GCG TGC AAG TGC CTC ATG AGT TCG CCC TTT ACG ATG CAC 3122
 Ala Trp Asn Leu Phe Ala Cys Lys Cys Leu Met Ser Ser Pro Phe Thr Met His 990

GTG CTC AAG AAC AAA CAT ACG TTC TCA AGT TTG GTC GGC GGC CTG GCC ATT TCC 3176
 Val Leu Lys Asn Lys His Thr Phe Ser Ser Leu Val Gly Gly Leu Ala Ile Ser 1008

GTG CTC GTG GTG TAC TGT CCC GGC ATC AAC ACG GCG TTC GGC TGC TCG TCC TGG 3230
 Val Leu Val Val Tyr Cys Pro Gly Ile Asn Thr Ala Phe Gly Cys Ser Ser Trp 1026

CTC AAC CCG CTC TAC ATC CTC ATC CCG TTC GGC GTC GGC ATG GTC CTG TTC CTG 3284
 Leu Asn Pro Leu Tyr Ile Leu Ile Pro Phe Gly Val Gly Met Val Leu Phe Leu 1044

TAC GCC GGC CTG CGC CAC TGG ATC AAG ATG CGC TTC AAC CCC ATC AAG TTC AAC 3338
 Tyr Ala Gly Leu Arg His Trp Ile Lys Met Arg Phe Asn Pro Ile Lys Phe Asn 1062

CCC GAG CCG CTC GGC CTC CAG ATG CAC CCG ACC CGC TGG TCG CAC GCG TAGgggg 3393
 Pro Glu Pro Leu Gly Leu Gln Met His Pro Thr Arg Trp Ser His Ala * 1078

Agcgtcggcgggccgcggcgcggtggtcggtatgtggcggtggtgtgttctctcgtcgtttgtttccg
 cggtggcgacgcgcgtcggtcgccctcgcccgctcgcgacccgctgccccaccaagctctttctctatata
 catatacagtagcatcatcatcgattgattgcgctcgacttggcgctcgtggcggaagtgtccatcgtggt
 cagggcagggccatggtcgcgatcgcccacaaaccaacgcgtcgcgcgacgagccagctcgccctggcc
 acttcccgcggtcaaacgctcaaggcccccgcaagccgtgccgttgtggtcagaaatttgttgcgtgaa
 tgctgcggatgggatgccacccttacggacgaagaaggagtcgaccgcccgcgaatcatgtggcgac
 gcgaccaggggacgcgtgcgccacaatagcaagtcccagcatggttctctgctaggtgcaacgggacag
 aaccgttaacgaatgccactaaaatatattgagggagaccgcgcaacaaaggaactcggaatcgcgag
 gaatcagtcaccaatcggaaccatccgattctccatcaccaccgtcttctctcgtcagagccgtcgtctgaa
 ttgggctccgagcccgactcgaggccgtcgtccattgacggaaaatggacgccaatgagcgtggtgggtg
 ccgcattgagaatcgctgcttcgccatcgtaagggagatgcaagtcccgtcaagcagaagctcctcaag
 ggccggtggaagggtgctgagcgaggattcgcgcgccatcgctccgtgatataatattgcgtgacagaatg
 agcaagcgagggtcggtgggcagcgagggcgaggaaggcgaccgcttcgtccgtaacatctgcatccg
 cgagttccagcgactcgaggcgggcgggcatgcaactgcaagtgccggaaccccgcggtgcccatagg
 gctcccgtcaaggttcaagtggagcagcgatgcggcagccgccgaaacatgcacggcgacgtgcggt
 gacagatccgcatccatgagaatcaactgctcaagcccagcaggaaggctccgcgaaatc**gagctc**
 SacI

Figura 8 – Sequência do clone genômico (*HindIII/SacI*) contendo toda a região codificadora do gene BePAT2. Na figura está representada a tradução do quadro aberto de leitura assim como os dois introns e uma parte das regiões 3' e 5' não traduzidas (em letras minúsculas). A figura mostra ainda os sítios para enzimas de restrição (em negrito) que foram usados nas subclonagens.


```

701 KADLGIAMNISGSDVSKEAAAMILDDNFASIINGIREGRLIFFNLKKSL 750
|||||:|||||
700 KADLGIAMNVSGSDVSKEAAAMILDDNFASIINGIREGRLIFFNLKKSL 749

751 RYVVTHSIPEVLPQLLYVVVPLPVGLNALQIIAIDLGFELFAALSYAYEP 800
|||||
750 RYVVTHSIPEVLPQLLYVVVPLPVGLNALQIIAIDLGFELFAALSYAYEP 799

801 PESDTLMKLOPRRPVDESIEHLRARREFDNRFKSLHANADEVDENDLR 850
|||:|||||
800 PESETLMKLOPRRPVDESIEHLRARREFDNRFKNEACGDDENEVR 848

851 QLTFFGERIKRMISGEYWSKWAFATADGEMLVDWNTLSWSYLEAGIIQYLG 900
|||||.|||:|||||.|||:|||||:|||.
849 PLTFGERMKRLISGEFWSKWAFASADGMDLVDWNTLSWSYLEAGVIQYVG 898

901 AQLAFFVVFYMYKDKDGLITPTDLYCASNEGWTGKKCTLGSGLE 950
||:|||||.|||:|||||.|||:
899 AQLAFFVVFYMYQDKDGLITPTDLYCASNEGWTGKKCTLGNGM 948

951 SIDDKESLAQAQSVWFFGIFLMQAWNLFACKCLMTSPFTTHIKNKTT 1000
|:|||||.|||||.|||||.|||||.|||:|||||
949 SVADONESLAQAQSVWFFGIFVMQAWNLFACKCLMSSPFTTHVKNKTT 998

1001 LSLGGLLTLTVIITYPGINTAFGCSALNPLYLLIPFGVGVLFYAGL 1050
|||.|||:|.|||:|||||:|||||
999 LSLVGGLLISVLVITYPGINTAFGCSALNPLYILIPFGVGVLFYAGL 1048

1051 RHWIKMRFSPIKYNPEPLGLQMHPTRWSA 1080
|||||.|||:|||||
1049 RHWIKMRFNPIKFNPEPLGLQMHPTRWSA 1078

```

Figura 9 – Comparação entre as seqüências de aminoácidos deduzidas de BePAT1 e BePAT2. O alinhamento feito utilizando o programa GAP (GCG package) (Henikoff, S. and Henikoff, J. G. ,1992), mostrou que as isoformas possuem uma identidade de 91,28% e uma similaridade de 93,2%. Todas as substituições não conservativas que ocorrem estão marcadas em cinza e as duas deleções que existem em BePAT2 estão em verde. Aminoácidos idênticos estão ligados por um traço e as mudanças conservativas com dois pontos.

Além das ATPases TPA4, TPA5 e TPA7 de *Tetrahymena thermophila* (Wang e Takeyasu, 1997), citadas em Souza e Gomes (1998), onde foram clonadas somente a região que compreende a alça hidrofílica maior (figura 2), apenas a sequência de um gene chamado IonA de *Dictyostelium discoideum* (GI: 1575684) são os representantes de genes presentes em microrganismos que codificam para proteínas similares às Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases. Como a proteína codificada pelo gene IonA não tinha sido analisada detalhadamente, resolvemos incluir a sequência deste gene nas nossas análises. Uma primeira análise que fizemos foi o alinhamento entre as ATPases de *B. emersonii*, a proteína IonA de *D. discoideum*, a Na^+/K^+ -ATPase humana e a H^+/K^+ -ATPase humana (figura 10). A figura destaca as alças transmembranares onde se encontram os resíduos de aminoácidos que coordenam o cátion durante o processo de transporte. Um outro aspecto interessante que podemos ver no alinhamento é uma inserção, nas ATPases de *B. emersonii*, de caráter hidrofílico entre as alças transmembranares M6 e M7. Esta inserção possui cerca de 60 resíduos e seguindo o modelo de 10 alças transmembranares, como o descrito para a SERCA-ATPase, deve estar voltada para o lado citoplasmático da célula. Outras ATPases possuem algumas inserções que estão associadas com a regulação da atividade enzimática. As Ca^{2+} -ATPases de membrana plasmática, por exemplo, possuem uma extensão carboxi-terminal que interage com os domínios catalíticos da enzima, exercendo um efeito inibitório. Este efeito, por sua vez, seria eliminado pela ligação do complexo Ca^{2+} -calmodulina. No caso de postularmos uma função regulatória para a inserção presente nas proteínas de *B. emersonii*, podemos considerar um possível sítio de fosforilação pela proteína quinase A ($^{860}\text{KRMFS}^{864}$) em BePAT1 e ($^{858}\text{KRLTS}^{862}$) em BePAT2, localizado na inserção, que segue bem o consenso para fosforilação por esta quinase descrito na literatura (Krebs e Beavo, 1979). Embora exista um consenso na literatura sobre o controle de outras ATPases como a Na^+/K^+ -ATPase por fosforilação (Cornelius e Logvinenko, 1996), qualquer correlação entre a PKA de *B. emersonii* e as proteínas codificadas pelos genes BePAT1 e BePAT2 é no momento mera especulação.

	1					50
BePAT1	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~M
BePAT2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~M
Na/K-ATPase	~~~~~	~~~~~	~MGKGVGRDK	YEPAAVSEQG	DKKG.KK	GKK
H/K-ATPase	MHQKTPEIYS	VELSGTKDIV	KTDKGDKKEK	Y.....RG	LKNNCLELKK	
IonA	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~
	51					100
BePAT1	AKDKQKKATS	LALDEHRLTL	DEVCAKYKTG	ADAVHPAHST	GLTPDEAARR	
BePAT2	PKDKQKKATS	LALDEHRLTL	DEVCAKYKTS	ADPVHPAQS.	AVTPDEAARR	
Na/K-ATPase	DRDMDELKKE	VSMDDHKLSL	DELHRKYGT.	D..LSR	GLTSARAAEI	
H/K-ATPase	KNHKEEFQKE	LHLDHKLNSN	RELEEKYGT.	D..IIM	GLSSTRAAEL	
IonA	~~~~~ASE	YDVNEHELTL	EQISEKFSTN	INSNDPSLSS	GLTQSLANEL	
	101		M1			150
BePAT1	LAADGPNLMA	PPKTKHP.LL	RYLECLLALF	NFLLLVAAAF	.TYLLYGL..	
BePAT2	LATDGPNLMA	PPKTKHP.LV	RYLECLLALF	NFLLLVAAAF	.TYLLYGL..	
Na/K-ATPase	LARDGPNALT	PPPTT.PEWI	KFCRQLFGGF	SMLLWI.GAI	LCFLAYSIAQ	
H/K-ATPase	LARDGPNSLT	PPKQT.PEIV	KFLKQMVGGF	SILLWV.GAF	LCWIAYGIOY	
IonA	LIRNGKNILK	PPKEV.PWYV	QLGKCFTNFF	MILLEVAGA.	LCFLAYGL..	
	151		M2			200
BePAT1	..DPVSNYAN	IYTGSIILVAV	AFLNAFIEYY	QVAKSEAAALR	AFLDMIPAKA	
BePAT2	..DPVSNYAN	IYTGSIILVAV	AFLNAFIEYY	QVAKSEAAALR	AFLNMIPANA	
Na/K-ATPase	ATEEEPQNDN	LYLGVLVLSAV	VIITGCFSY	QEAQSSKIME	SFKNMVPQQA	
H/K-ATPase	SSDKSASLNN	VYLGCVLGLV	VILTGIFAYY	QEAQSTNIMS	SFNKMIPQQA	
IonA	..DRN.QRVN	LYLACVLYAI	VIFTCLLTFS	QERQTGNIMK	SFKNLLPQSC	
	201					250
BePAT1	TAVRGGQLVV	VPASDLVKGD	VVFVRMGDKM	PADVFLFKTA	DMKVDNASLT	
BePAT2	TAVRGGQLVV	VPASDLVKGD	VVFVRMGDKV	PGDVFLFKTA	DMKVDNASLT	
Na/K-ATPase	LVIRNGEKMS	INAEVVVGD	LVEVKGGDRI	PADLRIISAN	CCRVDNSSLT	
H/K-ATPase	LVIRDSEKKT	IPSEQLVVG	IVEVKGGDQI	PADIRVLSSQ	CCRVDNSSLT	
IonA	RVIRDGSETK	VKVEDIVVGD	IVMCQAGDKV	PADIRIITCN	CMKVDNSSLT	
	251					300
BePAT1	GESEPQDRSP	VNTHEAALEA	TNLAFNSTLV	VAGEGYGIVV	RTGDDTVIGQ	
BePAT2	GESEPQDRSP	VNTHEAALEA	TNLAFNSTLV	VAGEGYGFVV	RTGDDTVIGQ	
Na/K-ATPase	GESEPQTRSP	DFTNENPLET	RNIAFFSTNC	VEGTARGIVV	YTGDRVTMGR	
H/K-ATPase	GESEPQPRSS	EFTHENPLET	KNICFYSTTC	LESTVTGMVI	NTGDRTIIGH	
IonA	GESDAQSCTV	TCTDDNPLET	HNLAFCGTLV	MDCSARGVVI	RTGSNTLIGK	

