**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)

GABRIELA MÓL AVELAR TAMAKI

Estudo da sinalização por GMP cíclico em

Blastocladiella emersonii

Versão corrigida da Tese conforme Resolução CoPGr 5890

O original se encontra disponível na Secretaria de Pós-Graduação do IQ-USP

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

06/10/2014

GABRIELA MÓL AVELAR TAMAKI

Estudo da sinalização por GMP cíclico em

Blastocladiella emersonii

*Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de
São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências
(Bioquímica)*

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo

2014

Gabriela Mol Avelar Tamaki

Estudo da sinalização por GMP cíclico em *Blastocladiella emersonii*

Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade
de São Paulo para obtenção do Título Doutora em Ciências
(Bioquímica).

Aprovada em: 10/12/14

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Aos meus pais e minha irmã pelos ensinamentos, carinho e compreensão e ao meu marido, parte fundamental da minha vida em todos os sentidos.

AGRADECIMENTOS

A Deus acima de tudo.

A CAPES, CNPq e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

À Profa. Dra. Suely Lopes Gomes pela orientação, apoio, confiança e principalmente pelo exemplo de dedicação ao trabalho.

À Dra. Regina Baldini, pelo apoio e ajuda tanto em sugestões quanto em equipamentos e materiais essenciais para esse trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, à USP e a todos os docentes que contribuíram para este trabalho e para minha formação acadêmica com aulas, sugestões, discussões e acesso a equipamentos e reagentes. Agradeço em especial aos professores Dra. Aline Maria da Silva, Dr. Frederico Gueiros, Dra. Déborah Schechtman, Dr. Alexander Henning e Dr. Maurício Baptista que além de me auxiliarem com valiosos conselhos ainda me ajudaram com equipamentos e materiais.

Aos amigos que passaram pelo laboratório de Regulação de Expressão Gênica em Microorganismos: Eliezer, André, César, Patrícia, Ana Paula, Christian, Anne, Raphaela e Rogério pela amizade, pelo apoio e por toda ajuda que proporcionaram.

Ao Dr. Ivan Schumacher pela ajuda e sugestões tanto na qualificação como nos experimentos de microscopia por imunofluorescência.

Ao Dr. Paulo Zaini pela amizade e ajuda nos experimentos de fototaxia.

À futura doutora Talita Glaser pelos momentos divertidos, pela amizade e pela ajuda essencial nos experimentos microfluorimetria.

Aos doutores Thomas Richards e Guy Leonard da University of Exeter, Exeter, Reino Unido pela colaboração no sequenciamento do genoma de *B. emersonii* e pela valorosa contribuição neste trabalho.

Às amigas Manzini e Cecilia Ikegami pela amizade bonita construída ao longo deste doutorado.

A minha querida Juliana Crestani pela amizade, carinho, conselhos e sugestões.

Aos amigos de laboratório do grupo da professora Regina: Ana Laura Boechat, Gianluca Nicastro, Gilberto Kaihami, Thaís Oliveira e Duílio Oliveira pela amizade, discussões e por toda a ajuda durante esse trabalho.

Às técnicas Dóris e Ivanilde pelo auxílio e dedicação no trabalho de base.

Ao biotério e à técnica Flávia.

À Luci Deise Navarro pela amizade e eficiência no serviço de sequenciamento.

À Sandra Mara pela dedicação, eficiência, ajuda e principalmente pela amizade.

Às pessoas da secretaria e da SBBq, pela ajuda nas horas necessárias.

Aos meus amigos da USP pela amizade, ajuda e por tantos momentos divertidos! Em especial à Angélica Cappellari, Juliana Dias, Alexandre Bisson e Luciane Schons.

As minhas amigas de infância baianas: Jéssica, Caiara, Ayala, Adrya e Vanessa.

Aos meus amigos de Minas Gerais: Luis Filipe, Fabrício Cordeiro, Luis Fernando, Leonardo, Vitor, Gustavo, Mayra e Fabrício Neves.

Aos meus familiares: tios, primos, avós presentes e em espírito, aos meus padrinhos Raphael e Patrícia, mas principalmente aos meus pais Maria Eduarda e Antônio que são meu orgulho, minha base e minha força e a minha irmã Flávia que é o melhor presente que a vida já me deu.

Aos meus sogros, cunhadas e agregados que compõem agora parte da minha família.

E finalmente ao meu marido Fábio, inspiração na minha vida pessoal e profissional, pelo exemplo de dedicação, amor, paciência, ajuda, apoio e carinho que tornam a minha vida melhor em todos os sentidos.

RESUMO

Tamaki, G. M. A. **Estudo da sinalização por GMP cíclico em *Blastocladiella emersonii***. 2014. 126 páginas. Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

O segundo mensageiro cGMP está envolvido em diversas funções celulares incluindo a visão em mamíferos. Embora trabalhos anteriores mostrassem variações nos níveis de cGMP durante o ciclo de vida de *Blastocladiella emersonii* e evidências da existência de enzimas específicas envolvidas na sua síntese (guanilato ciclase) e degradação (cGMP fosfodiesterase), nenhum genoma de fungo publicado até o momento mostrou a existência de genes codificando estas enzimas. Este fato é atribuído por evolucionistas à completa perda de motilidade dos fungos em geral, já que cGMP está primordialmente associado a células com cílios. Blastocladiomicetos, como *Blastocladiella*, apresentam células móveis em pelo menos um estágio do seu ciclo de vida, o que poderia explicar a existência dessa via nesses fungos. Uma investigação no banco de ESTs de *B. emersonii* revelou a existência de cDNAs codificando parte de prováveis guanilato ciclases (BeGC1, BeGC2 e BeGC3) e uma possível cGMP fosfodiesterase (BePDE). Assim, este trabalho buscou confirmar a existência destas enzimas e caracterizar a sinalização por cGMP em *B. emersonii*. A proteína recombinante selvagem correspondente ao domínio catalítico de BePDE mostrou atividade de degradação sobre cGMP e a mutação E389A foi capaz de alterar a especificidade por cGMP. Com o sequenciamento do genoma de *B. emersonii* obteve-se as sequências completas das guanilato ciclases. Em BeGC2 não foi possível identificar o ligante responsável por sua ativação. Em BeGC3, a presença de um domínio Heme-Pas sugeriu sua ativação por óxido nítrico. A presença de um domínio rodopsina em BeGC1 sugeriu sua ativação por luz. Experimentos de microscopia por imunofluorescência localizaram BeGC1 no “eyespot”,

BeGC2 no capacete nuclear e BeGC3 no citoplasma de zoósporos de *B. emersonii*. Verificamos também que zoósporos realizam fototaxia em direção à luz verde e que a adição de hidroxilamina, inibidor de rodopsina, ou do inibidor de guanilato ciclase LY83583 tem efeito negativo na fototaxia, bem como impede o aumento dos níveis de cGMP observado em zoósporos expostos à luz verde. O bloqueio da síntese de retinal por Norflurazon também inibiu a fototaxia sendo esta restaurada quando adicionamos retinalA1. Estes dados, juntamente com o fato de o domínio rodopsina de BeGC1 ser a única rodopsina presente no genoma, indicam que BeGC1 é responsável pela fototaxia nos zoósporos de *B. emersonii*. O genoma do fungo apresenta ainda um possível canal de potássio ativado por cGMP (BeCNG1) localizado na membrana plasmática de zoósporos, similar ao canal regulado por cGMP envolvido na visão em humanos. Ensaios de microfluorimetria também evidenciaram a presença de um canal ativado por cGMP relacionado com o influxo de potássio e a motilidade dos zoósporos. Um modelo para a via de sinalização da fototaxia em *B. emersonii* foi proposto e comparado com a sinalização presente na visão de mamíferos, destacando a existência de cGMP e rodopsina em ambos os processos e sugerindo uma possível origem comum. Portanto, os resultados obtidos suportam a existência da sinalização por cGMP em *B. emersonii*, além de indicar o papel dessa sinalização na fototaxia dos zoósporos, sendo esta a primeira via de sinalização por cGMP caracterizada em fungos.

Palavras-chave: cGMP, fototaxia, fungo, rodopsina, guanilil ciclase e fosfodiesterase

ABSTRACT

Tamaki, G. M. A. **Studies in cyclic GMP signaling pathway in *Blastocladiella emersonii***. 2014. 126 pages. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

The second messenger cyclic GMP is involved in a wide array of cellular processes including vision in mammals. Although previous studies demonstrated changes in cGMP levels during the life cycle of *Blastocladiella emersonii* and evidences of specific enzymes involved in its synthesis (guanylyl cyclase) and hydrolysis (cGMP-phosphodiesterase), no fungal genome published so far shows the presence of genes encoding these enzymes. Evolutionists attribute the absence of cGMP signaling pathways in higher fungi to the sedentary life style of these organisms, since cGMP is primarily associated with ciliated cells. However, blastocladiomycetes like *Blastocladiella*, have motile cells in at least one stage of their life cycle, which could explain the existence of this pathway in these primitive fungi. Inspection of *B. emersonii* EST data bank, revealed cDNAs encoding part of three putative guanylyl cyclases (BeGC1, BeGC2 e BeGC3) and one possible cGMP phosphodiesterase (BePDE). Thus, the purpose of this study was to confirm the existence of these enzymes and characterize the cGMP signaling pathway in this model. The recombinant protein containing the wild type catalytic domain of BePDE presented activity towards hydrolysis of cGMP and the E389A mutation of this domain changed the cGMP specificity of this enzyme. The complete nucleotide sequence of the guanylyl cyclases were obtained by sequencing of *B. emersonii* genome. In BeGC2 we were unable identify the ligand responsible for its activation, but in BeGC3, the presence of a Heme-Pas domain suggested its activation by nitric oxide. The presence of a rhodopsin domain in BeGC1 suggested its activation by light. Immunofluorescence microscopy localized BeGC1 in the “eyespot” structure, BeGC2 in the nuclear cap and BeGC3 in the cytoplasm of zoospores of *B. emersonii*. We found that

Blastocladiella zoospores performed phototaxis toward green light and photobleaching of rhodopsin function using hydroxylamine prevented both phototaxis and the increased cGMP levels observed when zoospores were exposed to green light. The same effect was observed using the guanylyl cyclase inhibitor LY83583. Inhibition of retinal synthesis using Norflurazon prevented the phototaxis response, which could be restored by zoospore complementation with retinalA1. The BeGC1 gene is the only rhodopsin found in the draft assembly of *B. emersonii* genome, which indicates that BeGC1 is responsible for phototaxis observed in zoospores. We also found in the genome a possible cGMP-activated potassium channel (BeCNG1), localized in the plasma membrane of the zoospores, which is similar to the cGMP-activated channel involved in human vision. In addition, microfluorimetry assays revealed the presence of a cGMP-activated potassium channel involved in potassium influx and zoospore motility. The signaling model of *B. emersonii* phototaxis was proposed and compared with the mammalian vision system, with cGMP and rhodopsin acting in both signaling pathways, suggesting a common origin. Altogether our data indicate that *Blastocladiella emersonii* has a cGMP signaling system involved in phototaxis, being the first cGMP signaling pathway characterized in fungi.