	301		M3	350
BePAT1	IANMTQ.TET	KRMSPLTEEI	EAFVKFIGSL AVLCAIIFFI	IA.QLKTNDI
BePAT2	IANMTQ.TET	KRVSPLTEEI	EGFVKFIGSL AVLCAIIFFI	IA.QVKTNDI
Na/K-ATPase	IATLASGLEG	GQ.TPIAAEI	EHFIHIITGV AVFLGVSEFI	LSLILEYTWL
H/K-ATPase	IASLASGV.G	NEKTPIAIEI	EHFVHIVAGV AVSIGILFFI	IAVSLKYQVL
IonA	IADLASNTEQ	TETT.LQIEI	KRFVHFITAL GITMGLIFFI	IGFAVGIDSI
	351	M4		400
BePAT1	GISFNFVGV	LVAWVPEGLP	GTVTMLLTIA AKRMAGQQVL	VKDLTGVELT
BePAT2	GISFNFVGV	LVAWVPEGLP	GTVTMLLTIA AKRMAGQQVL	VKDLTGVELT
Na/K-ATPase	E.AVIFLIGI	IVANVPEGLL	ATVTVCCLTLT AKRMARKNCL	VKNLEAVETL
H/K-ATPase	D.SIIFLIGI	IVANVPEGLL	ATVTVTLSLT AKRMAKNCL	VKNLEAVETL
IonA	Q.NLINVLGL	IVANVPEGLP	STITACLTVT ARRLSRRNVY	SKKLESIETL
	401	*		450
BePAT1	GAITLLATDK	TGTLTRNQMT	VSINVWTHFKT FALVADVRSL	QD....GEVA
BePAT2	GAITLLATDK	TGTLTRNQMT	VSINVWTHFKT FALVADVRSL	QD....GEIA
Na/K-ATPase	GSTSTICSDK	TGTLTQNRMT	VAHMMW..FDN QIHEAD..TT	ENQ...SGVS
H/K-ATPase	GSTSIICSDK	TGTLTQNRMT	VAHLW..FDN QIFVAD..TS	EDH...SNQV
IonA	GSITLIASDK	TGTLTQNRMT	VSHMMW..YDN TIVRA....I	ENGGTIGRQL
	451			500
BePAT1	FDSSVKGVD	VMNISALCSR	ARFDKT.... ..NVPMDQRE	IIGDATETGL
BePAT2	FDSSVKGIND	VMNISALCSR	ARFDNV.... ..NVPIDQRE	IIGDATESGL
Na/K-ATPase	FDKTSATWLA	LSRIAGLCNR	AVF....QAN QENLPILKRA	VAGDASESAL
H/K-ATPase	FDQSSRTWAS	LSKIITLCNR	AEF....KPG QENVPIMKKA	VIGDASETAL
IonA	FDIGTPTCAA	LLNVGACCNR	ADFDRLLLEGN MER.PIENRL	IIGDASESAI
	501			550
BePAT1	YRLATQKIRD	FDQLA.DKYP	KVLEIPFNSD TKWHMSIHKM	AHANGS....
BePAT2	YRLATQKIRD	FDQLA.DKYP	KVLEIPFNSD TKWHMSIHKM	AHAKGP....
Na/K-ATPase	LKCIELCCGS	VKEM.RERYA	KIVEIPFNST NKYQLSIHKN	PNTSEPQH..
H/K-ATPase	LKFSEVILGD	VMEI.RKRN	KVAEIPFNST NKYQLSIHE.	..MDDP.HGK
IonA	LRLCHTI.ED	I.EITRAKNP	KVFEIPFNST NKWQLSIHKL	PN.DQPQSNT
	551			600
BePAT1	...FTTFIKG	APERVLRICS	TILDDNGDTI PLTDEHKIQF	NTAYEYMASK
BePAT2	...FTMYIKG	APERVLRICS	TILDDNGDTI PLTDEHKIQF	NTAYEYMASK
Na/K-ATPase	...LLVMKG	APERILDRCS	SIL.LHGKEQ PLDEELKDAF	QNAYLELGGL
H/K-ATPase	RF..LMVMKG	APERILEKCS	TIM.INGEEH PLDKSTAKTF	HTAYMELGGL
IonA	STARILYMKG	APEIIFEKCS	KLM.INGKEL EIDEKIKNDF	IQAYEALGSM

	601				650
BePAT1	GHRVLAFAKF	ELPGTE.YPE	SHVFDEKELKN	FPMAGLTFVG	LASLEDPPKH
BePAT2	GHRVLAFAKF	ELPGTE.YPE	SHVFDDKDAKN	FPMSNLTFVG	LASLEDPPKH
Na/K-ATPase	GERVLGFCHL	FLPDEQ.FPE	GFQFDTDDVN	FPIDNLCFVG	LISMIDPPRA
H/K-ATPase	GERVLGFCHL	YLPADQ.FPE	TYSFDIDAMN	FPTSNLCFVG	LLSMIDPPRS
IonA	GERCLGFAQL	LLDNENTVPN	D.MYDAQTLN	FPMTGLTFVG	LCSLLDPPRE
	651				700
BePAT1	GVREAVGNCR	RAGIKVVMVT	GDHPLTAEAI	GRKINLMI..	SDTKEKVAKK
BePAT2	GVREAVGNCR	RAGIKVVMVT	GDHPLTAEAI	GRKINLMI..	SDTKEKVAKK
Na/K-ATPase	AVPDAVEKCR	SAGIKVIMVT	GDHPITAKAI	AKGVGIISEG	NETVEDIAAR
H/K-ATPase	TVPDAVTKCR	SAGIKVIMVT	GDHPITAKAI	AKSVGIISAN	SETVEDIAHR
IonA	NVPFAVHQCK	TAGIKVIMVT	GDHPITAKAI	AKKVGIIIS..	SPTAEDIALE
	701				750
BePAT1	AGIPVADVRE	EDVKAIVIHG	EKIDSLTEED	WDIIFSK.DE	IIFARTSPKH
BePAT2	AGSPVADVRE	EDVKAIVIHG	EKIDSLTEED	WDIIFSK.DE	IIFARTSPKH
Na/K-ATPase	LNIPVSQVNP	RDACACVVHG	SDLKDMTSEQ	LDDILKYHTE	IVFARTSPQQ
H/K-ATPase	LNIAVEQVNK	RDACAQVVTG	MELKDMSSSEQ	LDEILANYQE	IVFARTSPQQ
IonA	RGIPLSQVDD	NEVKAVVLHG	GQIRELTDAD	WDRVLSK.SE	IVFARTSPQQ
	751				800
BePAT1	KLQIVKRAQA	MGHIVGVTD	GVNDSPALKK	ADLGIAMNIS	GSDVSKEAAA
BePAT2	KLQIVKRAQA	MGHIVGVTD	GVNDSPALKK	ADLGIAMNVS	GSDVSKEAAA
Na/K-ATPase	KLIIIVEGCQR	QGAIVAVTGD	GVNDSPALKK	ADIGVAMGIA	GSDVSKQAAD
H/K-ATPase	KLIIIVEGCQR	QDAVVAVTGD	GVNDSPALKK	ADIGIAMGIA	GSDAAKNAAD
IonA	KSQIVENAQK	RKEVVAVTGD	GVNDSPALKK	ADIGVAMGIV	GSDVAKETAD
	801		M5		850
BePAT1	MILLDDNFAS	IINGIREGRL	IFFNLKKSRL	YVVTHSIPEV	LPOLLYVV..
BePAT2	MILLDDNFAS	IINGIREGRL	IFFNLKKSRL	YVVTHSIPEV	LPOLLYVV..
Na/K-ATPase	MILLDDNFAS	IVTGVEEGRL	IFDNLKKSIA	YTLTSNIPEI	TPFLIFIIAN
H/K-ATPase	MVLLDDNFAS	IVTGVEEGRL	IFDNLKKTIA	YSLTKNIAEL	CPFLIYIIVG
IonA	IILLDDNFAS	IVAGIEEGRI	IFDNLKKSIA	YTLSHAVPEV	APFLLNIISG
	851	M6			900
BePAT1	VPLPVGLNAL	QIIAIDLGE	LFAALSYAYE	PPESDTLMKL	QPRRPVDTES
BePAT2	VPLPVGLNAL	QIIAIDLGE	LFAALSYAYE	PPESDTLMKL	QPRRPVDTES
Na/K-ATPase	IPLPLG..TV	TILCIDLGT	MVPAISLAYE	QAESD.IMKR	QPRNP.....
H/K-ATPase	LPLPIG..TI	TILFIDLGT	IIPSIALAYE	KAESD.IMNR	KPRHK.....
IonA	IPLAIT..SF	LILCIDLGE	MAPAISLAYE	TGEKD.IMSR	KPRVL.....

	901				950
BePAT1	IEHLRARREF	DNRFKSLPAN	ADEV DENDFL	RQLTFGERIK	RMFSGEYWSK
BePAT2	IEHLRARREF	DNRFKNF.AG	GDTT DENEIV	RPLTFGERMK	RLTSGEFWSK
Na/K-ATPase					KT
H/K-ATPase					NK
IonA					GK
	951		M7		1000
BePAT1	WAFATADGEM	LVDWNTLSWS	YLEAGIIQYL	GAQLAFFVVF	YMYKDKDGKS
BePAT2	WAFASADGDM	LVDWNTLSWS	YLEAGVIOYV	GAQIAFFVVF	YMYQTKDKVQ
Na/K-ATPase	DK	LVNERLISMA	YGQIGMIQAL	GGFFTYFVIL	AENG..
H/K-ATPase	DR	LVNQPLAVYS	YLHIGLMQAL	GAFLVYFTVY	AQEG..
IonA	DH	LVTNLLSYS	YLOAGPIEAI	ISFLNFFLVL	AHHG..
	1001				1050
BePAT1	LYITPTDLYT	CAS..NEGWT	GK...KDCTL	GSGLPLSIDD	QKESLA.QAQ
BePAT2	LKITPTDLFN	CAS..NEGWT	GK...KSCTL	GNGMVYSVAD	QNESLA.QAQ
Na/K-ATPase	..FLPIHLLG	LRVDWDDRWI	ND..VE..DS	Y.GQQWT.YE	QRKIVEFTCH
H/K-ATPase	..FLPRTLIN	LRVEWEKDYV	ND..LK..DS	Y.GQEWTRY.	QREYLEWTGY
IonA	..FPPHSLPG	T.....T	NDYFFEGCGK	YLGFE.SDY.	QVEALR.QAQ
	1051	M8		M9	1100
BePAT1	SVWFFGIFLM	QAWNLFACKC	LMTSPFTTHI	FKNKSTLLSL	LGGLILTVII
BePAT2	SVWFFGIFVM	QAWNLFACKC	LMSSPFTMHV	LKNKHTFSSL	VGGLAISVLV
Na/K-ATPase	TAFFVSIVVV	QWADLVICKT	RRNSVFQQGM	.KNKILIFGL	FEETALAAFL
H/K-ATPase	TAFFVGILVQ	QIADLIIRKT	RRNSIFQQGL	FRNKVIWVGI	TSQIIIGLIL
IonA	TAYFMTLVTC	QFFNLITNRT	RVVPLWSHKI	LSNWWYINIGL	VIEAGICAFV
	1101		M10		1150
BePAT1	TYVPGINTAF	GCSY..NLNP	LY..LLIPFG	VGFVLFLYAG	LRHWIKMRFS
BePAT2	VYCPGINTAF	GCSS..WLNP	LY..ILIPFG	VGMVLFLYAG	LRHWIKMRFN
Na/K-ATPase	SYCPGMG..V	ALRMYP.LKP	TWWFCAPPYS	LL..IFVYDE	VR...KL...
H/K-ATPase	SY..GLGSVT	ALSFTM.LRA	QYWFVAVPHA	IL..IWVYDE	VR...KL...
IonA	VYTPFVHTII	ESASVPG..	.FW..AYPLP	MIFCLFSWNE	IR...KR...
	1151		1176		
BePAT1	PIKYNPEPLG	LQMHPTRSA	A~~~~~		
BePAT2	PIKFNPEPLG	LQMHPTRWSH	A~~~~~		
Na/K-ATPase	.I.....	IRRRPGGW.V	EKETYY		
H/K-ATPase	.F.....	IRLYPGSW.W	DKNMYT		
IonA	.I.....	AYDRP.DWKI	SSSLGF		

Figura 10 – Alinhamento entre as seqüências das proteínas BePAT1, BePAT2, Na/K-ATPase Humana subunidade $\alpha 1$, H/K-ATPase Humana e a proteína IonA de *Dictyostelium discoideum*. O alinhamento foi feito usando o programa Pileup (GCG - Genetics Computer Group Package). Os resíduos idênticos estão representados pela mesma cor e as regiões transmembranares estão marcadas em cinza. O resíduo de aspartato que é fosforilado durante o processo catalítico está marcado em amarelo. O alinhamento mostra a inserção presente nas ATPases de *B. emersonii* de aproximadamente 60 resíduos.

Com base na estrutura cristalina obtida para a SERCA-ATPase (Toyoshima *et al.*, 2000) (ver introdução) e em várias evidências bioquímicas obtidas para diferentes P-ATPases, nós alinhamos as regiões transmembranares M4, M5, M6 e M8 (figura 11) da Na^+/K^+ -ATPase, H^+/K^+ -ATPase, SERCA-ATPase, IonA de *Dictyostelium discoideum* e BePAT1 e BePAT2, sendo que estas regiões são idênticas nas duas proteínas de *B. emersonii*. Podemos observar que vários resíduos que foram descritos como importantes para a ligação do cálcio são conservados também nas outras ATPases alinhadas. Podemos destacar os resíduos VA-I-E na transmembrana M4 conservados em todas as proteínas alinhadas, revelando ser um motivo estrutural importante e não um motivo que confere especificidade de íons. Ao contrário, as transmembranas M5 e M6 possuem resíduos que têm fortes evidências de conferir não só especificidade aos cátions transportados pelas diferentes ATPases como também afinidade. Neste caso, quando comparamos enzimas que transportam o mesmo cátion, como as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases. Entre estes resíduos estão destacados na figura os dois resíduos de prolina presentes em M5 em todas as Na^+/K^+ -ATPases descritas e também nas BePAT1/2 e em IonA, enquanto todas as H^+/K^+ -ATPases possuem apenas 1 resíduo.

Como foi dito, evidências bioquímicas e mais recentemente estruturais, revelaram que as transmembranas M5/M6 compõem os sítios de especificidade aos cátions. Resolvemos, então, fazer uma análise evolutiva, utilizando as sequências das transmembranas M5 e M6 de diferentes P-ATPases através do programa "Evolution" do GCG (Genetics Computer Group Package). Este programa alinha diferentes sequências de proteínas e as agrupa de acordo com as suas similaridades construindo um dendograma (figura 12). Como podemos observar, as ATPases de *B. emersonii* e IonA agrupam-se com as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases.

As Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases estão presentes apenas em células animais. De fato, as células animais não possuem parede celular, o que torna necessário um fino controle osmótico para impedir a lise das células. Os fungos de uma maneira geral possuem uma rígida parede celular, entretanto *B. emersonii* possui durante o seu ciclo de vida

M4

SERCA	FKIAVALA VAAI PEGLPA
Na/K	VIFLIGIIVANVPEGLLA
H/K	IIFLIGIIVANVPEGLLA
BePAT1/2	FNFAVGVLVAWVPEGLPG
IonA	LINVLGLIVANVPEGLPS

M5

SERCA	KQFIRYLISS N V G EVVCIFL	TAALGLPEAL	IPVQLLWV N LV T DGLPATALG
Na/K	KKSIAYTL T SN I PEIT P FLI	FIIANIPLPL	GTVTILCIDLGTDMPAISLA
H/K	KKTIAYSL T KNIAEL C PFLI	YIIVGLPLPI	GTITILFIDLGTDIIPSIALA
BePAT1/2	KKSLRYVV T HS I PEVL P QLL	YVVVPLPVGL	NALQIIAIDLGFEFALSYA
IonA	KKSIAYTL S HAV P EV A PFLI	NIISGIPLAI	TSFLILCIDLGTEMAPAISLA

M6

M8

SERCA	TMALSVLVTI E MCNALNSLS
Na/K	HTAFFVSIVVVQWADLVICK
H/K	YTAFFVGILVQQIADLIIRK
BePAT1/2	QSVWFFGIFLMQAWNLFACK
IonA	QTAYFMTLVTCQFFNLITNR

Figura 11 – Alinhamento das regiões transmembranares (M4, M5, M6 e M8) de diferentes tipos de ATPases. As regiões transmembranares foram determinadas pelo alinhamento com a Ca^{2+} -ATPase do tipo SERCA que teve sua estrutura determinada através de cristalografia de raios-X. Estão destacados em vermelho os resíduos que coordenam o cálcio. Em verde podemos ver resíduos que podem estar envolvidos na afinidade pelo K nas Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases. (Jorgensen *et al.*, 1998). Em azul estão destacados os resíduos de prolina que possivelmente estão envolvidos na especificidade das Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases. (Jorgensen *et al.*, 1998).

Figura 12 – Relação evolutiva de BePAT1, BePAT2 e IonA com outras ATPases tipo P eucarióticas. O múltiplo alinhamento e o dendograma foi construído usando o programa “Evolution” (Genetics Computer Group Package) baseado na seqüência de aminoácidos das regiões transmembranares M5/M6 das ATPases de *B. emersonii* e outras 14 P-ATPases obtidas do Banco de dados GenBank. BePAT1, BePAT2 e IonA agrupam com as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases (II). Podemos ver no dendograma o grupo das Ca^{2+} -ATPases (III) e das H^+ -ATPases (I). O número de acesso ao GenBank está mostrado entre parênteses.

uma fase onde as células não possuem parede (o zoósporo), o que explicaria a necessidade de uma ATPase deste tipo. Um suporte para esta idéia foi dado recentemente com a clonagem parcial da ATPase IonA de *D. discoideum* que também apresenta alta similaridade com as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases. Uma vez que este organismo também não possui parede celular na sua fase de crescimento vegetativo, a presença deste tipo de ATPase seria necessária. Outro fato interessante foi a recente caracterização de uma atividade Na^+/K^+ -ATPase, sensível a ouabaina e ao vanadato em *Trypanosoma cruzi* (Caruso-Neves *et al.*, 1998), organismo que também não possui parede celular.

5 - Caracterização do padrão de expressão de BePAT1/2 durante o desenvolvimento de *B. emersonii*:

5.1 - Experimentos de “Northern blot” para determinar os níveis de mRNA dos genes BePAT1/2:

Como mencionado anteriormente, *B. emersonii* possui um interessante ciclo de vida que se caracteriza por dois processos de diferenciação celular: a esporulação e a germinação. Assim, a regulação da expressão dos genes BePAT1/2 ao longo do desenvolvimento deste fungo pode nos fornecer pistas sobre o papel fisiológico das proteínas correspondentes neste microrganismo. Com o intuito de verificar se os genes BePAT1/2 de *B. emersonii* sofrem regulação durante o processo de diferenciação, extraímos RNA total de células isoladas durante vários estágios do desenvolvimento do fungo. Experimentos de “Northern blot” foram realizados utilizando estes RNAs e o que verificamos foi que os genes que codificam estas ATPases sofrem uma forte indução durante a fase de esporulação (aumento de cerca de 4 vezes), atingindo níveis máximos no zoósporo, enquanto na germinação o mRNA está praticamente ausente (figura 13). É importante salientar que a sonda utilizada nos experimentos de “Northern blot” foi o fragmento *Pst*II/*Bam*HI (figura 5) que não discrimina entre os dois genes. Tentamos utilizar sondas específicas para os genes BePAT1 e BePAT2, como a sonda 5'-BePAT2 (figura 5), mas não conseguimos nenhum resultado. O experimento de

Figura 13 – Análise dos níveis de mRNA dos genes BePAT1/2 durante o desenvolvimento de *B. emersonii*. RNA total (15 μ g) extraído de células sincronizadas de diferentes estágios do ciclo de vida de *B. emersonii* foi submetido a eletroforese em gel de formaldeído-agarose (item 21 de materiais e métodos) transferido para uma membrana de náilon (Hybond-N⁺) e hibridado com a sonda *PstI/BamHI* (painel A) ou com uma sonda correspondente ao cDNA codificando para β MPP de *B. emersonii* (painel B) (Rocha e Gomes, 1998). Os números no alto da figura indicam o tempo em minutos durante o desenvolvimento (esporulação ou germinação) e no zoósporo (Z). O painel C mostra o resultado da densitometria do autorradiograma do painel A normalizado com os valores obtidos no painel B.