Keywords: cGMP, phototaxis, fungi, rhodopsin, guanylyl cyclase and phosphodiesterase.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST: *B*asic *L*ocal *A*lignment *S*earch *T*ool

cAMP: Adenosina monofosfato cíclico

cGMP: Guanosina monofosfato cíclico

cDNA: DNA complementar

DO: densidade óptica

DEPC: Dietilpirocarbonato

DM4: Meio definido de *B. emersonii*

kDa: Kilodaltons

LB: meio de cultura Lysogeny broth

mRNA: RNA mensageiro

M: Molar

μL: Microlitro

ODQ: 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one

pb: Pares de bases

PCR: Reação de polimerização em cadeia (*p*olymerase *c*hain *r*eaction)

RT-QPCR: Reação de polimerização em cadeia quantitativa precedida por Transcrição reversa
(*r*everse *t*ranscription - *q*uantitative *p*olymerase *c*hain *r*eaction)

RNA: Ácido ribonucleico

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

SUMÁRIO

1. Introdução.....	15
1.1. O modelo de estudo: <i>Blastocladiella emersonii</i>	15
1.2. Esporulação de <i>Blastocladiella emersonii</i>	17
1.3. Sinalização por GMP cíclico	18
1.3.1. Guanilil ciclases	20
1.3.2. Fosfodiesterases	22
1.3.3. Canais iônicos responsivos a nucleotídeos cíclicos	25
1.3.4. . Proteínas Quinases dependentes de GMP cíclico (PKGs)	26
1.4. Fototaxia e rodopsinas.....	28
2. Objetivos	31
3. Materiais e Métodos	32
3.1. Meios de cultura	32
3.2. Cultivo de células de <i>B. emersonii</i>	32
3.3. Extração de DNA de <i>B. emersonii</i>	33
3.4. Extração de RNA total de <i>B. emersonii</i>	34
3.5. Síntese dos cDNAs.....	35
3.6. Reações de amplificação de DNA por PCR.....	35
3.7. Sequenciamento de DNA	37
3.8. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação	37
3.9. Preparo de células competentes para transformação por choque térmico.....	38
3.10. Transformação de <i>E.coli</i>	38
3.11. Isolamento de plasmídeos e fragmentos de DNA, digestão com enzimas de restrição e ligação dos clones obtidos.....	39
3.12. Experimentos de RACE 5' (Rapid Amplification of cDNA Ends).....	39
3.13. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes.....	40
3.14. Obtenção do mutante E389A	41
3.15. Ensaio de atividade da fosfodiesterase	41
3.16. Western Blots	42
3.17. Fototaxia em placa	43
3.18. Fototaxia em câmara de microfluídica	44

3.19. Microscopia de imunofluorescência.....	44
3.20. Determinação dos níveis intracelulares de GMP cíclico.....	45
3.21. Determinação da variação do potencial de membrana por microfluorimetria	46
3.22. Fo Avaliação do fluxo de potássio por microscopia de fluorescência.totaxia em placa	47
3.23. RT-PCR quantitativo em tempo real	48
4. Resultados e Discussão	49
4.1. Caracterização da fosfodiesterase BePDE.....	49
4.1.1. Comparação da sequência de BePDE com as fosfodiesterases presentes no banco de dados do NCBI	49
4.1.2. Análise da estrutura tridimensional da proteína BePDE	54
4.1.3. Clonagem e expressão da fosfodiesterase BePDE de <i>B. emersonii</i>	56
4.1.4. Teste de atividade enzimática da fosfodiesterase BePDE recombinante selvagem e do mutante E389A	62
4.2. Análise das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2, e BeGC3	67
4.2.1. Obtenção das sequências completas das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3 e sua modelagem tridimensional	67
4.2.1.1. Obtenção da sequência completa de BeGC1	68
4.2.1.2. Obtenção da sequência completa de BeGC2	75
4.2.1.3. Obtenção da sequência completa de BeGC3	80
4.2.2. Localização das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3	84
4.2.2.1. Localização das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3 através de western blots de extratos celulares fracionados	84
4.2.2.2. Imunolocalização das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3	87
4.3. Identificação de um possível canal iônico ativado por GMP cíclico denominado BeCNG1	90
4.3.1. Comparação de BeCNG1 com outros canais presentes no banco de dados do NCBI.	91
4.3.2. Localização do canal de potássio BeCNG1 utilizando Western blot e microscopia por imunofluorescência.	94
4.3.3. Perfil de expressão do transcrito do canal BeCNG1 é semelhante ao da guanilato ciclase BeGC1.....	97
4.3.4. Análise da influencia de um canal responsivo a cGMP na variação do potencial de membrana e no fluxo de potássio.	98
4.4. Perfil dos níveis de proteína de BeGC1, BeGC2, BeGC3 e BeCNG1 ao longo do ciclo de vida de <i>Blastocladiella emersonii</i> avaliados utilizando a técnica de western blot.....	101
4.5. Caracterização da fototaxia dos zoósporos de <i>Blastocladiella emersonii</i>	103

4.5.1. Investigação do papel de BeGC1 e BeCNG1 na fototaxia dos zoósporos de <i>B. emersonii</i>	103
4.5.2. Modelo da sinalização celular na fototaxia dos zoósporos de <i>Blastocladiella emersonii</i> e comparação com a sinalização presente na visão de vertebrados.	111
4.6. Comparação das proteínas da via de sinalização por cGMP encontradas em <i>B. emersonii</i> com as presentes em outros fungos da classe dos blastocladiomicetos e quitridiomicetos	115
5. Conclusões	119
6. Referências.....	122
7. Súmula curricular	127

1. Introdução

1.1 O modelo de estudo: *Blastocladiella emersonii*

Blastocladiella emersonii é um fungo aquático, saprofítico, não filamentoso pertence à classe dos Blastocladiomicetos (James et al. 2006), ordem Blastocladales, que foi isolado e descrito por Cantino (Cantino 1951). No seu ciclo de vida ocorrem duas etapas de diferenciação celular: a germinação e a esporulação, onde diversas mudanças morfológicas e bioquímicas são observadas. Dentre essas mudanças estão a alteração no padrão de síntese de mRNAs e proteínas, principalmente ao longo da esporulação (Silva et al. 1987; Salem-Izacc et al. 2009; Vieira and Gomes 2010). Quatro tipos celulares alternam-se de maneira cíclica durante o desenvolvimento do fungo: zoósporo, gérmen, célula vegetativa e zoosporângio.

O ciclo de vida de *B. emersonii* inicia-se com o zoósporo, uma célula uninucleada móvel e sem parede celular, que não cresce nem se divide, e que germina ao encontrar um ambiente rico nutricionalmente. A germinação pode também ser induzida de maneira sincronizada quando a célula é exposta a uma solução de sal inorgânico contendo certos cátions monovalentes (Soll and Sonneborn 1972), AMP cíclico (Gomes 1980), ou outros indutores (Gottschalk and Sonneborn 1982). No processo da germinação, o zoósporo retrai o seu flagelo localizado na parte posterior de célula, ocorre um arredondamento da célula (célula redonda) e forma-se uma parede celular rica em quitina. Um tubo germinal é formado, o qual por ramificação dá origem a um sistema de rizoides através dos quais os nutrientes são absorvidos (Lovett 1975). As primeiras divisões nucleares acontecem entre os 140-190 minutos após o início da germinação. Durante todo o crescimento vegetativo ocorrem sucessivas mitoses não acompanhadas de citocinese, dando origem a um cenócito. A carência de nutrientes a qualquer momento durante o crescimento vegetativo induz o processo de esporulação. Nele, a célula sintetiza um septo basal que separa a

célula de seu ambiente e um poro apical denominado papila. O citoplasma divide-se em torno dos núcleos iniciando a biogênese dos zoósporos que culmina com a liberação dos mesmos para o meio após a abertura da papila (Lovett 1975).

Dentre as organelas que estão presentes somente nos zoósporos estão as partículas gama e o “eyespot” também chamado de corpúsculo basal. O conteúdo proteico das partículas gama foi caracterizado por Bracker e Wirth (Bracker and Wirth 1984) sendo identificadas duas proteínas majoritárias cuja função ainda é desconhecida. Acredita-se que esta estrutura possa estar relacionada com a síntese da parede celular. A estrutura de “eyespot” é composta por grânulos de lipídeos envoltos por uma membrana trilaminar, estando localizado próximo ao flagelo. Mills e Cantino (Mills and Cantino 1977) descreveram esta estrutura como composta de triglicerídeos, carotenoides, ácidos graxos e proteínas, sendo creditada a ela, dentre outras, a função de armazenamento de energia para o zoósporo.

Cantino e Truesdell (Cantino and Truesdell 1971) observaram que a luz induz a germinação de zoósporos. Trabalhos anteriores já haviam mostrado a influência da luz no ganho de peso seco, consumo de glicose, síntese de polissacarídeos, entre outros, mostrando a influência da iluminação no ciclo de vida desses organismos (Goldstein and Cantino 1962).

Figura 1. Ciclo de vida do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* (Adaptado de Lovett, 1975)

1.2. Esporulação de *Blastocladiella emersonii*

A esporulação em *B. emersonii* caracteriza-se por uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas que resultam na conversão de uma célula cenocítica em um zoosporângio, seguida pela diferenciação e liberação dos zoósporos. Esta fase do desenvolvimento do fungo é acompanhada pelo aparecimento de um grande número de atividades enzimáticas tais como: proteases (Correa 1979), esterases (Barbieri and Camargo 1975), fosfatase alcalina (Selitrennikoff and Sonneborn 1977), fosfodiesterase de cAMP (Maia and Camargo 1974),

fosfodiesterase de cGMP (Vale and Maia 1976), adenilato ciclase (Gomes et al. 1978), guanilato ciclase (Silverman 1976), e proteína quinase dependente de cAMP (Juliani et al. 1979; Marques Mdo et al. 1992; Marques Mdo and Gomes 1992; de Oliveira et al. 1994).

Silverman & Epstein (1975) sugeriram que GMP cíclico (cGMP) teria um papel importante em eventos tardios da esporulação. Os autores mostraram que os níveis de cGMP aumentam 50-100 vezes entre 60-150 minutos após a indução da esporulação, ao passo que os níveis de cAMP permanecem inalterados até a liberação dos zoósporos. Esses dados sugeriram que o aumento nos níveis de cGMP poderia ter um papel importante durante a esporulação e no zoósporo de *B. emersonii* (Silverman and Epstein 1975).

1.3. Sinalização por GMP cíclico

Várias funções fisiológicas em eucariotos são reguladas por cAMP e cGMP. Estes nucleotídeos cíclicos controlam uma série de proteínas e canais iônicos dependentes de nucleotídeos cíclicos participando de diversas vias de transdução de sinais (Omori and Kotera 2007). Em *B. emersonii*, resultados do nosso laboratório mostraram que o AMP cíclico induz a germinação e que um aumento transitório dos níveis deste nucleotídeo ocorre nos primeiros minutos deste estágio de diferenciação (Vale et al. 1976; Gomes 1980). Matsuo e colaboradores (Matsuo et al. 2008) também mostraram que AMP cíclico está envolvido na diferenciação de outra espécie de fungo. Em *Plasmodium*, evidências indicam que níveis aumentados de cGMP podem estimular a formação e liberação do flagelo, evento importante na gametogênese que resulta na liberação de gametas flagelados móveis de dentro do inseto vetor (Baker and Kelly 2004). Foi também detectada indiretamente a atividade de guanilato ciclase no fungo parasita

Coniothyrium minitans, através de determinação dos níveis de cGMP na presença do inibidor específico 1H-[1, 2,4] Oxadiazolo [4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Li et al. 2010).

Os níveis desses nucleotídeos cíclicos nas células são estritamente regulados por meio de sua síntese, através das ciclases, e degradação, a qual se dá pelas fosfodiesterases. O cAMP é sintetizado pela adenilato ciclase a partir do ATP, e o cGMP é produzido pela guanilato ciclase a partir do GTP.

Poucos trabalhos têm mostrado a atividade de guanilato ciclases, fosfodiesterases de cGMP e proteínas que ligam cGMP em fungos e plantas. Uma característica comum entre plantas superiores e fungos, que não é compartilhada por nenhum outro grupo, é o estilo de vida sedentário e a completa perda de motilidade de todas as suas células, incluindo os gametas (Schaap 2005). Evolucionistas têm sugerido que, uma vez que a sinalização por cGMP está frequentemente envolvida com o controle do movimento celular, é possível que a perda da motilidade durante a evolução das plantas e fungos tenha sido responsável pela perda dos genes de ligação, síntese e degradação de cGMP nesses grupos (Linder and Schultz 2002; Baker and Kelly 2004; Schaap 2005).

No entanto, os blastocladiomicetos divergiram cedo na linhagem dos fungos, estando, portanto, na base da árvore filogenética do grupo (Van der Auwera and De Wachter 1996; Heckman et al. 2001). Além disso, os blastocladiomicetos apresentam uma célula móvel em pelo menos um estágio do seu ciclo de vida, característica esta que poderia explicar a existência não apenas de genes de guanilato ciclases, mas também a atividade de fosfodiesterase de cGMP descrita por Vale *et al.* (1975) em *B. emersonii*.

De fato, uma busca no genoma sequenciado dos blastocladiomicetos *Allomyces macrogynus* e *Catenaria anguillulae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity_project/GenomesIndex.html e <http://genome.jgi.doe.gov/Catan1/Catan1.home.html>) é possível encontrar sequências com similaridade tanto a guanilato ciclases quanto a cGMP fosfodiesterases.

O quitridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis*, que também possui uma fase móvel em seu ciclo de vida, possui em seu genoma (<http://www.broad.mit.edu>) pelo menos dois genes que codificam possíveis guanilato ciclases (BDEG_02490.1 e BDEG_00667.1) e pelo menos um gene codificando uma possível fosfodiesterase de cGMP (BDEG_08369.1), o que reforça a tese da existência e participação do cGMP em importantes vias de sinalização nas linhagens basais de fungos.

1.3.1 Guanilil ciclases

A enzima que catalisa a conversão de GTP a cGMP foi inicialmente chamada de guanil ciclase, posteriormente de guanilato ciclase e a literatura recente comumente a chama de guanilil ciclase (Potter 2011). O cGMP intracelular regula uma série de processos através canais iônicos, proteínas quinases e fosfodiesterases (Lucas et al. 2000).