Northern mostrado na figura 13 sugere que as proteínas BePAT1/2 possam ter um papel importante durante o processo de esporulação ou nos zoósporos, célula atípica não comum às classes de fungos como os ascomicetos à qual pertence a levedura *S. cerevisiae*.

5.2 - Obtenção de um anti-soro policlonal anti-BePAT1/2:

Para determinarmos se o aumento dos níveis do mRNA de BePAT1/2 refletem num aumento da síntese e dos níveis das proteínas, tornou-se necessária a obtenção de um anti-soro policlonal específico contra as proteínas BePAT1/2. Para tanto expressamos um fragmento do gene BePAT1 que compreende os nucleotídeos 1056 a 2081, os quais codificam a região da proteína que vai do motivo conservado DKTGT até o motivo GDGVND (ver figura 2). Esta região compreende parte da alça hidrofílica maior que é bastante conservada entre os dois genes. O fragmento do gene BePAT1 foi obtido por PCR através do qual introduzimos um sítio *HindIII* a 5' do fragmento e um sítio *EcoRI* a 3' do fragmento. Estes sítios foram usados para a clonagem em um vetor de expressão (pTRCHis) que produz uma proteína de fusão contendo uma sequência de seis histidinas na região aminoterminal da proteína de interesse. A proteína de fusão, de aproximadamente 45 kDa, foi produzida em *E. coli*, purificada a partir de corpos de inclusão e injetada em um coelho para a produção de um anti-soro policlonal, conforme descrito em Materiais e Métodos.

Para verificarmos se o soro produzido reconhecia as ATPases de *B. emersonii*, vale lembrar que as proteínas são praticamente idênticas (figura 9), nós realizamos primeiramente um fracionamento de extratos de zoósporos por ultracentrifugação seguido de tratamento com carbonato de sódio 0,1 M pH 11 (Na_2CO_3) que solubiliza proteínas periféricas mas não as integrais de membrana (Fujike *et al.*, 1982). O experimento consistiu em submeter a ultracentrifugação o extrato total de zoósporos a 100.000xg e tratar o precipitado resultante com Na_2CO_3 . A mistura foi então novamente centrifugada. Aliquotas de cada etapa do fracionamento foram resolvidas em gel de poliacrilamida-SDS e submetidas a Western blot utilizando o anti-soro anti-BePAT1/2. O resultado (figura 14) mostrou que o anti-soro produzido reconhecia uma proteína integral de membrana, que é encontrada na fração particulada mesmo após o tratamento com Na_2CO_3 , de aproximadamente 119 kDa, compatível com a massa molecular calculada para as proteínas deduzidas a partir dos genes BePAT1 e BePAT2.

Figura 14 – Localização subcelular das ATPases BePAT1/2 de *B. emersonii*. “Western blot” de extratos de proteína de zoósporos rompidos por congelamento seguindo-se ressuspensão em tampão de lise (item 10 de materiais e métodos) resultando em um extrato bruto de proteínas. Este extrato bruto foi submetido a ultracentrifugação dando origem a uma fração solúvel (sbr. 100.000 xg) e uma insolúvel (ppt. 100.000 xg). A fração insolúvel foi tratada com Na₂CO₃ 0,1 M e submetida a uma nova ultracentrifugação da qual resultaram duas novas frações: fração solúvel (sbr. Na₂CO₃) e fração insolúvel (ppt. Na₂CO₃). Quantidades iguais de proteínas foram aplicadas em cada canaleta (15 µg) seguindo-se eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS e “Western blot” utilizando o soro anti –BePAT1-His em uma diluição de 1:500.

5.3 - Análise da síntese e do acúmulo das proteínas BePAT1/2 durante o desenvolvimento de *B. emersonii*:

Com o anti-soro em mãos nós analisamos se a síntese das proteínas BePAT1/2 seguia o padrão da transcrição dos respectivos genes. Para tanto realizamos experimentos de imunoprecipitação utilizando extratos de células que foram marcadas com pulsos de ^{35}S -metionina durante o desenvolvimento do fungo. Um dos resultados obtidos está mostrado na figura 15, onde podemos observar que a síntese de BePAT1/2 é fortemente induzida durante a esporulação, como acontece com a transcrição do gene. Podemos verificar também que no final da esporulação não ocorre marcação, o que reflete o bloqueio da síntese de proteínas nos zósporos (ver introdução). Podemos observar também um aumento repentino na síntese da proteína aos 30 minutos da germinação. Para confirmar estes resultados novas células foram preparadas e os experimentos de imunoprecipitação com os extratos de células marcadas durante a esporulação e a germinação foram feitos separadamente. Os resultados obtidos (não mostrados) confirmaram o resultado mostrado na figura 15.

Partimos então para o estudo do acúmulo de BePAT1/2 durante o desenvolvimento de *B. emersonii* utilizando o mesmo anti-soro em “Western blot”, e o resultado (figura 16) mostrou que a quantidade em massa das ATPases aumenta gradativamente durante o processo de esporulação alcançando níveis máximos entre 180 e 210 minutos após o carenciamento das células. Estes experimentos foram repetidos por mais duas vezes e os resultados foram os mesmos. O aumento nos níveis de mRNA refletiram num aumento da síntese e no acúmulo das ATPases indicando que o controle da expressão destes genes seja pré-traducional, provavelmente devido a um aumento na transcrição destes genes durante a fase de esporulação.

Figura 15 - Síntese de BePAT1 e BePAT2 durante os processos de esporulação e germinação. **A** -Autorradiograma dos extratos protéicos de células marcadas com pulsos de ^{35}S -metionina após imunoprecipitação com anticorpo anti-BePAT1-His e eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida. Os números no alto da figura indicam os tempos de marcação. 1- Células marcadas de 0 –15 min após indução da esporulação (ver item 11 e 12 de materiais e métodos), 60-75min; 120-135; 150-165; 165-180; 180-195; 195-210; 210-225; 0- 10 minutos após inoculação em solução de germinação. 10-20; 20-30; 30-40; 40-50. **B** - Densitometria do autorradiograma mostrado em A, revelando um aumento relativo de síntese de aproximadamente 7 vezes durante a esporulação do fungo. Podemos notar que nos zoósporos como não ocorre síntese protéica a marcação de BePAT1/2 é praticamente zero.

Figura 16 – Análise do acúmulo das ATPases BePAT1/2 ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*. **A** – Aliquotas da fração particulada dos extratos de células isoladas em diferentes estágios do desenvolvimento de *B. emersonii* foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) e as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. Esta membrana foi incubada com o soro policlonal anti-BePAT1-His e revelado por quimiluminescência (item 24 de materiais e métodos). Os números no alto da figura indicam o tempo em minutos durante o desenvolvimento (esporulação ou germinação) e no zoósporo (Z). **B** – Densitometria do autorradiograma mostrado em A revelando um aumento relativo de BePAT1/2 de aproximadamente 2,5 vezes durante a esporulação.

6 - Imunolocalização das ATPases de *B. emersonii*:

Várias P-ATPases foram descritas estarem associadas a membranas internas das células, um exemplo clássico são as ATPases do tipo SERCA que captam cálcio do citoplasma para o interior do retículo endoplasmático em células musculares. Para verificarmos se as ATPases de *B. emersonii* estavam na membrana plasmática das células ou em alguma membrana interna realizamos experimentos de imunolocalização. Os experimentos mostraram que as ATPases BePAT1/2 localizam-se na membrana plasmática dos zoósporos (figura 17).

7 - Expressão diferencial dos genes BePAT1 e BePAT2 durante a esporulação de *B. emersonii* :

Para avaliarmos a expressão diferencial de cada um dos genes BePAT1 e BePAT2 isoladamente realizamos experimentos de RT-PCR. Primeiramente 2 oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir da região 3' não traduzida dos genes BePAT1 e BePAT2 além de um oligonucleotídeo complementar a uma sequência dentro da região codificadora idêntica nos dois genes. O resultado mostrou que em zoósporos o gene BePAT1 é o gene mais expresso (figura 18). Para avaliarmos se isto ocorria também nas outras fases do ciclo e levando-se em consideração que os experimentos de RT-PCR não são quantitativos, procuramos na literatura algumas referências sobre RT-PCR semiquantitativo (Brucato *et al.*, 2000). Verificamos que devíamos encontrar uma condição onde a amplificação dos genes não atingisse a saturação e a melhor maneira de determinar esta condição seria variar o número de ciclos utilizados nos experimentos de PCR.

A figura 19 mostra resultados em que RNA total extraído de células de diferentes fases do ciclo de vida do fungo foi utilizado em uma reação de RT-PCR (Kit "ACCESS RT-PCR SYSTEM" PROMEGA®). Podemos verificar que os genes possuem uma expressão diferencial ao longo do desenvolvimento de *B. emersonii*. O experimento evidencia a dependência do número de ciclos de PCR para as reações serem semi-quantitativas, vale salientar que como o mRNA para os genes varia bastante ao longo da esporulação, o número de ciclos pode ser saturante para algumas fases e não para outras, sendo que o perfil de indução durante o processo de esporulação pode ser melhor visualizado quando utilizamos 20 ciclos de PCR.

Figura 17 – Imunolocalização das ATPases BePAT1/2 de *B. emersonii* por imunofluorescência confocal. Zoósporos de *B. emersonii* foram fixados e incubados (item 25 de materiais e métodos) na ausência (A e B) ou na presença (C e D) do antisoro anti-BePAT1-His seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado com Fluoresceína (FITC). A mesma lâmina foi observada por microscopia de contraste de fase (A e C) ou por imunofluorescência (B e D) utilizando-se microscopia confocal a laser. Não se observou fluorescência no experimento controle (B). Fluorescência intensa foi observada na membrana plasmática dos zoósporos (D). As imagens foram feitas utilizando uma objetiva de 40X e uma lente de 10X perfazendo um total de 400X. O tamanho dos zoósporos é de aproximadamente 8 μm .

Figura 18 – Experimento de RT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes BePAT1 e BePAT2. Cerca de 1 µg de RNA total isolado de zoósporos foi utilizado em uma reação com a transcriptase reversa e os cDNAs resultantes foram usados como molde para reações de PCR. Os fragmentos de DNA obtidos foram resolvidos em gel de agarose 1,8%. O experimento mostra que em zoósporos apenas o mRNA para o gene BePAT1 pode ser detectado nas condições utilizadas. O experimento de RT-PCR mostrado não é quantitativo, mas mostra que o gene BePAT1 em zoósporos é mais expresso do que o gene BePAT2. A canaleta M representa o marcador de tamanho molecular 100 pb da GIBCO-BRL. As canaletas sem a transcriptase reversa servem para mostrar que o RNA utilizado não está contaminado com DNA.

Figura 19 – Experimentos de RT-PCR semiquantitativo utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes BePAT1 e BePAT2. 1 µg de RNA total extraído de células em diferentes tempos da esporulação, foi utilizado em uma reação com a transcriptase reversa e o cDNA resultante foi usado como molde para reações de PCR. Após amplificação os fragmentos de DNA foram resolvidos em gel de agarose 1,8%. Reações sem a transcriptase reversa foram corridas em paralelo e demonstraram que o RNA utilizado está isento de DNA. O fragmento amplificado de BePAT1 possui 450 pares de base e o de BePAT2 350 pares de base. Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos foram rtbata1 específico para o gene BePAT1 (5'GCG CGC ACG CAT ACG TGC3') e o rtbepat2 específico para o gene BePAT2 (5'CGC CGA CGC TCC CCC TAC3') e o oligonucleotídeo COMP comum aos dois genes (5'CTG GTT CTT CGG CAT CTT C 3').

Os resultados foram interessantes e para comparar melhor a expressão diferencial entre os dois genes fizemos uma reação de RT-PCR "multiplex" (Verma e Upadhyaya, 1998), onde obtivemos o produto de amplificação para os dois genes em um mesmo tubo. Além disto o oligonucleotídeo comum funcionou como competidor na reação de PCR o que levou a uma amplificação mais eficiente do gene que estava mais expresso naquela determinada fase do ciclo (figura 20).

Os resultados obtidos no experimento de RT-PCR multiplex confirmaram aqueles obtidos pelo RT-PCR semiquantitativo. O mRNA do gene BePAT2 é induzido durante a esporulação e desaparece rapidamente no zoósporo. O mRNA para o gene BePAT1 também é induzido na esporulação porém mais tardiamente, o que nos sugere que o aumento acentuado na síntese da proteína durante a esporulação é provavelmente devido às duas isoformas. Um outro aspecto interessante a ser observado é a estabilidade dos mRNAs para os dois genes. O desaparecimento brusco do mRNA para BePAT2 sugere um controle na estabilidade do mRNA. O zoósporo não sintetiza RNA ou proteína (ver introdução) e, portanto, os mRNAs estariam mais susceptíveis à degradação nesta fase do ciclo. Um outro aspecto a ser observado é a presença de um intron no início da região codificadora de BePAT2 que não está presente em BePAT1. Em sistemas eucarióticos, foi descrita a regulação de genes através da elongação do mRNA e que os sítios que bloqueiam a elongação geralmente estão presentes no início do gene e no caso do gene *c-myb* em *Xenopus*, este sinal está presente no primeiro intron (Yuan, W., 2000). Este tipo de controle poderia explicar o rápido desaparecimento do mRNA de BePAT2.

Como dito anteriormente, a existência de isoformas para P-ATPases é comum entre os organismos. Entretanto, não só as P-ATPases possuem isoformas, mas várias proteínas são conhecidas por serem codificadas por famílias multigênicas. De uma maneira geral, acredita-se que as isoformas são derivadas de duplicação gênica ou de uma mudança na ploidia durante a evolução. Em muitos casos, os genes múltiplos codificam proteínas com características biológicas distintas, como as hemoglobinas fetal e adulta (Bunn e Forget, 1986). Em outros casos, os genes codificam proteínas que não tem nenhuma diferença biológica significativa, como por exemplo, proteínas miofibrilares dos músculos esquelético e cardíaco (Kedes e Stockdale, 1989).

Figura 20 – Experimento de RT-PCR multiplex utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes BePAT1 e BePAT2. de RNA total (1 µg) foi utilizado em uma reação com a transcriptase reversa e os cDNAs resultantes foram usados como molde para reações de PCR. Após amplificação os fragmentos de DNA foram resolvidos em gel de agarose 1,8%. O experimento foi realizado essencialmente como descrito na figura 19, exceto que as reações de transcrição reversa e de amplificação por PCR para os dois genes foram feitas em um mesmo tubo. Os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos foram *rtbeta1* específico para o gene BePAT1 (5'GCG CGC ACG CAT ACG TGC3') e o *rtbepat2* específico para o gene BePAT2 (5'CGC CGA CGC TCC CCC TAC3') e o oligonucleotídeo COMP comum aos dois genes (5'CTG GTT CTT CGG CAT CTT C 3').

Um dado interessante encontrado na literatura, é que a maioria das famílias multigênicas possui uma regulação não coordenada. Este fato levou os pesquisadores que estudam o desenvolvimento a especular que a vantagem evolutiva das famílias multigênicas é poder simplificar o controle da expressão gênica. Os múltiplos genes seriam regulados por promotores específicos que respondem a diferentes estímulos em diferentes tipos celulares. Durante a esporulação, ocorre uma intensa mudança no perfil de transcrição e de tradução, provavelmente, devido a diferentes fatores de transcrição que são responsáveis pela expressão de genes importantes para o processo de diferenciação neste organismo. As ATPases BePAT1 e BePAT2 de *B. emersonii* são praticamente idênticas, entretanto possuem uma expressão não coordenada ao longo do ciclo de vida do fungo. Esta expressão diferencial poderia atuar como uma pressão seletiva para a manutenção de dois genes que codificam proteínas tão semelhantes.

8 – Expressão heteróloga da proteína BePAT1 em *S. cerevisiae* :

Um dos objetivos do projeto foi a caracterização da atividade das ATPases de *B. emersonii*. A primeira estratégia utilizada foi a expressão heteróloga destas ATPases em levedura, o que já havia sido feito para outras ATPases, tal como para a Ca^{++} -ATPase de retículo sarcoplasmático de coelho, entre outras (Reis E.M.R. *et al.*, 1999; Centeno, *et al.*, 1994). Inicialmente realizamos a varredura de uma biblioteca de cDNA de *B. emersonii* e isolamos um clone positivo cuja digestão com *EcoRI* revelou um fragmento de aproximadamente 1,6 kb (figura 21). Este cDNA foi clonado no vetor SK (STRATAGENE) e totalmente seqüenciado. A análise da seqüência mostrou que o cDNA era referente ao gene BePAT1. Como o cDNA continha apenas parte do gene, foi necessário fazer uma construção onde o cDNA foi fundido com a região 5' do correspondente clone genômico. Para tanto fizemos uma digestão parcial com as enzimas *AatII* e *HindIII* (necessária devido a presença de dois sítios de restrição para *AatII*. Ver figura 22) e obtivemos um fragmento de aproximadamente 5 kb que continha todo o vetor (SK) e a região 5' do clone genômico. Este fragmento foi ligado ao cDNA digerido com as enzimas *AatII* e *HindIII* (sítio do vetor). Assim obtivemos o

gene BePAT1 completo sem o intron. A figura 22 mostra um esquema dos passos de clonagem. Esta construção (BePAT1 sem o intron) foi utilizada para expressão desta ATPase em levedura, entretanto não obtivemos sucesso nesta abordagem. Testamos várias construções e vários plasmídeos com diferentes promotores e em todos os casos não conseguimos detectar a proteína BePAT1 em levedura. Existem, pelo menos, duas razões para o insucesso desta abordagem. Uma possibilidade é que os códons preferenciais de *B. emersonii* possuem G ou C na terceira base, enquanto o de *S. cerevisiae* possuem A ou T. Esta diferença poderia dificultar a expressão de BePAT1. Outra razão é que proteínas estranhas ou mesmo mRNAs estranhos podem ser instáveis no organismo em que buscamos fazer a expressão heteróloga. Entretanto outras tentativas devem ser feitas para descartarmos totalmente esta abordagem.

9 - Caracterização da atividade das ATPases de *B. emersonii* purificadas por gradiente de sacarose:

Uma outra abordagem utilizada para caracterizar as atividades das ATPases de *B. emersonii* foi a purificação parcial a partir de zoósporos. Primeiramente, frações contendo membrana de zoósporos foram aplicadas em um gradiente descontínuo de sacarose (18 a 60%) seguido de ultracentrifugação. Nos primeiros experimentos tivemos problemas em detectar uma atividade ATPásica que fosse inibida por vanadato. Para resolvermos este problema, incubamos as frações antes de realizar o ensaio de atividade com DOC 0,065% (Desoxicolato). Este tratamento brando com o detergente nos permitiu visualizar uma atividade ATPásica que era bastante inibida por vanadato. O que estava acontecendo é que, quando isolamos as membranas pelo gradiente de sacarose elas tendem a formar vesículas que são seladas e impedem o acesso do inibidor e dos íons aos seus sítios de ligação. Um outro problema que enfrentamos foi que nos ensaios de atividade realizados, estávamos usando carvão ativado ressuspense em TCA (ácido tricloroacético) para parar a reação de hidrólise, mas o branco (sem extrato) estava com valores muito altos. Quando trocamos o TCA por HCl tivemos então experimentos mais reprodutíveis.

Figura 21 - Varredura de uma biblioteca de cDNA construído em λ gt11. A biblioteca utilizada foi construída a partir de mRNA isolado de células de 2 horas de esporulação e analisada usando como sonda o fragmento *PstI/BamHI* mostrado na figura 5A. (A) - isolamento do clone positivo e (B) - amplificação do sinal. No painel C está representado a digestão com *EcoRI* do DNA isolado do lambda e o mapa de restrição obtido por sequenciamento parcial do clone. Canaleta 1: DNA do clone cDNA digerido com *EcoRI*; canaleta 2: marcador de tamanho molecular 1kb (GIBCO BRL).

Figura 22 – Construção do clone BePAT1 sem intron. Esquema representando a sequência de clonagens para retirada da região 5' não codificadora do gene BePAT1 e posterior clonagem em vetores de expressão em levedura. Ver detalhes no texto.

Figura 23 – Purificação parcial da ATPase de *Blastocladiella* em gradiente de sacarose. **A-** Aliquotas das frações do gradiente foram resolvidas em gel de poliacrilamida/SDS. Após eletroforese as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose que foi incubada com anticorpo anti-BePAT1 e revelada com anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase. **B-** Atividade P-ATPásica (atividade total menos a atividade inibida por vanadato) medida nas diferentes frações. Os experimentos foram feitos em duplicata.

Depois dos problemas sanados realizamos ensaios de atividade e experimentos de “Western blot” com as frações do gradiente. Os experimentos revelaram a presença de uma atividade ATPásica do tipo P (atividade total menos a atividade na presença de vanadato que é um inibidor específico das ATPases do tipo P) que acompanhava a distribuição das proteínas BePAT1/2 determinada por Western blot (figura 23). Em seguida fizemos experimentos para verificar se tínhamos presente nas frações do gradiente uma Ca^{2+} -ATPase (figura 24). Verificamos que a atividade ATPásica na fração 10 era inibida cerca de 80% por vanadato e cerca de 35% por EGTA (quelante de cálcio). Em seguida partimos para verificar se na presença de EGTA tínhamos uma atividade inibida por vanadato e estimulada por diferentes concentrações de íons Na e K, bem como a influência de ouabaina (5mM), um conhecido inibidor específico das Na^+/K^+ -ATPases. Observamos que não houve variação significativa na atividade que é inibida por vanadato quando variamos as concentrações de Na^+/K^+ (0/0; 150/0; 120/30; 90/60; 60/90; 30/120; 0/150). Verificamos também que a adição de ouabaina não afeta significativamente a atividade e que o vanadato como no experimento anterior inibiu cerca de 80% da atividade presente na fração (figura 25).