Existem dois tipos de guanilil ciclases (GC) distintas: as GCs receptoras e as GCs solúveis. Sete classes de enzimas receptoras foram identificadas em mamíferos sendo que cada uma é codificada por um gene diferente. As enzimas receptoras possuem um domínio de ligação extracelular, cujos ligantes frequentemente são peptídeos, tais como: peptídeos natriuréticos (GC-A e GC-B); enterotoxinas e guanilinas (GC-C); ou odorantes desconhecidos (GC-D); ou ainda outros compostos como dióxido de carbono ou bicarbonato (GC-D e GC-G); um domínio

homólogo a quinases, um domínio de dimerização e um domínio catalítico (Potter 2011). A unidade catalítica mínima de uma guanilil ciclase é o dímero sendo que a maioria das GC receptoras forma homodímeros ainda no estado inativo por meio da interação de seus domínios coiled-coil (CC) e KHD (domínio homólogo de proteína quinase) (Potter 2011).

As guanilil ciclasas solúveis (sGCs) formam heterodímeros de duas isoformas, α e β , cada qual com um domínio ciclase na região C-terminal, um domínio PAS (**P**er, **A**rnt, **S**im), responsável por sua dimerização, e uma região N-terminal que coordena um único grupo Heme por dímero (Friebe and Koesling 2003; Potter 2011).

As guanilil ciclasas retiniais (RetGCs – GC-E e GC-F) reguladas por Ca^{2+} não são ativadas por ligantes. Sua dimerização e consequente ativação dependem da interação com proteínas ativadoras de guanilato ciclase (GCAPs), as quais dimerizam na ausência de Ca^{2+} , sendo assim ativadas (Subbaraya et al. 2003).

Guanilato ciclasas receptoras foram descritas também em invertebrados de diferentes filos, tais com ciliófora (*Paramecium tetraurelia*) (Potter 2011), nematoda (*C. elegans*) (Yu et al. 1997) e equinodermata (Singh et al. 1988). GCs solúveis estimuladas por $\bullet\text{NO}$ também estão conservadas em artrópodes (Shah and Hyde 1995; Zayas et al. 2000). As enzimas adenilato e guanilato ciclasas de *Plasmodium falciparum* apresentam grande similaridade com as ciclasas de vertebrados, sendo que duas GCs foram identificadas. Pelo menos 20 parálogos de GC similares às aquelas de eucariotos superiores foram encontradas no genoma da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, (Baker and Kelly 2004).

Uma investigação recente no banco de ESTs de *B. emersonii* (<http://blast.iq.usp.br>), construído a partir das informações obtidas do sequenciamento de várias bibliotecas de cDNA

(Ribichich et al. 2005; Georg and Gomes 2007), revelou a existência de três ESTs codificando parte de domínios catalíticos distintos de enzimas guanilato ciclases. Assim sendo, as três ESTs de prováveis guanilato ciclases de *B. emersonii* foram denominadas BeGC1, BeGC2 e BeGC3 e suas sequências foram depositadas no bando de dados GenBank (número de acesso ACS49833.1, ACS49833.1 e ACS49835.1, respectivamente.)

Vieira e colaboradores (Vieira et al. 2009), em nosso laboratório, observaram que quando o inibidor específico para guanilato ciclases solúveis 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ), na concentração final de 250 μ M, é adicionado até 90 minutos depois da indução da esporulação, esta fase é completamente inibida mostrando a importância de uma provável guanilato ciclase solúvel e consequentemente de cGMP para esse processo.

1.3.2. Fosfodiesterases

Fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs) são moduladas em coordenação com adenilato e guanilato ciclases através de efetores diretos e cascatas autoreguladas de modo a manter o nível ótimo das concentrações de cGMP e cAMP para a resposta a sinais (Francis et al. 2011). Onze famílias de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos foram descritas de acordo com suas características cinéticas, especificidade por substrato (cAMP e/ ou cGMP), perfis de inibição, inibidores e ativadores alostéricos, sequência de aminoácidos, e mudanças no padrão de expressão gênica em diferentes células e tecidos. Atualmente já foram identificadas também várias isoformas de PDEs geradas a partir de processamento alternativo de íntrons ou transcrição a partir de diferentes promotores. (Omori and Kotera, 2007; Rentero and Puigdomènech, 2006).

Fosfodiesterases da família 1 encontram-se organizadas em 3 subfamílias de genes, PDE1A-C. Elas são ativadas por Ca^{2+} -calmodulina e hidrolisam tanto cGMP quanto cAMP. A família 2 é composta por enzimas estimuladas alostericamente por cGMP através do domínio

GAF (cGMP-activated PDE, Adenyl cyclase- e FhlA-binding) e também são capazes de degradar ambos os nucleotídeos cíclicos. Fosfodiesterases das subfamílias PDE3A e PDE3B (pertencentes à família 3) têm como substrato o cAMP sendo inibidas por cGMP. Somente nessa família é encontrada uma inserção de 44 aminoácidos no domínio catalítico. Ela também possui um domínio N-terminal hidrofóbico de associação à membrana (NHR). A família 4 compreende 4 subfamílias similares de genes, PDE4A-D que codificam fosfodiesterases específicas para cAMP e sensíveis ao inibidor rolipram. Essas fosfodiesterases possuem variantes de processamento que podem conter domínios UCR (Upstream Conserved Regions)¹ e/ou 2. O domínio URC1 possui um sítio de fosforilação por PKA (proteína quinase ativada por cAMP) e o domínio UCR2 possui uma região que interage com URC1. Enzimas da família 5 possuem 2 domínios GAF (GAFA e GAFB) e hidrolisam cGMP. Possuem um sítio de fosforilação de PKG e PKA na região N-terminal relacionado com a ativação da enzima. Fosfodiesterases da família 6 são encontradas em células retinais e nas células cones e são específicas para cGMP. Uma transducina ativada por uma rodopsina estimula PDE6 removendo a subunidade inibitória. A família 7 é composta por 2 subfamílias de fosfodiesterases PDE7A e PDE7B específicas para cAMP e não inibidas por rolipram. PDE8A e PDE8B são as subfamílias de PDE8. São específicas para cAMP e contêm na região N-terminal os domínios PAS e REC (signal receiver). O domínio PAS é envolvido com interações proteína-proteína além de associação de pequenos ligantes e o domínio REC funciona como um receptor de sinais. A família 9 é específica para cGMP. As PDEs das famílias 8 e 9 não são inibidas por 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX). Os integrantes da família 10 possuem 2 domínios GAF N-terminais, hidrolisam tanto cAMP e cGMP e podem ser inibidos por papaverina. As fosfodiesterases da família 11 também possuem 2 domínios GAF e hidrolisam tanto cGMP e cAMP (Omori and Kotera, 2007).

O sítio catalítico das fosfodiesterases possui uma glutamina invariante que forma diferentes pontes de hidrogênio com a purina do substrato (cAMP ou cGMP) sendo importante assim para especificidade das PDEs. A fosfodiesterase 9A possui alta especificidade por cGMP (K_M de 170 nM para cGMP versus 250 μ M para cAMP) sendo isso atribuído por alguns trabalhos ao posicionamento de um resíduo de glutamato E406 (correspondente ao resíduo E389 de BePDE). Este resíduo fixaria através de ligações de hidrogênio a posição da glutamina invariável para que esta possa interagir de forma otimizada com a purina da molécula de cGMP (figura 2) (Liu et al. 2008). Interessante notar que este resíduo só é conservado em fosfodiesterases da família 9A.

Figura 2. Possível complexo enzima- substrato mostrando o reconhecimento do cGMP (em magenta) pelo sítio catalítico da fosfodiesterase 9A humana (em verde). Esferas em vermelho representam moléculas de água e esferas em roxo representam íons divalentes que participam como cofatores na catálise dessa enzima. (Modificado de Liu et. al. 2008).

Também foi encontrada no banco de ESTs de *B. emersonii* (<http://blasto.iq.usp.br>) uma EST completa codificando uma fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico com similaridade com fosfodiesterases de cGMP da família 9. Esta fosfodiesterase foi denominada BePDE e sua

sequência foi depositada no bando de dados GenBank (número de acesso ACS49836.1). Corroborando com este dado, a existência de atividade de fosfodiesterase específica para cGMP em zoósporos de *B.emersonii* já havia sido reportada (Vale et al. 1975).

Embora trabalhos anteriores tenham mostrado variações nos níveis de cGMP durante o ciclo de vida de *B. emersonii* (Silverman and Epstein 1975), e haja evidências da existência de enzimas específicas envolvidas na síntese e degradação desse nucleotídeo cíclico no fungo em questão (Vale et al. 1975; Silverman 1976), nenhum gene codificando guanilato ciclases e fosfodiesterases de cGMP foi descrito na literatura em fungos até o momento. Portanto, experimentos que demonstrem de fato a existência, a especificidade e a função de tais enzimas são necessários. Assim, devido à importância de se demonstrar a existência dessa via em fungos primitivos, bem como caracterizá-la, a fosfodiesterase BePDE, as guanilato ciclases BeGC1, BeGC2, BeGC3 e outras proteínas possivelmente envolvidas na sinalização por cGMP em *Blastocladiella* foram objeto de estudo neste trabalho.

1.3.3. Canais iônicos responsivos a nucleotídeos cíclicos

GMP cíclico pode exercer seu efeito fisiológico através da ligação a três classes de receptores: (1) proteínas quinases dependentes de cGMP (PKGs), (2) fosfodiesterases de cGMP ou cAMP e (3) canais iônicos responsivos a cGMP (Biel 2009). Duas famílias de canais regulados por nucleotídeos cíclicos foram identificadas: os canais CNG (**c**yclic **n**ucleotide-**g**ated channels) e os HCN (**H**yperpolarization-activated **c**yclic **n**ucleotide-**g**ated). Os canais CNG são ativados diretamente pela ligação de cAMP ou cGMP enquanto os canais HCN são operados principalmente por voltagem embora a ligação de nucleotídeos cíclicos aumente a probabilidade de abertura deste canal. Ambos os tipos de canais atuam como complexos tetraméricos, sendo cada subunidade constituída de seis hélices transmembrana (S1-S6) e uma região de poro de

seleção entre as hélices 5 e 6 (figura 3). A seletividade dos canais CNG pode variar de espécie para espécie embora a maioria funcione como transportadores de K^+ , Na^+ ou Ca^{2+} . Canais CNG possuem em seu C-terminal um domínio de ligação a nucleotídeos cíclicos (CNBD) com similaridade aos CNBDs da maioria dos receptores de nucleotídeos cíclicos.

Figura 3. Figura esquemática de canais CNG. As seis hélices transmembrana estão representadas pelos cilindros azuis e o domínio de ligação a cGMP pelo círculo vermelho. A região do poro está representada entre as hélices S5 e S6.

Canais CNGs ativados por GMP cíclico participam da via de transmissão de sinal que atua na visão e olfato de mamíferos (Biel 2009), na percepção a diferentes sais e consequente quimiotaxia pelo nematodo *C. elegans* (Smith et al. 2013), na fototransdução do caramujo *Lymnaea stagnalis* (Pankey et al. 2010) e na quimiotaxia dos espermatozóides dos ouriços do mar *Arbacia punctulata* e *Strongylocentrotus purpuratus* (Strunker et al. 2006).

1.3.4. Proteínas Quinases dependentes de GMP cíclico (PKGs)

Proteínas Quinases dependentes de GMP cíclico são um dos tipos mais comuns de receptores intracelulares de cGMP. A atividade destas quinases é finamente controlada nas cascatas em que atuam. O centro catalítico desta quinase é mantido inativo através de sua

interação com sequências inibitórias específicas localizadas no seu domínio regulatório. Ao contrario da PKA que é tetramérica, com duas subunidades regulatórias e duas subunidades catalíticas, as PKG possuem seu domínio regulatório e catalítico na mesma sequência polipeptídica, formando um homodímero. O seu N-terminal contém sequências para manter a estrutura de dímero (incluindo uma região contendo um extenso zíper de leucina), uma região similar a PKA e o sítio de inibição, o qual pode ser autofosforilado. Outros dois segmentos têm similaridade com a proteína CAP de *Escherichia coli* compreendendo dois domínios de ligação a cGMP. O resto da molécula é composto pelo domínio catalítico que possui alta similaridade com outras quinases e possui um subdomínio de ligação a Mg^{2+} /ATP e um que se liga a proteína alvo (Scott 1991; Francis et al. 2010). Essa enzima normalmente fosforila serinas e treoninas em um consenso como Arg-Arg-X-Ser ou Arg-Arg-X-Thr sendo que a presença de um resíduo de prolina N-terminal e um resíduo básico C-terminal a esse sítio de fosforilação aumenta as chances que essa fosforilação aconteça. Ambos os nucleotídeos cíclicos ativam a PKG sendo que ela possui 200 vezes menos afinidade por cAMP comparada a cGMP (Scott 1991).

Isoformas de PKGs foram encontradas em diversos tipos de organismos estando presente em cordados, equinodermos, *C.elegans*, *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, entre outros (Johnson and Leroux 2010). A alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* possui duas isoformas que parecem ter papel na adesão e formação dos cílios (Johnson and Leroux 2010).