Figura 24 – Atividade ATPásica (nmol de Pi) medida na fração 10 utilizando 500µM de ATP. A figura mostra que a atividade na presença de vanadato (Na_3VO_4) (■) foi de apenas 17% da atividade na presença de Ca^{++} (500µM) (▲). O EGTA (●) inibiu cerca de 35% da atividade. Os valores mostrados no gráfico representam a média de duplicatas. As atividades foram feitas como descrito no item 37 de Materiais e Métodos.

Figura 25 – Influência de diferentes concentrações de Na e K na atividade ATPásica presente na fração 10, utilizando 500 μ M de ATP. (●) controle; (▲) ouabaina 5mM; (■) vanadato (Na_3VO_4) 1mM; (□) Atividade controle menos a atividade na presença de vanadato 500 μ M (atividade P-ATPásica). Os experimentos foram realizados em duplicatas. As atividades foram determinadas como descrito no item 37 de Materiais e Métodos.

Decidimos então testar os efeitos dos íons separadamente. Resultados da literatura (Hermsen, *et al.*, 1999) mostravam que a estimulação da atividade de H/K-ATPase gástrica por íons K que é da ordem de 50%, só era observada quando os ensaios de atividade eram realizados com concentrações baixas de ATP (em torno de 10 μ M). Segundo os autores, devido à presença de uma alta atividade ATPásica, mesmo na ausência de íons, quando eram usadas altas concentrações de ATP. Verificamos, então se o ATP estando em uma concentração de 10 μ M não seria consumido completamente durante o tempo que estávamos usando para o ensaio (5 min) (figura 27).

Figura 27 – Atividade ATPásica (nmol de Pi) da fração 10 determinada com baixas concentrações de ATP (10 μ M). A figura mostra que a atividade na presença de vanadato 500 μ M (Na₃VO₄) (■) foi também de aproximadamente 17% da atividade na presença de Ca⁺⁺(500 μ M) (▲). O EGTA (●) inibiu novamente em torno de 35% da atividade. Os valores mostrados no gráfico representam a média de duplicatas. Podemos verificar que a atividade foi cerca de 10 vezes mais baixa do que a atividade na presença de 500 μ M de ATP. As atividades foram determinadas como descrito no item 37 de Materiais e Métodos.

Verificamos que em 5 minutos de incubação apenas 30% do ATP total da reação (1 nmol) tinha sido consumido e a atividade total era cerca de 10 vezes mais baixa do que na presença de 500 μ M de ATP. Realizamos então um experimento onde variamos a concentração de íons Na, K e Na/K (figura 28). Entretanto, não observamos nenhuma estimulação da atividade por estes íons, somente uma inibição em altas concentrações de Na (>50 mM). Portanto, não foi possível demonstrar que existe uma atividade de Na⁺/K⁺-ATPase em frações de membrana de zoósporos. Isto não significa porém, que ela não exista. Talvez a atividade seja baixa em relação a outras atividades P-ATPásicas. Uma possibilidade seria a presença de uma H⁺-ATPase por exemplo, embora Van Brunt *et al.* (1982) não tenham conseguido demonstrar este tipo de atividade em *Blastocladiella*. Vale salientar também, que *D. discoideum* foi considerado isento de uma atividade de Na⁺/K⁺-ATPase, apesar do gene IonA codificar uma proteína muito similar a esta classe de proteínas (Zhou e Fambrough, 1999).

Figura 28 – Influência de diferentes concentrações de Na e K na atividade ATPásica presente na fração 10, utilizando 10 μ M de ATP. A atividade P-ATPásica (atividade total menos a atividade na presença de vanadato).foi determinada na presença de NaCl (A), KCl (B) e Na/K (C) Ver detalhes no texto.As reações foram feitas como descrito no item 37 de Materiais e Métodos.

10 - Caracterização da atividade das ATPases de *B. emersonii* solubilizadas em $C_{12}E_8$:

Como os experimentos anteriores não estavam respondendo às nossas questões sobre a existência de uma atividade de Na^+/K^+ -ATPase em *B. emersonii*, resolvemos caracterizar a atividade ATPásica em frações de membrana de zoósporos solubilizadas com um detergente não iônico ($C_{12}E_8$), que já havia sido demonstrado ser capaz de solubilizar outras ATPases, sem prejuízo para suas atividades (Esmann e Skou, 1984; Lacapère *et al.*, 2000). Realizamos experimentos variando o pH e o tempo de incubação da reação (figura 29). A fração de membrana solúvel em $C_{12}E_8$ mostrou-se muito enriquecida em atividade P-ATPásica, já que a atividade na presença de vanadato foi quase inexistente. Verificamos novamente que a atividade não foi influenciada por nenhum íon, e que o pH ótimo da atividade foi em torno de 6,5. Estes resultados pareciam sugerir que a atividade principal presente na fração de membrana de *B. emersonii* seria devido a uma H^+ -ATPase, embora como mencionado anteriormente, experimentos feitos na década de 80 sugeriam que *B. emersonii* não possuía uma H^+ -ATPase. Entretanto mais experimentos são necessários para comprovar a presença de uma H^+ -ATPase em *B. emersonii*, como por exemplo a clonagem do gene.

Verificamos também a influência de diferentes concentrações de KCl na atividade da proteína solúvel antes e após imunoprecipitação com o anti-soro BePAT1 e não observamos qualquer alteração na atividade P-ATPásica.

Figura 29 – Atividade ATPásica determinada com a proteína solubilizada da membrana de zoósporos na presença de 500 μ M de ATP. A – Porcentagem da atividade medida em função do tempo, mostrando que a enzima permanece ativa após 5 minutos de incubação a 37°C. B – Influência do pH na atividade ATPásica mostrando um pH ótimo de 6,5. Nos dois gráficos podemos observar uma inibição de quase 100% da atividade na presença de vanadato (Na_3VO_4). (■) controle contendo apenas o tampão de reação descrito no item 37 de materiais e métodos. (▲) adição de KCl 1mM. (●) adição de vanadato 500 μ M. (○) adição de KCl 1mM e de vanadato 500 μ M.

As ATPases do tipo P se interconvertem (ver introdução) em uma forma fosforilada e uma desfosforilada. É sabido que estas ATPases têm a capacidade de ligar ATP, mas a hidrólise só acontece na presença do íon ligante, ou seja, a reação de fosforilação/desfosforilação, a ligação e o transporte de cátions estão intimamente acoplados (Pedersen e Carafoli, 1987). Com base nesta característica resolvemos estudar como os íons Na e K influenciam a formação da fosfoenzima BePAT1/2-P. Um experimento foi então realizado para observar a influência do Na, K, Ca, pH e vanadato na formação de fosfoenzima utilizando a enzima solubilizada. Verificamos a presença de uma única banda fosforilada e que a formação desta fosfoenzima foi independente e insensível a qualquer dos íons testados (figura 30). Podemos verificar também que o pH influenciou o grau de inibição por vanadato, sendo que nos experimentos realizados a pH 6,0 o grau de inibição foi maior do que quando os experimentos foram realizados a pH 7,0. O gel contendo as proteínas marcadas foi transferido para uma membrana de nitrocelulose e a radioatividade continuou incorporada. Esta mesma membrana foi utilizada em um experimento de “Western blot”. A proteína fosforilada parecia estar um pouco acima da proteína BePAT1 revelada pelo anticorpo, mas não conseguimos ter certeza neste experimento se a proteína fosforilada trata-se ou não de BePAT1/2.

Figura 30 – Formação de fosfoenzima na fração de membrana de zoósporos solubilizada com $C_{12}E_8$. As setas indicam uma banda indicada como fosfoenzima. A presença dos íons Na (100mM), K (100mM) e Ca (1mM) está indicada no alto da figura. Está indicada também a presença do inibidor vanadato e de EGTA (quelante de cálcio)

Um outro aspecto abordado foi investigar se a atividade ATPásica era influenciada por compostos redutores como DTT. Na literatura, existe relato de uma cobre-ATPase de fígado de rato que é estimulada por cobre apenas quando está presente no meio um agente redutor (Takeda, *et al.*, 1999). Testamos a influência do DTT na atividade P-ATPásica em membrana de zoósporos na presença e na ausência de diferentes íons, mas nenhum efeito foi observado (dados não mostrados).

Em *Blastocladiella emersonii*, a proteína quinase dependente de AMP-cíclico (PKA) tem um importante papel no processo de germinação (Borges e Gomes, 2000). Como é conhecido o papel da fosforilação no controle da atividade de algumas ATPases investigamos se o extrato de membrana incubado com a PKA-recombinante de *Blastocladiella emersonii* tinha uma atividade P-ATPásica ativada. Entretanto, não observamos nenhuma ativação. Investigamos também se a Calmodulina de *Blastocladiella emersonii* recombinante (Simão e Gomes, 2001) tinha algum papel na atividade P-ATPásica e novamente nenhum efeito foi observado (dados não mostrados).

Para separarmos as atividades P-ATPásicas com o intuito de verificar se esta atividade majoritária, que parecia ser devido a uma H^+ -ATPase, era a atividade da proteína BePAT1/2, aplicamos a fração de membrana, solubilizada com $C_{12}E_8$, em uma coluna de troca iônica Mono-Q e a atividade ATPásica foi medida em todas as frações. Os resultados obtidos com as atividades e com o experimento de “Western blot” (figura 31) mostraram que, como acreditávamos, a enzima mais ativa não era a proteína BePAT1/2 e que esta não foi purificada na sua forma ativa. Testamos também a purificação das proteínas através de coluna de troca iônica Mono-S (resultados não mostrados) e os resultados confirmaram que a atividade majoritária não era devido à proteína BePAT1/2.

Nestes experimentos a proteína BePAT1/2 não foi purificada com atividade e não conseguimos caracterizar até o momento sua atividade. Futuramente devem ser testadas algumas modificações no processo de purificação para tentarmos purificar estas ATPases na sua forma ativa.

A

B

Figura 31 – Purificação das ATPases de *B. emersonii* por cromatografia de troca iônica em coluna mono-Q pH 8,0 feita em um aparelho de FPLC (Pharmacia). A – Gráfico resultante da purificação das proteínas com atividade ATPásica, a partir da fração particulada de zoósporos solubilizada em $C_{12}E_8$ (20 mg/ml). Em preto está representado o perfil proteico através do espectro de absorção a 280nm obtido durante o processo de purificação. Em vermelho vê-se o gradiente formado pela adição gradual de um tampão contendo 0,5M de NaCl. Em azul está representada a atividade ATPásica em relação ao perfil proteico (linha preta). B – “Western blot” revelando a localização das ATPases BePAT1/2 nas diferentes frações obtidas na purificação descrita em A. As setas na figura A indicam as frações 24 (enriquecida para as ATPases BePAT1/2) e 27 (enriquecida para atividade ATPásica).

11 – Purificação e caracterização do intermediário fosforilado a partir das Proteínas BePAT1/2 purificadas por Imunoafinidade :

As dificuldades de caracterizar a atividade específica das ATPases BePAT1/2 devem-se provavelmente à presença de várias ATPases endógenas somada à baixa atividade destas ATPases (BePAT1/2) *in vitro* (como sugere o experimento mostrado na figura 31). Com o intuito de contornar estas limitações empregamos uma técnica descrita por Skerjanc e colaboradores (1993) para a caracterização de formas mutantes pontuais da Ca^{2+} -ATPase expressas em células de inseto. Este trabalho descreve a capacidade de formação do intermediário fosforilado pela Ca^{2+} -ATPase solubilizada em C_{12}E_8 e imunopurificada.

Foi feito um experimento de formação de fosfoenzima utilizando as proteínas BePAT1/2 imunopurificadas que mostrou um primeiro resultado interessante quanto à caracterização da especificidade destas ATPases (figura 32). O experimento mostrado deve ser interpretado com cuidado. Temos que levar em consideração o fato de que estamos analisando um estado intermediário de uma reação e não a atividade. Neste caso tem-se para uma Na^+/K^+ -ATPase (para maiores detalhes ver Skou, J. C., 1988) é que o sódio induz a formação da fosfoenzima porque na presença deste a taxa de fosforilação a partir de ATP é alta e a de desfosforilação é baixa. Para o potássio ocorre o contrário, a taxa de desfosforilação é que é alta. Resumindo, o sódio induz a formação de fosfoenzima e o potássio inibe. Podemos ver que foi exatamente isto que aconteceu no experimento, onde a taxa de fosforilação na presença de sódio foi cerca de 3 vezes maior.

Quanto aos inibidores podemos dizer que o vanadato liga-se à forma E_2 da Na^+/K^+ -ATPase (para uma revisão do ciclo catalítico ver Skou, J. C., 1988), isto explicaria porque o efeito do vanadato na presença do potássio foi mais eficiente já que o vanadato desloca o equilíbrio para forma E_2 que é a de alta afinidade pelo íon potássio aumentando a taxa de desfosforilação. Este efeito foi parcialmente inibido pela presença de sódio.

Visto que a ouabaína estabiliza a forma fosforilada $\text{E}_2\text{-P}$ da Na^+/K^+ -ATPase (Post *et al.*, 1975), os resultados mostrando uma maior fosforilação na presença deste inibidor coincidem com o esperado, embora a taxa de fosforilação tenha sido muito alta. Vale salientar também que na presença do potássio a taxa de fosforilação foi menor, o que pode refletir a ação do potássio em estimular a desfosforilação.

Figura 32—Formação de fosfoenzima utilizando as enzimas BePAT1/2 imunopurificadas.. A presença dos íons Na (100mM), K (100mM) e dos inibidores vanadato (1mM) e ouabaína 5 mM estão indicadas no alto da figura. O experimento foi realizado conforme descrito no item 41 de Materiais e Métodos.

V – CONCLUSÕES

Este trabalho caracterizou a expressão de dois genes (BePAT1 e BePAT2) codificando ATPases do tipo P em *B. emersonii*. As proteínas codificadas por estes genes surpreendentemente mostraram-se mais similares às Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases de eucariotos superiores, embora estes genes sejam de um fungo considerado primitivo.

A clonagem e o estudo da expressão destes genes foram o primeiro passo para a confirmação da funcionalidade e para a compreensão dos mecanismos evolutivos que mantiveram esta sub-família das P-ATPases em organismos como *Blastocladiella emersonii* e *Dictyostelium discoideum* e não em outros fungos como *Neurospora crassa* e *Saccharomyces cerevisiae*.

As conclusões obtidas neste trabalho estão listadas a seguir:

- Existem dois genes muito semelhantes codificando isoformas de ATPases do tipo P em *B. emersonii*.
- Em todo o Genbank *B. emersonii* e *D. discoideum* são os únicos microrganismos descritos que possuem genes codificando P-ATPases mais similares às Na^+/K^+ -ATPases.
- Análises evolutivas baseadas nas seqüências das regiões transmembranares M5 e M6 de diferentes P-ATPases, que contém os resíduos de aminoácidos envolvidos na especificidade do transporte de cátions, agruparam as ATPases de *B. emersonii* e de *D. discoideum* juntamente com as Na^+/K^+ e H^+/K^+ -ATPases.
- As ATPases BePAT1/2 de *B. emersonii* são diferencialmente expressas durante o desenvolvimento do fungo. As variações nos níveis de mRNA resultaram em variações nos níveis de síntese e acúmulo das proteínas BePAT1/2, o que sugere um controle pré-traducional da expressão destes genes.
- Experimentos de RT-PCR mostraram que os genes que codificam as isoformas possuem uma expressão não coordenada ao longo do ciclo de vida do fungo.

- A formação dos zoósporos tem início, aproximadamente, aos 150 minutos de esporulação, cujo primeiro evento é a formação do flagelo. As ATPases de *B. emersonii* tem sua expressão aumentada coincidindo com a formação dos zoósporos, sugerindo um papel importante destas proteínas neste tipo celular. O fato do zoósporo não possuir parede celular poderia ser uma explicação para a presença de uma provável Na^+/K^+ -ATPase em *B. emersonii* e não em outros fungos e plantas.
- As tentativas de purificar uma atividade de Na^+/K^+ -ATPase em *B. emersonii* não foram bem sucedidas. No entanto os experimentos sugeriram a presença de uma atividade de H^+ -ATPase, embora resultados da literatura tenham sugerido a ausência desta atividade em *B. emersonii*, o que tornaria este fungo uma exceção.
- Experimentos de formação de fosfoenzima utilizando a enzima purificada por imunoafinidade indicam que as ATPases de *B. emersonii* sejam realmente uma Na^+/K^+ -ATPase. Sendo assim é a primeira evidência bioquímica de uma Na^+/K^+ -ATPase em um microrganismo eucariótico.

VI - BIBLIOGRAFIA

- Aebi, M. & Wiessman, C. (1987). Precision and orderliness in splicing. *Trends Genet.* 3: 102-107.
- Ambesi, A.; Allen, K.E. & Slayman, C.W. (1997). Isolation of transport-competent secretory vesicles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Anal. Bioch.* 251: 127-129.
- Axelsen, K.B. & Palmgren, M.G. (1998). Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* 46: 84-101.
- Behrens, M.M. & Maia, J.C.C. (1986). Differentiation-specific activation of cyclic AMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*. *Biochem. Intern.* 12: 503-12.
- Benito, B., Quintero, F.J. & Rodríguez-Navarro, A. (1997). Overexpression of the sodium ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*: conditions for phosphorylation from ATP and P_i. *Biochim. Biophys. Acta.* 1328: 214-225.
- Borges, A.C. and Gomes, S. L. (2000). PEST sequences in cAMP-dependent protein kinase subunits of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* are necessary for in vitro degradation by endogenous proteases. *Mol Microbiol.*;36(4): 926-939.
- Brucato, S., Harduin-Lepers, A., Godard F., Bocquet, J. & Villers, C. (2000). Expression of glypican -1, syndecan -1 and syndecan-4 mRNAs protein kinase C-regulated in rat immature sertoli cells by semi-quantitative RT-PCR analysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1474: 31-40.
- Bull, P.C.; Thomas, G.R.; Rommens J.M.; Forbes, J.R. & Cox D.W. (1994). The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.* 5(4): 327-337.
- Bunn, H.F. & Forget, B.G. (1986). Hemoglobin: Molecular, Genetic and clinical Aspects. Philadelphia, P.A: Saunders.
- Burk, S.E. & Shull, G.E. (1992). Structure of the rat plasma membrane Ca(2+)-ATPase isoform 3 gene and characterization of alternative splicing and transcription products. Skeletal muscle-specific splicing results in a plasma membrane Ca(2+)-ATPase with a novel calmodulin-binding domain. *J Biol Chem.* 267(27):19683-90.
- Carafoli, E. (1994). Plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J.* 8: 993-1002.

- Caruso-Neves, C.; Einicker-Lamas, M.; Chagas, C.; Oliveira, M.M.; Vieyra, A. & Lopes, A.G.(1998).** *Trypanosoma cruzi* epimastigotes express the ouabain- and vanadate-sensitive (Na⁺)+K⁺)ATPase activity. *Z Naturforsch*;53(11-12):1049-54.
- Catty, P., d'Exaerde, A.K. & Goffeau, A. (1997).** The inventory of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* P-type transport ATPases. *FEBS Lett.* 409: 325-332.
- Centeno, F., Deschamps, S., Lompré, A.M., Anger, M., Moutin, M. J., Dupont, Y., Gjedde, P., Villalba, J.M., MØller, J.V., Falson, P. & le Maire, M. (1994).** Expression of Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in yeast. *FEBS Lett.* 354: 117-122.
- Clarke, D.M., Loo T.W. & MacLennan, D.H. (1990).** Functional consequences of mutations of conserved amino acids in the β -strand domain of the Ca-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 265: 14088-14092.
- Clarke, D.M., Loo T.W., Inesi, G. & MacLennan, D.H. (1989).** Location of high affinity Ca-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Nature.* 339: 476-478.
- Cornelius F. & Logvinenko N., (1996).** Functional regulation of reconstituted Na,K-ATPase by protein kinase A phosphorylation. *FEBS Lett.* 380(3):277-80.
- Corrêa, J.U., Rodrigues, V. & Lodi, W.R. (1979).** Proteases of *Blastocladiella emersonii*: Developmental patterns and sensitivity to inhibitors *in vitro* and *in vivo*. In: limited proteolysis in microorganisms. G.N. Cohen & H. Holzar, Ed. US Department of Health, Education and Welfare.
- Esmann, M. & Skou, J.C.(1984).** Kinetic properties of C12E8-solubilized (Na⁺ + K⁺)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 787(1):71-80.
- Feinberg, A.P. & Volgestein, B. (1984).** Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- Falson, P.; Menguy, T.; Corre, F.; Bouneau, L.; de Garcia, A. G.; Soulié, S.; Centeno, F.; MØller, J. V.; Champeil, P. & le Maire, M. (1997).** The cytoplasmic loop between putative transmembrane segments 6 and 7 in Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase binds Ca²⁺ and is functionally important. *J. Biol. Chem.* 272(28): 17258-17262.
- Fujiki, Y.; Hubbard, A.L.; Fowler, S. & Lazarow, P.B. (1982).** Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 93: 97-102.

- Gaber, R. F., (1992). Molecular genetics of yeast ion transport. *Int. Rev. Cytol.* **137**:299-353.
- Garciadeblas, B.; Rubio, F.; Quintero, F.J.; Banuelos, M.A.; Haro, R. & Rodríguez-Navarro A. Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* **236**(2-3):363-8.
- Geering, K. (1991). The functional role of the β -subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett.* **285**: 189-193.
- Ghislain, M.; Schlessner, A. & Goffeau, A. (1987). Mutation of conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H^+ -ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **262**: 17549-17555.
- Goffeau, A & Slayman, C. W. (1981). The proton translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* **639**: 197-223.
- Gomes, S.L.; Mennucci, L & Maia, J.C.C. (1978). Adenylate cyclase activity and cyclic AMP metabolism during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **541**:190-198.
- Gomes, S.L.; Mennucci, L & Maia, J.C.C. (1980). Induction of *Blastocladiella emersonii* germination by cyclic adenosine 3'-5'-monophosphate. *Cell Diff.* **9**:169-79.
- Gottschalk, W.K. & Sonneborn, D.R. (1982). Phenotypic dissections of the *Blastocladiella emersonii*. Zoospores development choice. *Dev. Biol.* **93**: 165-80.
- Hager, K.M.; Mandala, S.M.; Davenport, J.W.; Speicher, D.W.; Benz, E.J. & Slayman, C. (1986). Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 7693-7697.
- Hahnenberger, K.M.; Zhengping, J.; & Young, P.G. (1996). Functional expression of the *Schizosaccharomyces pombe* Na/H antiporter gene, *sod2*, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5031-5036.
- Haro, R.; Garcíadeblas, B. & Rodríguez-Navarro, A.(1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* **291**: 189-91.
- Henikoff, S. & Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89** (22):10915-9.
- Hermesen, H.P.H.; Swarts, H.G.P.; Koenderink, J.B. & e Pont, J.J.H.H.M. (1998). The negative charge of glutamic acid-820 in the gastric H^+,K^+ -ATPase α -subunit is essential for K^+ activation of the enzyme activity. *Biochem. J.* **331**:465-472.