Uma busca no banco de dados utilizando tanto a sequência correspondente à PKG de mamíferos quanto a correspondente à PKG de *C. reinhardtii* mostrou que esta proteína encontra-se ausente nos Blastocladiomycetos *Blastocladiella emersonii*, *Allomyces macrogynus* e *Catenaria anguillulae*. Também não foi possível encontrar esta proteína no genoma do

quitridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis* embora ela conste como presente neste fungo no trabalho de Johnson e Leroux (2010).

1.4. Fototaxia e rodopsinas

Organismos móveis reagem a múltiplos estímulos do ambiente, incluindo luz, gradientes químicos e térmicos, para selecionar melhores habitats para sobrevivência, crescimento e reprodução (Jekely 2009). Dentre as repostas à luz que foram descritas em microorganismos estão a fototaxia, a resposta fotofóbica e a fotocinética. A fototaxia é o movimento suave em direção (positivo) ou na direção oposta (negativo) a um gradiente de luz e oferece várias vantagens aos organismos que apresentam essa resposta. Este fenômeno inclui a regulação à exposição à luz, a descoberta de organismos fototróficos para o alimento e a facilitação da dispersão larval ou de gametas (Hader and Lebert 2009).

A fototaxia foi descrita tanto em procariotos quanto em eucariotos, porém, somente eucariotos desenvolveram a habilidade de se orientar pela luz de forma tridimensional enquanto procariotos podem somente seguir ao longo de fontes de luz de intensidade muito forte e vetorizada. Os fotoreceptores são ativados por fótons de luz e ativam enzimas sendo os responsáveis pela resposta à luz, incluindo a fototaxia (Hader and Lebert 2009; Jekely 2009). Dentre os tipos de fotoreceptores identificados em microorganismos estão a rodopsina, a fototropina, e o fitocromo. Rodopsinas constituem um grupo diverso de proteínas ativadas por luz que possuem características em comum e foram os primeiros receptores caracterizados estruturalmente. Todas são compostas por sete hélices transmembrana e ligam-se ao cromóforo retinal através de uma base de Schiff por uma lisina localizada no meio da sétima hélice (Brown 2004).

Alguns autores especulam que cianobactérias foram um dos primeiros organismos a realizar fototaxia. Um dos fósseis mais antigos destes organismos, datando de 3,5 bilhões de anos, foi encontrado na Austrália. A detecção de luz confere vantagem evolutiva aos organismos fotossintéticos que tendem a ser atraídos por certa quantidade de luz, mas repelidos pela luz excessiva que poderia ultrapassar a capacidade da maquinaria fotossintética e causar danos ao DNA (Gehring 2014).

Rodopsinas são responsáveis pela fototaxia da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*, permitindo que esta alga se movimente na direção de condições ótimas de luz para a fotossíntese. Este processo é mediado por duas rodopsinas (ChR1 e ChR2) que funcionam como canais iônicos ativados por luz. Quando expressas de maneira heteróloga em células animais, funcionam como fotosensores permitindo o influxo de cátions e assim possibilitando a resposta fototática (Nagel et al. 2002; Berthold et al. 2008; Sineshchekov et al. 2009).

Embora proteínas semelhantes a rodopsinas possam ser identificadas no genoma de diversos fungos, não se sabe ao certo sua função nesse grupo de organismos. Brown (2004) encontrou 77 sequências similares a rodopsinas no genoma de 39 espécies de fungo, sendo que em alguns são encontradas mais de uma sequência semelhante a essa proteína. Apesar do grande indício de conservação dessas proteínas em fungos há poucos estudos de sua função nesses organismos.

Bieszke e colaboradores (Bieszke et al. 1999) também encontraram um gene de opsina, *nop-1*, no fungo filamentoso *Neurospora crassa*, sendo que este gene possui uma possível relação com a conidiação (formação de conídios) desse fungo. Saranak & Foster (1997) observaram que zoósporos de *Allomyces reticulatus*, outro fungo pertencente à classe dos blastocladiomicetos, realizavam fototaxia em direção à luz. Eles sugeriram que essa ação seria

devido à rodopsina cuja excitação máxima seria no comprimento de onda de 530 nm (luz verde) e especularam se a visão tal qual é conhecida hoje, teve sua origem na fototaxia de ancestrais unicelulares. Devido à proximidade filogenética entre *A. reticulatus* e *B. emersonii* e à existência de um domínio rodopsina na guanilato ciclase 1 (BeGC1) decidimos investigar se *Blastocladiella* realizaria fototaxia e se a função de BeGC1 estaria relacionada a este processo.

2. Objetivos

O objetivo principal deste trabalho foi caracterizar a função e localizar intracelularmente as enzimas possivelmente envolvidas na sinalização por cGMP em *B. emersonii*.

Para isso tivemos como objetivos específicos:

- A clonagem e expressão do gene que codifica a enzima fosfodiesterase BePDE bem como a caracterização da enzima recombinante com e sem mutação (E389A) em seu sítio catalítico, sendo este resíduo glutamato conservado somente na família 9A e relacionado à especificidade da enzima em relação à cGMP.
- Obtenção das sequências completas das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3, clonagem dos seus cDNAs, expressão das proteínas recombinantes e produção de anticorpos.
- Utilização de western blots para análise da expressão dessas proteínas ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii* e localização subcelular dessas proteínas nos extratos de zoósporos.
- Imunolocalização dessas proteínas nos zoósporos por microscopia de fluorescência.
- Caracterização da função dos domínios catalítico e de rodopsina de BeGC1 incluindo seus possíveis papéis na fototaxia deste fungo;
- Busca por outras possíveis proteínas que participariam da via de sinalização por cGMP e sua caracterização.
- Comparação das sequências primárias das proteínas encontradas no banco de dados de *Batrachochytrium dendrobatidis*, quitridiomiceto que aparentemente também possui essa via de sinalização, mas que apresenta modo de vida e habitat bastante distintos de *B. emersonii*.

3. Materiais e métodos

3.1. Meios de cultura

Para o crescimento diário de *B. emersonii* foi utilizado o meio PYG-ágar (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,15%, Agar 1%) e para o crescimento sincronizado das células de *B. emersonii* foi utilizado o meio definido DM4 (Maia and Camargo 1974), composto por CaCl_2 1mM; MgSO_4 10 mM; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6 $\mu\text{g/mL}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,1 $\mu\text{g/mL}$; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 $\mu\text{g/mL}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 $\mu\text{g/mL}$; glicose 0,33%; tiamina 0,04 $\mu\text{g/mL}$; glicina 0,2 mM; L-histidina 0,13 mM; L-isoleucina 0,4 mM; L-lisina HCl 0,4 mM; L-metionina 0,1 mM; L-fenilalanina 0,2 mM; L-serina 0,2 mM; L-treonina 0,4 mM; L-triptofano 0,04 mM; L-tirosina 0,2 mM; L-valina 0,4 mM; L-arginina 0,24 mM; ácido glutâmico 2,7 mM; extrato de levedura 120 $\mu\text{g/mL}$; $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1 mM pH 6,8; tampão Tris-maleato 3,5 mM; pH 6,8. O pH do meio foi ajustado com KOH 1M e a concentração final de K^+ foi ajustada para 50 mM com KCl 1M.

As linhagens de *E. coli* utilizadas nesse trabalho foram crescidas em temperaturas que variaram de 37°C a 13°C em meio LB (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH 7,5) ou SOB (triptona 2%, extrato de levedura 5%, NaCl 0,06%, KCl 0,02%, pH 6,8). Quando necessário, foram adicionados os antibióticos específicos como ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), gentamicina (50 $\mu\text{g/mL}$), ou canamicina (50 $\mu\text{g/mL}$) conforme a resistência conferida pelo plasmídeo utilizado. Os meios sólidos contêm ágar 1,5%.

3.2. Cultivo de células de *B. emersonii*

As células foram crescidas sincronicamente através do seguinte processo: zoósporos provenientes de crescimento em placas de meio complexo PYG foram fixados em solução de

formaldeído 3,5% saturada com CaCO_3 e contados em câmara de Neubauer. 2×10^5 zoósporos foram inoculados em 500 mL de meio definido DM4 e a cultura foi incubada durante 14-16 horas a 19°C sob agitação de 150 rpm. As células vegetativas obtidas foram coletadas por filtração através de uma tela Nytex, lavadas em solução de esporulação (tampão Tris/maleato 1mM, pH 6,8, CaCl_2 1mM) e inoculadas em 500 mL da mesma solução a uma densidade de $3,2 \times 10^5$ células/mL. Os zoosporângios foram então incubados a 27°C sob agitação de 150 rpm. Em diferentes tempos após a indução da esporulação, alíquotas foram coletadas para extração do RNA total e das proteínas totais (0, 60, 120 e 150 minutos e zoósporos).

3.3. Extração de DNA de *B. emersonii*

Aproximadamente $2,3 \times 10^9$ zoósporos foram suspensos em 5 mL de solução de esporulação, adicionando-se, em seguida, 5 mL de tampão Tris HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 1 M; SDS 2% e 10 mL de fenol equilibrado no mesmo tampão. Após agitação e centrifugação, foi adicionado etanol 100% gelado à fase aquosa coletada, incubando-se em gelo seco. A mistura foi novamente centrifugada e o precipitado lavado com etanol 70% gelado. O precipitado final foi suspenso novamente em 4 mL de uma solução 1x SSC e dialisado. E seguida foram adicionadas as enzimas α -amilase IIA 200 $\mu\text{g/mL}$, RNase A 400 $\mu\text{g/mL}$ e RNase T1, 280 U. Após 3 horas de incubação, foi medida a absorbância em $\lambda=260$ nm e o tampão de diálise foi trocado até que o valor de absorbância em $\lambda=260$ nm estivesse próximo à zero. Foram adicionados 350 $\mu\text{g/mL}$ de pronase e a solução foi incubada por 2 horas a 37°C.

A solução foi então misturada com fenol saturado em tampão Tris-HCl 0,5 M pH8,0; EDTA 10 mM; NaCl 10 mM; SDS 0,5%, agitada e centrifugada. À fase aquosa foi adicionados 40 mL de etanol gelado, e a solução foi incubada em gelo seco. A suspensão foi centrifugada e o

precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado foi novamente suspenso em 1 mL de 0,1x SSC e dialisado contra 0,1x SSC. A solução contendo o DNA foi estimada medindo-se a absorbância em $\lambda=260$ nm, assumindo -se que a concentração de DNA é 50 µg/mL quando a absorbância é igual a um.

3.4. Extração de RNA total de *B. emersonii*

Aproximadamente $3,2 \times 10^7$ células em esporulação foram coletadas, para cada tempo a ser analisado, por filtração a vácuo e maceradas na presença de nitrogênio líquido e 1 mL de trizol. O macerado foi recolhido em um tubo de 1,5 mL, rapidamente agitado com o auxílio de um vortex e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação por inversão. Para cada 1 mL de trizol foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por 15 segundos com o auxílio de um vortex e mantidos à temperatura ambiente por 3 minutos. Procedeu-se uma centrifugação a 12.000 xg por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi recolhido em um tubo de 1,5 mL estéril ao qual foram adicionados 500 µL de isopropanol. As amostras foram mantidas em gelo seco por 30 minutos e em seguida centrifugadas por 10 minutos a 12.000 xg a 4°C. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75%. Procedeu-se uma centrifugação por 5 minutos, 7.500 xg a 4°C. Após a centrifugação o precipitado foi seco sob vácuo por 10 minutos em um speedvac sem rotação. O RNA total foi então dissolvido em água DEPC e incubado por 10 minutos à temperatura de 60°C. Em seguida procedeu-se a quantificação do RNA total com o auxílio de um espectrofotômetro NanoDrop 200c Thermo Scientific (Abs: 260 nm/280 nm). Aliquotas de 5 µg de todas as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% com o objetivo de verificar a qualidade do RNA.

3.5. Síntese dos cDNAs

Para a síntese de cDNAs a partir do RNA total de *B. emersonii* foi utilizado o kit SuperScript™ Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen™ Life Technologies), conforme instruções do fabricante.

3.6. Reações de amplificação de DNA por PCR

Nas reações de PCR foram usadas quantidades de DNA molde entre 25 e 100 ng e oligonucleotídeos na concentração de 0.2 pmol/μL. Temperaturas de hibridização dos oligonucleotídeos ao DNA estão mostradas na tabela 1, e concentrações de MgCl₂ entre 1 e 2 mM foram usadas nessas reações de amplificação, dependendo do conjunto de iniciadores (Tabela1). Tais reações utilizaram a enzima Taq DNA polimerase e a High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas).