- Hopkins, W.G. (1995).** *Introduction to plant physiology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY, EUA.
- Hung, L.H., Suzuki, M., Yamaguchi, Y., Yuan, D.S., Klausner, R.D. & Gitlin, J.D. (1997).** Biochemical characterization of the Wilson disease protein and functional expression in the yeast *Sccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272**: 21461-21466.
- Jaworski, A.J. & Stumhofer, P. (1984).** Dormant ribosomes in *Blastocladiella emersonii* zoospores are arrested at elongation. *Exp. Mycol.* **8**:13-24.
- Jorgensen, P.L., Nielsen, J.M., Rasmussen, J.H. & Pedersen P.A. (1998).** Structure-function relationships of E1-E2 transitions and cation binding in Na,K-pump protein. *Biochim Biophys Acta.* **1365**(1-2):65-70.
- Juliani, M.H. & Maia, J.C.C. (1979).** Cyclic AMP-dependent and independent protein kinase of the water mold, *Blastocladiella emersonii*. *Biochim. Biophys. Acta.* **567**: 347-356.
- Kedes, L.H. & Stockdale (Editors) (1989).** Cellular and Molecular Biology of Muscle Development. New York: Liss.
- Krebs, E.G. & Beavo, J.A., (1979).** Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem.* **48**:923-59.
- Laemmli, U.K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **226**: 680-685.
- Lacapere, J.J.; Robert, J.C. & Thomas-Soumarmon, A. (2000).** Efficient solubilization and purification of the gastric H⁺, K⁺-ATPase for functional and structural studies. *Biochem J.* **345** (2):239-45.
- 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.
- Lutsenko, S. & Kaplan, J.H. (1995).** Organization of P-Type ATPases: Significance of structural Diversity. *Biochemistry.* **34**: 15607-15613.
- Maia, J.C.C. & Camargo, E.P. (1974).** Cyclic AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Cell Diff.* **3**:147-145

- Marques, M.V. & Gomes, S.L. (1992).** Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*. *J. Biol. Chem.* **267**: 17201-7
- McKnight, S. L. & Kingsbury, R. (1982).** Transcription control signals of eukaryotic protein-coding gene. *Science*. **217**: 316-324.
- Michel, P. (1961).** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. **191**:144-148.
- MØller, J. V.; Juul, B. & le Maire, M. (1996).** Structural organization, ion transport, and energy transduction of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1286**: 1-51.
- Monk, B.C.; Kurtz, M.C.; Marrinan, J.A. & Perlin, D.S. (1991).** Cloning and characterization of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **173**: 6826-6836.
- Nakamoto, R. K.; Rao, R. & Slayman, C. W. (1991).** Expression of the yeast plasma membrane H⁺ATPase in secretory vesicles. *J. Biol. Chem.* **266**: 7940-9.
- Nucifora, G.; Chu, L.; Misra, T.K. & Silver, S. (1989).** Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 *cadA* gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **86**: 3544-3548.
- de Oliveira, J.C.F.; Borges, A.C.C.; Marques, M.V. & Gomes, S.L. (1994).** Cloning and characterization of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eur. J. Biochem.* **219**: 555-62.
- Odermatt, A.; Suter, H.; Krapf R. & Solioz, M. (1993).** Primary structure of two P-types ATPases involved in cooper homeostasis in *Enterococcus hirae*. *J. Biol Chem.* **268**(17): 12775-12779.
- Palmgren, M.G. & Axelsen, K.B. (1998).** Evolution of P-type ATPases. *Biochim Biophys Acta*. **1365**(1-2):37-45.
- Pedersen, P.L. & Carafoli, E. (1987).** Ion motive ATPases. I. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* **12**: 146-50.
- Pedersen, P.A.; Ramussen, J.H.; JØrgensen, P.L. (1996).** Expression in high yield of pig $\alpha_1\beta_1$ Na,K-ATPase and inactive mutants D369N and D807N in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **271**: 2514-2522.

- Post, R.L.; Toda, G. & Rogers, F.N. (1975). Phosphorylation by inorganic phosphate of sodium plus potassium ion transport adenosine triphosphatase. Four reactive states. *J Biol Chem.* **250**(2): 691-701.
- Reis, E.M.; Kurtenbach, E.; Ferreira, A.R.; Biselli, P.J.; Slayman, C.W. & Verjovski-Almeida, S. (1999). N-terminal chimeric constructs improve the expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in yeast. *Biochim. Biophys. acta.* **1461**:83-95.
- Rocha, C.R. & Gomes, S.L. (1998). Isolation, characterization, and expression of the gene encoding the beta subunit of the mitochondrial processing peptidase from *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol.* **180**(15): 3967-72.
- Rocha, C.R. & Gomes, S.L. (1999). Characterization and submitochondrial localization of the alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol.* **181**(14):4257-65.
- Rodriguez-Navarro, A. & Ramos, J. (1984). Dual system for potassium transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **159**(3):940-945.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. & Clare, J.J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast.* **8**: 423-488.
- Rossier, B.C.; Geering, K. & Kraehenbuhl, J.P. (1987). Regulation of the sodium pump: how and why ?. *Trends biochem. Sci.* **8**: 483-7.
- Sachs, G.; Besancon, M.; Shin, J.M.; Mercier, F.; Munson, K. & Hersey, S. (1992). Structural aspects of the gastric H,K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **24**: 301-308.
- Sambrook, J.; Fritsh, E.F. & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning - A laboratory manual 2. Ed. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F.; Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Schelessner, A.; Ulaszewski, S., Ghislain, M. & Gouffeau, A. (1988). A second transport ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**: 19480-19487.
- Serrano, R.; Kielland-Brandt, M.C. & Fink, G.R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na^+ , K^+), K^+ and Ca^{2+} -ATPases. *Nature.* **319**: 689-693.

- Silva, A.M.; Maia, J.C.C. & Juliani, M.H. (1986). Developmental changes in translatable RNA species and protein synthesis during esporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Cell Diff.* **18**: 263-74.
- Silva, A.M.; Maia, J.C.C. & Juliani, M.H. (1987). Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.* **169**: 2069-78.
- Silverman, P.M. (1976). Regulation of guanylate cyclase activity during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Biochem Biophys Res Commun.* **70**(2):381-8.
- Simão, R.C.G & Gomes, S.L. (2001). Structure, expression and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the *Chytridiomycete Blastocladiella emersonii*. *J. Bacteriol.* **183** (7): *in press*.
- Skerjanc, I.S; Toyofuku, T.; Richardson, C. & MacLennan, D.H. (1993). Mutation of glutamate 309 to glutamine alters one Ca(2+)-binding site in the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum expressed in Sf9 cells. *J Biol Chem.* **268**(21):15944-50.
- Skou, J. C. (1988). Overview: The Na,K-Pump. *Methods in enzymology.* **156**: 1-25.
- Soll, D.R., and Sonneborn, D.R. (1971). Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*: Cell differentiation without protein synthesis?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 459-463.
- Solioz, M. & Vulpe, C. (1996). CPx-ATPases: a class of P-type ATPases that pump heavy metals. *TIBS.* **21**: 237-241.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- de Souza, F.S.J. (1995). Clonagem de um gene que codifica uma ATPase tipo P do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo.
- de Souza, F.S.J. & Gomes, S.L.(1998). A P-type ATPase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* similar to animal Na,K-ATPases. *Biochim. Biophys. acta.* **1383**: 183-187.
- Stefani, R.M.P. & Gomes S.L. (1995). A unique intron-containing *hsp 70* gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Gene* **152**: 19-26.

- Supply, P. Wach, A. & Goffeau, A. (1993).** Enzymatic properties of the PMA2 plasma membrane-bound H(+)-ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **268(26)**:19753-19759.
- Tang, X.; Halleck, M.S.; Schlegel, R.A. & Williamson, P. (1996).** A subfamily of P-type ATPases with Aminophospholipid transporting activity. *Science.* **272**: 1495-1497.
- Tanzi, R.E.; Petrukhin, K.; Chernov, I.; Pellequer, J.L.; Wasco, W.; Ross, B.; Romano, D.M.; Parano, E.; *et al.*** The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat.Genet.***5(4)**: 344-350.
- Takeyasu, K.; Lemas, V. & Fambrough, D.M.(1990).** Stability of Na(+)-K(+)-ATPase alpha-subunit isoforms in evolution. *Am J Physiol.* **259(4 Pt 1)**: C619-30.
- Takeda, K., Ushimaru, Fukushima, Y. and Kawamura, M. (1999).** Characterization of a P-type Copper-stimulated ATPase from Mouse Liver. *J. membrane Biol.***170**:13-16.
- Taussky, H. M. & Shorr, E. (1953).** A microcolorimetric method for the determination of inorganic phosphorus. . *J. Biol. Chem.* **202**: 675-685.
- Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H. & Ogawa, H. (2000).**Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature.* **405**: 647-655
- Towbin, H.; Staehelin, T. & 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.
- Van der Auwera, G. & De Wachter, R.(1997).** Large-subunit rRNA sequence of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, and implications for the evolution of zoosporic fungi. *J. Mol. Evol.* **43**: 476-483.
- Van Brunt, J.; Caldwell, J. H. & Harold, F. M. (1982).** Circulation of potassium Across the plasma membrane of *Blastocladiella emersonii* : K⁺ Chanel. *Journal Bacteriology.* **150**: 1449-1461.
- Verma, P.K. & Upadhyaya, K.C. (1998).** A multiplex RT-PCR assay for analysis of relative transcript levels of different members of multigene families: Application to *Arabidopsis* calmodulin gene family. *Biochem. Mol. Biol. Inter.***46 (4)**: 699-706.
- Viegas, C.A.; Supply, P.; Capioux, E.; Van Dick, L.; Goffeau, A. & Sá-Correia, I. (1994).** Regulation of the expression of the H⁺-ATPase genes PMA1 and PMA2 during growth

and effects of octanoic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1217**: 74-80.

Vulpe, C.; Levinson, B.; Whitney, S.; Packman, S. & Gitschier, J. (1993). Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase. *Nature Genet.* **3**: 7-13.

Wang, S. & Takeyasu, K. (1997). Primary structure and evolution of the ATP-binding domains of the P-type ATPases in *Tetrahymena thermophila*. *Am. J. Physiol.* **272**: C715-C728.

Yuan, W. (2000). Intron 1 rather than 5'flanking sequence mediates cell type-specific expression of c-myb at level of transcription elongation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1490**: 74-86.

Zhou, X. & Fambrough, D.M.(1999). Expression of the avian Na,K-ATPase subunits in *Dictyostelium discoideum*. *J Membr. Biol.* **167**(1):19-24.