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR

Nome	Utilização	Hibridização (°C)	Sequência (5' - 3')
T7	Amplificação de fragmentos ligados no vetor pGEM-T	50	TATACGACTCACTATAGGG
SP6	Amplificação de fragmentos ligados no vetor pGEM-T	50	ATTTAGGTGACACTATAG
GSP1GC1	Amplificação de parte do gene BeGC1 em reações de RACE 5'	68	GTCCTTGGTCGAGGTGCGCGACGAG
GSP2GC1	Amplificação de parte do gene BeGC1 em reações de RACE 5'	68	CGAGAACCGGATCCACCGCAGGCCG
GSP3GC1	Amplificação de parte do gene BeGC1 em reações de RACE 5'	68	ATGAAGTTGACGCCGAGGAGGCCAGC
GSP1GC2	Amplificação de parte do gene BeGC2 em reações de RACE 5'	68	GGTACTCGCGCTCCTGCTCGGCGT

GSP2GC2	Amplificação de parte do gene BeGC2 em reações de RACE 5´	68	CAGTAGGTGCTCATGTTGCTGCC GCC
GSP3GC2	Amplificação de parte do gene BeGC2 em reações de RACE 5´	68	AGTCGTCGGGGATCGTGTCGAAG GCC
GSP1GC3	Amplificação de parte do gene BeGC3 em reações de RACE 5´	68	ACCTCGCCGCGCAGCATGCGGGG CGCG
GSP2GC3	Amplificação de parte do gene BeGC3 em reações de RACE 5´	68	CGAGTCGTTGCGGCGGAGGGGCT CCT
GSP3GC3	Amplificação de parte do gene BeGC3 em reações de RACE 5´	68	GGCCCGAGTGGATCCCGACCTTG AGC
RT-BeGC1_F	Amplificação do gene BeGC1 em reações de qRT-PCR	60	GACATCTGGTACGGGTACGG
RT-BeGC1_R:	Amplificação do gene BeGC1 em reações de qRT-PCR	60	GGAGATGAGCAGGATGAGGA
RT-BeCNG_F:	Amplificação do gene BeCNG1 em reações de qRT-PCR e clonagem	60	GAATTC CCTGACGTGGTGGGACT ACT
RT-BeCNG_R	Amplificação do gene BeCNG1 em reações de qRT-PCR e clonagem	60	GCGGCCG CTCTCGAACAGGTCA AAGTCG
BePDE-F	Amplificação do gene BePDE para expressão	55	GAATTC ATGGCCAAAGTGAGCCC CACG
BePDE_R	Amplificação do gene BePDE para expressão	55	GCGGCCG CTTACATGGGCTTCTG CATCTT
E389A_F	Amplificação do gene BeGC1 em reações de RACE 5´	55	ATCAGCAACGCGGCGCGCCCCGC C
E389A_R	Amplificação do gene BeGC1 em reações de RACE 5´	55	GCGGGGGCGCGCCGCGTTGCTGA T
Rod_F	Amplificação da região correspondente ao domínio rodopsina do gene BeGC1	55	GAATTC ATGACGCTGTTCTTCCA CGAG
Rod_R	Amplificação da região correspondente ao domínio rodopsina do gene BeGC1	55	GCGGCCG CTGGCGTCCACCTTCT GGTT
BeGC1_F	Amplificação da região correspondente ao domínio catalítico do gene BeGC1	55	GAATTC GAGGCCAAGGAGTACG AGAGC

BeGC1_R	Amplificação da região correspondente ao domínio catalítico do gene BeGC1	55	CTGCAGCTACTTGCGGCCCA CCCA
BeGC2_F	Amplificação de parte do gene BeGC2 para expressão	55	GAATTCATGGACAGCCACGCGC GC
BeGC2_R	Amplificação de parte do gene BeGC2 para expressão	55	GCGGCCGCTTATATCATTTGCAA CAA
BeGC3_F	Amplificação de parte do gene BeGC3 para expressão	55	GAATTCATCCACTCGATGCTGCC GC
BeGC3_R	Amplificação de parte do gene BeGC3 para expressão	55	AAGCTTCGACGGGGCCCGAGTG GATCC

Sítios de restrição destacados em negrito

3.7. Sequenciamento de DNA

Após extração do DNA plasmidial dos clones contendo insertos de interesse utilizando o kit de extração de DNA plasmidial da Invitrogen, 100 ng de DNA foram utilizados na reação de sequenciamento, realizada com o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e o sequenciador ABI Prism 3130XL Genetic Analyser (Hitachi - Applied Biosystems), do Serviço de Sequenciamento de DNA do Instituto de Química da USP (SSDNA). As reações de sequenciamento foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 2400 da Applied Biosystems em um ciclo de desnaturação a 96°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.8. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação

Uma colônia isolada de *E. coli* (DH5α) foi inoculada em 5 mL de meio SOB e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm por 16 horas. No dia seguinte, os 5 mL da cultura foram inoculados em 500 mL de meio SOB e incubou-se sob agitação de 200 rpm a 37°C até a cultura

atingir a absorbância (Abs) a 600 nm entre 0,45 e 0,6. As células foram centrifugadas a 7.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 500 mL de água milli-Q estéril gelada. As células foram novamente lavadas com 100 mL de glicerol 10% estéril gelado. Procedeu-se nova centrifugação por 10 minutos a 3.000 x g a 4°C e em seguida as células foram novamente suspensas em 1 mL de glicerol 10%. Alíquotas foram feitas com 30 µL de células e congeladas a -80°C.

3.9. Preparo de células competentes para transformação por choque térmico

Uma colônia isolada de *E. coli* das linhagens de expressão (BL21, Origami, ArcticExpression e OverExpress) foi inoculada em 3 mL de meio SOB e incubada a 37°C, sob agitação de 200 rpm por 16 horas. No dia seguinte, os 1 mL da cultura foram inoculados em 100 mL de meio SOB e incubou-se sob agitação de 200 rpm a 37°C até a cultura atingir a absorbância a 600 nm próxima a 0,5. A cultura foi transferida para os tubos de centrífuga e incubada em gelo por 10 minutos. As células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com 10 mL de 0,1M de cloreto de cálcio (CaCl₂) gelado. As células foram novamente suspensas em 2 mL de 0,1M de CaCl₂ gelado acrescido de 10% de glicerol e alíquotas foram feitas com 100 µL de células e congeladas a -80°C.

3.10. Transformação de *E.coli*

A transformação de *E. coli* linhagem DH5α com os plasmídeos foi realizada por eletroporação. Para isso as células foram descongeladas em gelo, acrescidas de produto de ligação dialisado, seguido de eletroporação em cubetas de 0,1 cm de largura utilizando um pulso de 1,85 kV, 25µF e 200Ω no aparelho Gene pulser (Bio-RAd). Por sua vez, a transformação das

E. coli das linhagens de expressão (BL21, Origami, ArcticExpression e OverExpress) foi realizada por choque térmico sendo as células mantidas por 30 minutos em gelo seguido de 90 segundos a 42° C e 3 minutos de gelo. Em ambos os casos as células foram recuperadas em meio LB por uma hora a 37° C e plaqueadas em LB contendo o antibiótico para seleção dos transformantes.

3.11. Isolamento de plasmídeos e fragmentos de DNA, digestão com enzimas de restrição e ligação dos clones obtidos.

Os plasmídeos foram extraídos das bactérias pelo método de lise alcalina, utilizando o kit de extração de DNA plasmidial da Invitrogen. O isolamento de fragmentos de DNA de interesse foi realizado através de eletroeluição em tampão TBE 0,5x numa tensão de 100 V, seguido de uma purificação com fenol-clorofórmio (1:1) e precipitação com acetato de sódio e etanol. As digestões de DNA foram feitas com enzimas de restrição FastDigest (Fermentas) utilizadas com os tampões fornecidos pelo fabricante. Os fragmentos resultantes da amplificação por PCR, da digestão ou da extração plasmidial foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM, com pH de 8.0), corridos a 100V por 40-60 min, corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

As ligações foram feitas utilizando vetor e fragmentos de DNA na proporção de 1:3, todos digeridos com as enzimas de restrição adequadas. Tais reações utilizaram a enzima T4 DNA ligase (Invitrogen).

3.12. Experimentos de RACE 5' (Rapid Amplification of cDNA Ends)

A fim de se conseguir as sequências completas das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3 foi utilizado o GeneRacer™ Kit, Invitrogen, de acordo com as instruções do fabricante.

Este ensaio promove a obtenção somente de mRNAs íntegros e os liga à uma sequência oligonucleotídica determinada (GeneRacer™ RNA Oligo) na extremidade 5` do transcrito. Após síntese de cDNA a partir de mRNA utilizando um oligonucleotídeo iniciador poli-T cDNA, é realizado um PCR no qual fragmentos são amplificados utilizando iniciadores específicos (tabela 1) e iniciadores fornecidos pelo kit (GeneRacer™ Primer). Os produtos resultantes de PCR foram analisados em gel de agarose 1%, purificados e ligados em vetor pGEM®-T vector system (Promega) e sequenciados.

3.13. Clonagem e expressão das proteínas recombinantes

As sequências codificadoras das proteínas foram amplificadas por PCR com iniciadores específicos (tabela 1). A clonagem foi feita por ligação dos insertos em vetor pGEM-T, conforme o recomendação do fabricante. Após sequenciamento, eles foram subclonados em vetores de expressão, de modo que as proteínas recombinantes expressas possuem seis resíduos de histidina na porção amino-terminal (esses resíduos são codificados pelo vetor).

Para a extração de proteína recombinante em larga escala, culturas saturadas foram diluídas 100x em LB contendo os antibióticos específicos de acordo com cada vetor e crescidas até a fase exponencial. A expressão das proteínas recombinantes foi então induzida através da adição de IPTG de 0,3mM a 0,5mM quando a Absorbância a 600 nm da cultura alcançava um valor entre 0,45 a 0,65. As temperaturas de expressão variaram de 37° C a 13° C dependendo da linhagem de bactéria utilizada. As culturas foram então centrifugadas, suspensas em 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 100 mM, imidazol 10 mM e PMSF 0,5 mM) e sonicadas com 4 pulsos de 15 segundos. Os lisados foram centrifugados, separando-se o sobrenadante do precipitado. Para purificação foi utilizada uma coluna de níquel Ni-NTA

Agarose (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante. Amostras de cada uma das frações bem como da proteína purificada foram analisadas em gel SDS-PAGE, seguido ou não por experimentos de western blot

3.14. Obtenção da mutação E389A na proteína recombinante BePDE

Para a obtenção de mutações sítio-dirigidas, um par de oligonucleotídeos complementares entre si e que contém os respectivos nucleotídeos alterados foi construído (tabela1). Esses oligonucleotídeos foram usados separadamente em reações de PCR com outro iniciador na orientação inversa. Uma vez que os dois fragmentos obtidos se sobrepõem parcialmente na região correspondente aos oligonucleotídeos contendo a substituição, ambos foram usados como molde em outra reação de PCR contendo apenas os iniciadores específicos. O produto dessa reação foi ligado no vetor pGEM-T e sequenciado para confirmar a presença da mutação pontual E389A e certificar-se de que essa é a única mutação gerada.

3.15. Ensaio de atividade da fosfodiesterase

Culturas bacterianas contendo as construções foram crescidas por 3h a 20° C e induzidas por 3h a 4h a 20° C. As culturas foram então centrifugadas, suspensas novamente em 2 mL de tampão fosfodiesterase (50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM de MgCl₂) e sonicadas com 4 pulsos de 15 segundos. Os lisados foram centrifugados a 12.000 xg por 10 minutos a 4° C e, em seguida, a fração solúvel foi utilizada para o ensaio. O ensaio foi feito adicionando 50 µL da fração solúvel do lisado celular ou 50 µL de H₂O Milli-Q e 50 µL de solução contendo o substrato da reação em tampão fosfodiesterase (50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 10 mM de MgCl₂) sendo o volume final de 100 µL e a concentração final de 10 mM de cGMP na primeira condição, 10 mM de cGMP e 10 mM de cAMP na segunda condição e 10 mM de cGMP e 100 mM de cAMP na

terceira condição. A reação foi incubada a 30° C por 1h e parada com 100 µL de solução 0,2M HCl. O conteúdo foi então diluído 10 vezes em 0,1M HCl e a quantidade de cGMP quantificada com o “Cyclic GMP Direct ELISA Kit” da Abcam, segundo o protocolo do fabricante. O conteúdo de cGMP era avaliado sendo utilizados como parâmetros a reação sem enzima e o lisado celular de bactérias induzidas contendo o plasmídeo pET28a vazio.

3.16. Western Blots

Extratos totais de zoósporos foram preparados por congelamento e descongelamento das células. As células intactas foram separadas por uma centrifugação de 5 minutos a 1.000 xg e o sobrenadante foi em seguida passado por mais uma centrifugação de 10 minutos a 12.000 xg. O precipitado dessa centrifugação foi guardado (12.000 ppt) e o sobrenadante seguiu para uma centrifugação de 100.000 xg por 20 min. Todas as centrifugações foram feitas a 4°C. O precipitado resultante (100.000 ppt) e o sobrenadante (100.000 sup) foram guardados e todas as frações analisadas em gel SDS-page seguidas de transferência para membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com uma diluição de 1:100 dos anticorpos em TBS-T (Tris-HCl, pH 8.0, contendo 150mM NaCl, 0.002% Tween 20, e 0.03% Triton X-100). Foi utilizado como anticorpo secundário o anticorpo fluorescente de cabra anti-IgG de coelho CF680 (Uniscience) na diluição de 1:10000. A fluorescência foi detectada no Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences; Lincoln, NE). Os anticorpos policlonais foram obtidos da imunização de coelhos fêmeas com as proteínas recombinantes purificadas. Como controle foram utilizados o soro policlonal contra BePAT1 uma ATPase membrana de *B. emersonii* (Fietto et al. 2002) e anti- α -tubulina (Sigma). Para os experimentos de avaliação dos níveis protéicos em diferentes tempos de esporulação células foram crescidas e induzidas à esporulação conforme o item 4.2., em seguida alíquotas foram coletadas em diferentes tempos de

indução e congeladas em gelo seco. As amostras foram então maceradas e o conteúdo protéico avaliado pela técnica de Bradford. A quantidade de proteína foi equalizada e as amostras resolvidas em gel de SDS-page seguido por western blot utilizando os anticorpos específicos conforme descrito acima.

3.17. Fototaxia em placa

Células vegetativas foram crescidas e induzidas à esporulação no escuro. Nos ensaios foi analisada a capacidade dos zoósporos de nadarem em direção à luz. 1×10^5 zoósporos foram inicialmente inoculados em placas contendo meio de cultura e uma fina camada de água (1mL) de forma que os zoósporos possam nadar livremente. As placas são então inseridas em envelopes plásticos pretos contendo uma abertura de 0,5 cm de diâmetro na posição diretamente oposta a qual eles foram inoculados. Nesta posição foram aplicadas fontes de luz pontual (LED) de dois comprimentos de onda diferentes: 522 ± 17 nm com 4.4 mW/cm^2 de intensidade e 633 ± 13 nm com 4.4 mW/cm^2 de intensidade. Após 4h de incubação desse sistema a temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 17°C para crescerem, observadas a microscópio óptico e a fração de zoósporos que germinaram, na posição onde a luz foi aplicada, é determinada por contagem de zoosporângios. Como controle, o mesmo experimento foi realizado porem sem aplicação da fonte de luz. Para avaliação do efeito do inibidor de rodopsinas hidroxilamina, zoósporos foram expostos à $500 \mu\text{M}$ de hidroxilamina e luz verde (522 ± 17 nm, 4.4 mW/cm^2) por 10 minutos. Em seguida procedeu-se o experimento conforme descrito anteriormente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.18. Fototaxia em câmara de microfluídica

Zoósporos foram injetados em uma câmara de microfluídica opaca contendo uma região transparente oposta à região contendo o canal de injeção. As células foram observadas em um microscópio óptico de luz invertida em uma sala escura. A câmara possui 4 cm de comprimento, 100µm de altura e 1 mm de largura. A luz do microscópio era mantida ligada por dez minutos na condição “luz” e desligada na condição “escuro”. Foram utilizadas três faixas do espectro visível: luz verde (565 ± 25 nm; $55 \mu\text{W}/\text{cm}^2$); luz azul (465 ± 25 nm; $67 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) ou luz vermelha (620 ± 30 nm; $35 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). O número inicial de células na região transparente era contado e durante 10 minutos as células nadavam livremente. Após este tempo o número de células eram novamente contado. Nos experimentos utilizando os análogos de retinal foram utilizados zoósporos crescidos na presença do inibidor de carotenogênese Norflurazon ($50\mu\text{M}$) por três gerações. Os zoósporos foram então incubados com $5\mu\text{M}$ de retinal A1 ou retinal A2 por 40 minutos no escuro antes do teste de fototaxia. Experimentos também foram realizados utilizando $10\mu\text{M}$ do inibidor de guanilato ciclase LY83583. Quatro replicas biológicas independentes foram feitas para cada experimento e a contagem de células foi normalizada de acordo com a densidade celular. A mesma suspensão de zoósporos foi utilizada para as duas condições em cada réplica. A significância estatística foi feita utilizando Student's Test sendo $p < 0,05$.

3.19. Microscopia de imunofluorescência

Zoósporos foram coletados por centrifugação a 1.000 xg por 5 min e fixados por 30 min com 4% paraformaldeído 1% cloreto de cálcio. Em seguida as células foram permeabilizadas com PBS 0,1% Triton X-100, bloqueadas com 1% albumina bovina (BSA) e incubadas com soro específico produzido em coelho e/ ou anti- α -tubulina de camundongo (1:100). Após lavagem as

células foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa-Fluor 488 (Molecular Probes) e anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa-Fluor 555 (Molecular Probes), lavadas novamente e visualizadas em microscópio de fluorescência. Para visualização dos grânulos de lipídeos foi utilizado o corante específico para lipídeos Nile Red (1:10000). As imagens foram feitas no microscópio Nikon Eclipse E600 e submetidas à deconvolução pelo programa de processamento de imagens Huygens Essential.

3.20. Determinação dos níveis intracelulares de GMP cíclico

Foram realizados dois experimentos para medição dos níveis de cGMP: um no qual os níveis foram comparados na presença e na ausência de hidroxilamina (experimento A) e um no qual as células foram crescidas na presença de Norflurazon e complementadas ou não com Retinal A1 (experimento B). No experimento A, células vegetativas foram crescidas e induzidas à esporulação no escuro. Em seguida, os zoósporos foram coletados, filtrados em membrana de náilon, diluídos em água na concentração 8×10^6 células/ ml e separados em duas frações: em uma foi adicionada 500 μ M de hidroxilamina e em outra foi adicionada o mesmo volume em água. As duas frações foram expostas por 10 minutos à luz, seguidas de 10 minutos no escuro, para bloqueio da rodopsina. Os zoósporos foram então expostos novamente à luz e, em diferentes tempos, alíquotas de 900 μ L foram coletadas em tubos contendo de 100 μ L de 1M HCl e imediatamente congeladas em gelo seco. No experimento B, células vegetativas foram crescidas por duas gerações na presença de 50 μ M de Norflurazon e induzidas à esporulação no escuro. Em seguida, os zoósporos foram coletados, filtrados em membrana de náilon, diluídos em água na concentração 8×10^6 células/ mL e separados em duas frações: em uma foi adicionada 10 μ M de Retinal A1 e em outra foi adicionada o mesmo volume em água. Os zoósporos foram então expostos à luz e, em diferentes tempos, alíquotas de 900 μ L foram coletadas em tubos contendo

de 100 μL de 1M HCl e imediatamente congeladas em gelo seco. Em ambos os experimentos foi utilizada uma fonte de luz verde de 522 ± 17 nm de comprimento de onda e 4.4 mW/cm^2 de intensidade.

Todas as alíquotas foram descongeladas ao mesmo tempo e utilizadas para dosagem de GMP cíclico intracelular com o kit EIA Direct cyclic GMP kit (Sigma), o qual é baseado em na competição entre o cGMP intracelular com a molécula de cGMP ligada à enzima fosfatase alcalina provida pelo kit, pelo anticorpo específico. Todos os ensaios foram feitos em triplicata.

3.21. Determinação da variação do potencial de membrana por microfluorimetria

Para detectar variações no potencial de membrana foi utilizado o kit Membrane Potential Assay kit (Membrane Potential Assay kit BLUE, Molecular Devices) e o aparelho FlexStation III (Molecular Devices Corp., Sunny Valley, CA), segundo as recomendações do fabricante. 5×10^6 zoósporos em solução de esporulação foram inoculados em cada poço (100 μL) de uma placa de 96 poços preta com fundo transparente. As células eram incubadas por 60 minutos a 30° C com o corante azul fornecido pelo kit diluído 10 vezes contendo 1.8 mM de Probenecid, sendo o volume final 200 μL por poço. A fluorescência das amostras foi detectada a 488 nm e a fluorescência emitida foi detectada utilizando o filtro 540-590 nm Band Pass Emission FLIPR. As amostras foram lidas em intervalos de 1 segundo durante 120 segundos. Para medida dos níveis de potencial de membrana das células em repouso foram utilizados os 30 primeiros segundos do monitoramento da intensidade de fluorescência basal. Agentes despolarizantes (KCl em concentrações de 60mM) ou 3mM de cGMP ou cAMP foram adicionados às células na presença e na ausência do inibidor de canais responsivos a nucleotídeos cíclicos Cis-diltiazem (10 μM). As respostas aos agentes adicionados foram determinadas calculando o pico de fluorescência menos

a fluorescência basal utilizando o software SoftMax2Pro (Molecular Devices Corp.). Os dados foram expressos em valores médios $\pm$ erros padrão.

3.22. Avaliação do fluxo de potássio por microscopia de fluorescência

5×10^6 zoósporos em solução de esporulação (pH 7.4) foram inoculados em cada poço (100 μ L) de uma placa de 96 poços preta com fundo transparente com 1.8 mM de Probenecid, 0.06% de surfactante não iônico ácido plurônico F-127 (Sigma Aldrich) e 10 μ M do corante fluorescente PBFI, AM (Molecular Probes) por 60 min at 30 °C. Após esse período as células foram acrescidas de uma fina camada (10 μ L) de 1% ágarose low melting point (Sigma) (concentração final 0,1%) acrescida de 0.1 μ M de KCl para imobilização das células. As imagens foram feitas utilizando o Microscópio invertido ECLIPSE-TiS (Nikon, Melville, NY) equipado com a câmera CCD de alta resolução 14 bit CoolSNAP HQ2 (Photometrics, Tucson, AZ) e analisado utilizando o software NIS-Element (Nikon) usando taxas de aquisição de imagem de 2 frames por segundo. O corante fluorescente foi excitado utilizando uma lâmpada de xenônio a 340nm ou 380nm e a luz emitida foi detectada utilizando um filtro de seleção de 515–530 nm. O influxo de potássio foi monitorado em células estimuladas com 60 μ M de KCl ou 3mM de cGMP ou 3mM de cAMP. 20 células foram analisadas em cada experimento independente. A variação média entre as razões de intensidade de fluorescência obtidas com a excitação do corante PBFI nesses comprimentos de onda (340/380 nm) foi usada para determinar a concentração de potássio (K^+) durante o estímulo (F) e durante o estado de descanso (F_0). Esses valores foram normalizados pela fluorescência basal e apresentados no gráfico como média da variação da intensidade de fluorescência (F/F_0) $\pm$ erros padrão.

3.23. RT-PCR quantitativo em tempo real

As reações de PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o *kit* Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) em um equipamento GeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems).

Para a síntese dos cDNAs, foram utilizados 5µg de RNA total previamente tratado com DNase, 200 U de transcriptase reversa SuperscriptII (Invitrogen), 50 ng de oligonucleotídeos aleatórios, 250 ng de oligo-dT, 2,5 mM de dNTPs, 10 mM de DTT, 40 U de RNase OUT e tampão 1x da transcriptase reversa. Os cDNAs obtidos foram diluídos em água *milli-Q* para a concentração final de 2 ng/µL. Em seguida, foi realizada a reação de PCR utilizando 10 ng de cDNA como molde, 800 nM de oligonucleotídeo direto e reverso (tabela 1) e 10 µL de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), sob os seguintes parâmetros: 50°C por 2 min, 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 15 seg e 60°C por 1 min. A especificidade dos produtos amplificados foi avaliada pela análise das curvas de dissociação geradas pelo aparelho. Para cada gene e ponto de esporulação três amostras independentes foram analisadas. O gene codificando a helicase-like mitocondrial de RNA foi utilizado como calibrador em todos os experimentos. A determinação das razões de expressão foi feita utilizando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak and Schmittgen 2001).

4. Resultados e Discussão

Com o objetivo de caracterizar as possíveis vias de sinalização envolvendo cGMP em *B. emersonii* decidimos investigar genes e proteínas componentes dessas vias. Com este intuito, iniciamos a caracterização da fosfodiesterase BePDE, com provável especificidade por cGMP, e três guanilil ciclases putativas: BeGC1, BeGC2 e BeGC3.

4.1. Caracterização da fosfodiesterase BePDE

4.1.1. Comparação da sequência de BePDE com as fosfodiesterases presentes no banco de dados do NCBI

Uma fosfodiesterase (PDE) supostamente com alta especificidade para a hidrólise de GMP cíclico (cGMP) a 5' GMP, denominada BePDE, havia sido identificada em *B. emersonii* em trabalhos anteriores (Vale et al. 1975; Vale and Maia 1976; Vieira et al. 2009). Assim para melhor caracterizar esta fosfodiesterase, a sequência deduzida de aminoácidos da BePDE foi submetida a uma análise de similaridade com sequências depositadas em bancos de dados públicos, utilizando o algoritmo “blastp”, do programa Blast do NCBI. Na tabela 2 são mostrados os cinco maiores “scores” de identidade das sequências de aminoácidos dessas PDEs com a sequência deduzida de BePDE.

Como se pode notar a sequência de BePDE tem grande similaridade com a fosfodiesterase encontrada no quitridiomyceto *Batrachochytrium dendrobatidis* e com fosfodiesterases pertencentes à família 9A de vertebrados. Essa família possui alta afinidade por cGMP e apresenta um grande número de isoformas. Nota-se que as enzimas dessa família são específicas para degradação de cGMP e enzimas semelhantes às dessa família estão presentes em diversos organismos. Até o momento foram descritas cerca de 20 diferentes isoformas de fosfodiesterases

pertencentes à família 9A indicando a diversidade e a grande frequência de processamento alternativo nessa família (Keravis and Lugnier 2012).

Atualmente 11 famílias de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos foram descritas. A fim de obter maiores informações acerca dos resíduos conservados entre essas diferentes famílias de fosfodiesterases, a sequência peptídica foi submetida a um alinhamento no qual BePDE foi comparada com representantes de outras famílias. O alinhamento mostrou que os resíduos conservados entre as 11 famílias de fosfodiesterases estão conservados também na sequência de BePDE incluindo os resíduos responsáveis pela coordenação dos íons divalentes magnésio e/ou manganês (figura 4).

Tabela 2 – Comparação da sequência de aminoácidos de BePDE com sequências depositadas no banco de dados do NCBI

Acesso	Descrição	Identidade	Valor “e”
ACS49836.1	cGMP phosphodiesterase [Blastocladiella emersonii]	100%	0.0
XP_006682624.1	hypothetical protein BATDEDRAFT_28314 [Batrachochytrium dendrobatidis JAM81]	46%	2e-147
XP_007227975.1	PREDICTED: high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like [Astyanax mexicanus]	44%	8e-137
XP_003199258.1	PREDICTED: high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A [Danio rerio]	42%	5e-135
XP_006636400.1	PREDICTED: high affinity cGMP-specific 3',5'-cyclic phosphodiesterase 9A-like [Lepisosteus oculatus]	42%	9e-134
XP_002614098.1	>gb EEN70107.1 hypothetical protein BRAFLDRAFT_67316 [Branchiostoma floridae]	41%	5e-133

Descrição dos “hits” que possuem os cinco maiores “scores” de identidade da sequência de aminoácidos de BePDE com sequências depositadas no NCBI utilizando o programa “blastp”.

É interessante ressaltar que o resíduo de ácido glutâmico 389 (E389), conservado somente em BePDE e na representante da família 9A, é descrito como o aminoácido responsável pela alta especificidade dessa família para degradação de cGMP (Liu et al. 2008). Segundo estes autores, o glutamato 389 fixaria a orientação e a ajudaria a polarizar a glutamina 436 para sua ótima interação com a base guanina, favorecendo assim a especificidade dessa enzima por cGMP.

BePDE PKYVFTDETVAYLKQPSFNNWQW--EENEMVALIEHMFSEGLIERFKIELPLKRLFLHTVKDNY-N-NNP[•]PHN[•]FR[•]CFVQTMFYGIVNVTK
PDE1B VINCLKNLDLWCFDVFPSIN-QAA--DDHALRTIVFELLTRNLISRFKIPTVFLMSFLDALETGYGKYKNPYHNQIHAA[•]DVTQIVHCFLLRTG
PDE2A DGIQFVAIDSNFASFTYTPRSL--PEDDTSMALLSMQDMNFINNFKIDCPTLARFCIMWKKGY-R-DPPYHNW[•]MAF[•]SVSHFCVLLYKNLE
PDE3A LDSIMEQLNTWNFPIFDLVENIGRKGGRILSQVSYRIFEDMGLFEAFKIPIREFMNYFHAEIGY--RDIPYHNRI[•]HAT[•]DVLHAWVLLTQPI
PDE4A LAQELNENLWGLNIFCVSDYAG--GRS-LTCDMYIFQERDILLKFRIPVDIMVTYMLTLEDHY-HADVAYHNSLHAA[•]DVLQSTHVLLATPA
PDE5A AAAYVPSAQTLKITDPSFSDFEL--SDLEALCTIRMTDINLVQNFQMKHEVLCHWILSVKKNY-RKRVAYHNRH[•]AFNTAQCMFAALKRAGK
PDE6 LQALPDADRYEINKFHFSDLEL--TELELVKOGIQMYELKVVDFKHIPQEA[•]LVRFMYSLSKGY-R-KITYHNW[•]RHGFN[•]VGQDMF[•]SLLVTKG
PDE7A AKOMLEKVGNNFDFIFLDRLLN--G-NSLVSLTFHIFSLHGLIEYFHLDMKLRFLVMIQEDY-H3QN[•]PYHN[•]AVH[•]AA[•]DVTQAMHCYLKEPK
PDE8A IARAMENEEYWD[•]FDI[•]FELEAATH--NR-FLIYGLRMFARFQICEFLHCSESTLR[•]SWLQII[•]EANY-H3SN[•]PYHN[•]STH[•]SAD[•]VLHATAYFLSKER
PDE9A PKYLLSPETIEALKKPTFDVWIM--EPNEMLSCEHMYHDLGLVRDPSINPITLR[•]WLLCVHDNY-R-NNP[•]PHN[•]FR[•]CFVQTMFYGIVNVTK
PDE10 VERALALADEWKYDTWHAEVTK--G--ALSCIGFYILHREG[•]LISQ[•]FRIKPTKLLR--SIEAGY-A-DNPYHN[•]STH[•]AA[•]DVLQTFHVMRGAL
PDE11 R--VPSAVHERLHDFKDDIHE--EDDTLKACLRMLDLID[•]FVERPHIDYELCHWILSVKKNY-R-NVTYHNW[•]RHAF[•]NTAQCMFAILLTTQ

BePDE -----IMDKVEPIDLLIGLVACII[•]HDIDH[•]PGF[•]NNAYQV[•]NARTELATVYN-DQSP
PDE1B -----MVHCLSEIELLAI[•]FAA[•]AIDHYEHT[•]GTINS[•]FHQ[•]TKSECAIVYN-DRSV
PDE2A -----LTNYLEDIEIFALFISCMCHD[•]LH[•]RG[•]TNNS[•]FQV[•]AKSVIAALYSSEGSV
PDE3A PGLSTVINDHGSTDSDSDSGFTHGMGYVFSKTYNUTDKYGC[•]LSGNI[•]PALE[•]LMALY[•]VAA[•]AMHDYD[•]HPGR[•]TNA[•]FLVAT[•]SAPAVLYN-DRSV
PDE4A -----LDAVTDIEILAA[•]FAA[•]AIDHVD[•]H[•]PGV[•]SNQ[•]FLINTNS[•]EALMYN-DESV
PDE5A -----IQNKLTDLIEILALL[•]TAA[•]LSHOLD[•]H[•]RGV[•]MNS[•]YIQR[•]SEHPLA[•]QLYC-H-SI
PDE6 -----LKRYTDLIEALAMV[•]TAA[•]FCHD[•]IDH[•]RG[•]TNN[•]LYQ[•]MKS[•]QNPLAK[•]LHG-S-SI
PDE7A -----LANSVTPWDILLS[•]LIAA[•]ATHOLD[•]H[•]PGV[•]NQ[•]FLIK[•]INHYLATLYK-NTSV
PDE8A -----IKETLDPIDEVAAL[•]TAA[•]TIDHVD[•]H[•]PGRT[•]NS[•]FLC[•]NGS[•]EALILYN-DTAV
PDE9A -----LQEKFSQMDILVLM[•]TAA[•]ICHOLD[•]H[•]PGV[•]YNN[•]YQINARTELAVRYN-DISP
PDE10 -----TTHYLDRVGLLAAY[•]FAA[•]MVHDH[•]GH[•]PLTAD[•]FLIAT[•]SDPLAVRYN-DRSP
PDE11 -----WWWIFGEIECLALI[•]IGCLCHOLD[•]H[•]RG[•]TNNS[•]FQIK[•]ASS[•]PLA[•]QLYS-T-ST

BePDE -----LENHHC[•]AVGFT[•]IR-NKDCNI[•]FKNLT[•]DREYDAARKGIVRCV[•]LS[•]DLTKHSDIMAK[•]FKVVADN-----FSFTD[•]FEHR-----
PDE1B -----LENHHIS[•]SVFRLMQ--DEEMNI[•]FINLT[•]KDEFV[•]ELRALV[•]EMVLATDMSC[•]HFQ[•]VKT[•]MKTALQ-----QLERID[•]PK-----
PDE2A -----MERHH[•]FAQAIA[•]IIN--THG[•]CNI[•]FDH[•]FS[•]RKDYQ[•]RLMD[•]MRD[•]ILAT[•]DLAHLRI[•]FKD[•]LQ[•]MAEVG-----YDRN[•]NKQH-----
PDE3A -----LENHH[•]AAAWNL[•]MSR[•]EY[•]NFLIN[•]L[•]DHVE[•]FKH[•]FRFLV[•]IEAILAT[•]DLK[•]HFDFVAK[•]ENGK[•]VNDVVG-----IDWTNEND[•]-----
PDE4A -----LENHH[•]LAVGFK[•]LIQ--EINC[•]DIF[•]QNL[•]SKRQ[•]RS[•]LRK[•]WID[•]MLATDM[•]SKHMT[•]L[•]ADIK[•]TMVET[•]KKVTS[•]SG-----VL[•]L[•]D[•]NYSDR-----
PDE5A -----MEHH[•]FDQCLMIIN--SPGNQ[•]ILSGLSIEEYK[•]TKL[•]KIKQAILAT[•]DLALYIKRRGE[•]FFELIRKN-----Q[•]N[•]LED[•]PHQK-----
PDE6 -----LERHH[•]LEFGK[•]TLIR--DESIN[•]IQNL[•]NRRQ[•]HEHA[•]HM[•]DI[•]AI[•]IAT[•]DLALYFKKRT[•]MPQ[•]KIVD[•]QSKTYESE-----QEW[•]TYM[•]LEQ[•]TRK-----
PDE7A -----LENHH[•]WRS[•]AVGLIR--ESG--LF[•]SHLP[•]LES[•]RQ[•]QMET[•]QIGAL[•]ILAT[•]DSRQ[•]NEVLS[•]LRSHLD[•]RG-----DL[•]CL[•]ED[•]TRHR-----
PDE8A -----LES[•]HH[•]ALAFQ[•]LIT[•]GDKCNI[•]FKN[•]MERNDY[•]RLRQ[•]Q[•]ID[•]MLATE[•]MTK[•]HEH[•]W[•]NK[•]FVNS[•]INK[•]PLAT[•]LEEN[•]GET[•]DRN[•]QEVINT[•]ML[•]TR[•]PENR-----
PDE9A -----LENHH[•]CAIAFQ[•]ILA--RPECNI[•]FAS[•]V[•]PEG[•]FRQ[•]IRQ[•]MIT[•]ILILAT[•]DMARHAE[•]IMDS[•]FK[•]EMEN-----FDY[•]NEEHL-----
PDE10 -----LENHH[•]GA[•]FTMLMQ--SDMN[•]VLAQ[•]L[•]Q[•]HEK[•]NA[•]FRK[•]Q[•]LDL[•]VMATDM[•]KQ[•]HFT[•]LLSH[•]NTA[•]HL[•]PAYN[•]KEAG[•]PA[•]LV[•]AE[•]PA[•]PTTN[•]QSG[•]TEQ[•]ASGGA-----
PDE11 -----MEHH[•]FDQCLMIIN--SPGNQ[•]ILANLSS[•]DOY[•]CRVIR[•]VLEDAIL[•]ST[•]DLAVY[•]FKR[•]RG[•]PF[•]LES[•]V[•]SQ[•]P-----TSY[•]W[•]VAE[•]EP-----

BePDE -----MQLLV[•]MM[•]VECAD[•]ISNEAR[•]PADVAE[•]PWLDCL[•]LEYFA[•]QSD[•]REK[•]AE[•]G-LFVAF[•]PM[•]DRD[•]K-VIK
PDE1B -----FALS[•]ILL[•]HAAD[•]ISH[•]PT[•]KQ[•]LVH[•]SW[•]TKAL[•]ME[•]FFR[•]Q[•]G[•]DE[•]AE[•]LG-LF[•]FS[•]PL[•]CD[•]HTS-TLV
PDE2A -----RLLLC[•]LLMTS[•]CDLS[•]DQ[•]TK[•]GW[•]TK[•]RAEL[•]LY[•]KE[•]FF[•]SG[•]DL[•]E[•]KAMGN-RP[•]MD[•]MD[•]REK[•]-AYI
PDE3A -----LIVC[•]QMC[•]IKLAD[•]ING[•]PAK[•]CKEL[•]HLQ[•]NTD[•]GVNE[•]FYE[•]Q[•]DEE[•]ASLG-LF[•]IS[•]FT[•]MD[•]RS[•]A-PQL
PDE4A -----IQVLR[•]MM[•]VCAD[•]LSN[•]TK[•]PLE[•]YRQ[•]WTR[•]IME[•]FF[•]Q[•]G[•]DR[•]EREG-ME[•]IS[•]RM[•]CD[•]HT-ASV
PDE5A -----ELFLAM[•]MTAC[•]DL[•]SAIT[•]K[•]FW[•]FI[•]Q[•]RI[•]AE[•]LVATE[•]FFD[•]Q[•]G[•]DR[•]ERKELN[•]IEPT[•]DL[•]MM[•]REK[•]NI
PDE6 -----EIVMAM[•]MTAC[•]DL[•]SAIT[•]K[•]FW[•]EQ[•]SV[•]QVALL[•]VAE[•]FW[•]EQ[•]GL[•]ERTVL[•]Q[•]Q[•]ME[•]IR[•]MD[•]DR[•]KADEL
PDE7A -----HIVLQ[•]AL[•]KCAD[•]ICN[•]PCRT[•]WEL[•]SKQ[•]SEK[•]VTE[•]FF[•]Q[•]G[•]DE[•]KK-YHL[•]GV[•]SL[•]CD[•]HT-ESI
PDE8A -----TLIK[•]RM[•]IKCAD[•]VS[•]NP[•]CP[•]LYC[•]IEWA[•]ARI[•]SE[•]Y[•]FS[•]Q[•]TDEE[•]KQ[•]GL[•]PV[•]MM[•]FD[•]DRNT-CSI
PDE9A -----TILK[•]ML[•]IKCAD[•]ISNEAR[•]PADVAE[•]PWLDCL[•]LEYFA[•]QSD[•]REK[•]AE[•]G-LFVAF[•]PM[•]DRD[•]K-VIK
PDE10 -----ARGAEG[•]DIDGAE[•]AAVS[•]FTLL[•]GT[•]FD[•]PT[•]PLD[•]DTERT[•]TL[•]VA[•]KAAD[•]L[•]GLH[•]LGEE[•]LEV[•]H[•]K[•]RV[•]RALE[•]EE[•]FFR[•]Q[•]G[•]DE[•]LARG-LF[•]IS[•]PL[•]CD[•]RAK[•]Q--
PDE11 -----ALLRAM[•]SV[•]CDLS[•]AIT[•]K[•]FW[•]IEK[•]RVAD[•]LVSE[•]FF[•]Q[•]G[•]DE[•]KQELNIT[•]ID[•]MM[•]REK[•]DEL

BePDE -----PGAQ[•]GV[•]FIQ[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE1B -----AQ[•]SG[•]IG[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE2A -----PEL[•]Q[•]IS[•]ME[•]HT[•]AMP[•]Y[•]KLLQ[•]DLF--PKAA[•]ELY[•]ERVA[•]SN[•]REH[•]W[•]TKV[•]SHK[•]FTIR[•]GL[•]PS[•]N[•]SL[•]DF[•]DEE[•]YEV[•]PD[•]LD[•]GT[•]RA[•]ING[•]CC[•]SLDAE-----
PDE3A -----ANL[•]Q[•]ES[•]FI[•]SH[•]IV[•]GL[•]PC[•]NS[•]YDS[•]AGL[•]MP[•]GK[•]WED[•]SD[•]ES[•]GD[•]DD[•]EEEEEE[•]AP[•]NEE[•]ET[•]CEN[•]NS[•]SP[•]PK[•]RT[•]FK[•]RR[•]KI[•]YQ[•]IT[•]Q[•]ILL[•]Q[•]NH[•]MM[•]KK[•]VE
PDE4A -----EK[•]Q[•]GV[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE5A -----PM[•]Q[•]GV[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE6 -----FKL[•]Q[•]GV[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE7A -----AN[•]Q[•]IG[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE8A -----PK[•]Q[•]IS[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE9A -----ATA[•]Q[•]IG[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE10 -----VSK[•]Q[•]GV[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----
PDE11 -----PM[•]Q[•]GV[•]FI[•]Q[•]FM[•]IP[•]LE[•]FL[•]ARVL-PQ[•]LEG[•]DV[•]IP[•]Q[•]IRK[•]SLAY[•]QELQ[•]QK-----MQ[•]KRM-----

Para melhor analisarmos a fosfodiesterase BePDE e tendo em vista que na comparação da sua sequência peptídica com o banco de dados do NCBI, os maiores “hits” encontrados correspondem a fosfodiesterases semelhantes às da família 9A de mamíferos, a sequência da BePDE foi alinhada com a sequência correspondente à isoforma 1 da cGMP fosfodiesterase (PDE9A) de *Mus musculus*. A comparação revelou 39% de identidade sendo que a maior parte da conservação concentra-se na região C-terminal do domínio catalítico. Notam-se extensos trechos de até 16 aminoácidos idênticos entre as duas enzimas, inclusive regiões que são bastante conservadas dentro da família 9A (figura 5).

[illegible]

Figura 5. Alinhamento entre a sequência de BePDE e a sequência de PDE9A de *Mus musculus* (acesso NP_032830). (*) resíduos idênticos; (:) resíduos altamente conservados; (.) resíduos semi-conservados; (-) marca “gap” na sequência. (•) e (↓) marcam os motivos de ligação dos íons divalentes.

4.1.2. Análise da estrutura tridimensional da proteína BePDE

A sequência de aminoácidos da BePDE foi também utilizada para realizar uma modelagem 3D usando o programa de modelagem por homologia SWISS-MODEL no modo automático (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>). A fosfodiesterase BePDE foi modelada com base na fosfodiesterase humana 9A complexada com cGMP (Protein Data Bank [PDB] code: 3dynA).

A.

B.

Figura 6. Sobreposição das estruturas do domínio catalítico de BePDE (modelagem feita pelo SWISS-MODEL) e do domínio catalítico da fosfodiesterase 9A humana (PDB ID: 3dynA). Visão frontal (**A**) e rotacionada 180° (**B**). Em azul encontra-se o domínio catalítico da fosfodiesterase BePDE e em verde o domínio catalítico da fosfodiesterase humana 9A (PDB ID: 3dynA).

Figura 7. Sobreposição das estruturas do domínio catalítico de BePDE (modelagem feita pelo SWISS-MODEL – em azul) e do domínio catalítico da fosfodiesterase 9A humana (PDB ID: 3dynA – em verde) com destaque para os aminoácidos conservados considerados importantes para especificidade e para a catálise.

A modelagem revelou que não só a sequência primária, mas também a estrutura tridimensional predita de BePDE é bastante semelhante à da fosfodiesterase 9A humana (figura 6). Além disso, os resíduos descritos como importantes para catálise na fosfodiesterase humana (His 252 e Glu 423), para a alta afinidade da enzima por cGMP (Gln 453 e Glu406) e para coordenação dos íons divalentes (His 292, Asp 402, His 256 e Asp 293) (Liu et al. 2008) estão co-localizados na estrutura tridimensional com os resíduos homólogos de BePDE, indicando que

provavelmente a enzima de *B. emersonii* também seja específica para a hidrólise de cGMP a 5'GMP (figura 7).

4.1.3. Clonagem e expressão da fosfodiesterase BePDE de *B. emersonii*

A fim de expressar a fosfodiesterase BePDE para sua caracterização em posteriores ensaios de atividade enzimática, primeiramente nos certificamos se haveriam íntrons ou não dentro da sequência do gene. Foram realizadas reações de PCR com o objetivo de amplificar a sequência completa e a correspondente somente ao domínio catalítico utilizando como molde tanto o cDNA quanto o DNA genômico do fungo. Os fragmentos de BePDE correspondentes à sequência completa e à região codificadora do domínio catalítico por PCR foram obtidos utilizando um par de iniciadores específicos baseados na sequência depositada no banco de dados (GenBank: ACS49836.1). As sequências foram alinhadas e analisadas. Para síntese do cDNA, a extração de RNA foi realizada como descrito no item 4.4. de Materiais e Métodos e a integridade do RNA total foi analisada em gel de agarose/formaldeído. A síntese do DNA complementar foi realizada de acordo com o descrito no item 4.5. Materiais e Métodos. Tanto o cDNA obtido, como o DNA genômico foram utilizados para a amplificação dos fragmentos de interesse da BePDE através de PCR convencional. Como se pode observar na figura 8, o amplicon correspondente à sequência completa obtido a partir do DNA genômico é cerca de 400pb maior que o obtido a partir do cDNA. Do mesmo modo, o amplicon correspondente ao domínio catalítico de BePDE obtido a partir do DNA genômico é cerca de 200pb maior que o obtido a partir cDNA. Essa diferença evidencia a presença de dois ou mais íntrons sendo que pelo menos um deles estaria localizado no interior da sequência correspondente ao domínio catalítico.

Figura 8. Eletroforese de DNA amplificado por PCR de BePDE. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. P: padrão de tamanho molecular GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use (Fermentas); 1: amplificação da sequência completa da enzima de BePDE a partir de DNA genômico; 2: amplificação da sequência completa de BePDE a partir de cDNA; 3: amplificação da sequência correspondente ao domínio catalítico de BePDE a partir de DNA genômico; 4: amplificação da sequência correspondente ao domínio catalítico de BePDE a partir de cDNA.

Os fragmentos amplificados foram purificados e ligados ao vetor pGEM-T e em seguida sequenciados. O sequenciamento dos clones amplificados a partir do cDNA revelou 99% de identidade com a sequência depositada no banco de dados públicos, tendo o gene da enzima completa um tamanho de 1455pb e apenas o domínio catalítico um tamanho de 756pb. Comparando-se a sequência obtida quando foi utilizado o DNA genômico como molde com a obtida quando foi utilizado o cDNA pudemos inferir a presença de 5 íntrons no gene da BePDE sendo três localizados antes do domínio catalítico e dois no domínio catalítico. Os tamanhos dos íntrons variaram de 67pb a 123pb, o que corrobora com a observação feita por Georg e colaboradores (Georg et al. 2009) na qual os tamanhos mais frequentes de íntrons em *B. emersonii* são por volta de 60 a 79 pb. Além disso, todos possuem as sequências descritas no mesmo trabalho (Georg et al. 2009) como conservadas em íntrons de *B. emersonii*: a extremidade

5' exon-ínton iniciando com GTACG ou GTATG, uma sequência no interior contendo xCTxAC e a extremidade 3' ínton-exon sendo finalizada com as sequência TGTAG, CGTAG, GCGAG ou TCTAG (figura 9).

ATGGCCAAAGTGAGCCCCACGCGCATCCACGTCAAGCTCGACGACAAGACCGAGGCCCTTTGAGCTGTACCCGGGCTCGTCCAACGAC
 GATGTCCGCGCCATCCTCTACAGGTACGCGCCGTACGCGGTGGGGGTGAGGTGATGGCCATGCCGCTCACACGCTCCGCTCGCGTG
 TAGCCTCGCGTCGCTGTCACTCGACGACAAGGATGTCTCTTCAAGCTGACCAAGCCGACGGCACCGTGGTCCCGCCGAGCCCCGT
 GCTCCCCGGCAACACGGAAAAGGACCCCTACGTGCTTAGCGTCAAGCGCGGACGGGTACGCGTGGATCGCCGTGGCCCGCGGCCAT
 AGCCACTGCTGCACCGCCTGGATGCTGACTCGAGCGTTGTCTGTCGTCGCGAGTAGCCTCGCCCAAGGACACGAACGCGCAGATCGCG
 AGCAAGCTCGCGCCGCTCGAGCTCAAGCTCAACGACATTGCCAAGCAGCTCGAGCCGCTGCGCGACATTTGCGCGTTCCGCGAGCAG
 CTGGTCTCGTTCCAGAAGCGCGTCGAGGTACGCTCCTGCTGTTGTGACCGCGATCCGAAGCCACAGCACTGACCATCGTTGTCTGTCG
 TGGAGTCTAGGTGGCCGAGAAGAACCTAACCATGTGCGAGTTCCCGCCACCAAGGTCACGTCCAAGACGATCAAGCGCATCTCCAA
 GATCGACCCCATCTTCACGCACCCAGCCCAAGTACGTGTTACGGACGAGACGGTGGCGTACCTCAAGCAGCCGTCGTTCAACAACCTG
 GCAGTGGGAGGAGAACGAGATGGTGGCCCTCATCGACACATGTTACGCGAGCTCGGCCTCATTGAGCGGTTCAAGATCGAGCTGCC
 GCTGCTCAAGCGGTTCTGTCACACGGTCAAGGACAACCTACAACAACAACCCGTTCCACAACCTCCGCCACTGCTTCTGCGTCACGCA
 GATGTACGTTTTTCTGCGCGGCCGTGTGGACTGGGTTTCGATGACGACCGCTGACCCCTCGCTCTCCTGCTCGCTCGCTCTAGTTCTACG
 GCATCGTGAACGTGACCAAGATCATGGACAAGGTCGAGCCCATCGATCTCCTGATCGGCCCTCGTTGCCTGTGATGCTCTCGAC
 TCCCGCGCGCACGGGCACGGACGCTGGCCACGGCCATCGACTGATCGACGCGCTCGCCGCGACTCGACACCACTGACCCGTCACA
 ACCGCGCCCCGAACACGTAGCATCATCCACGACATTGACCATCCCGGGTTCAACAACGCGTACCAGGTGAACGCGCGCACGGAGCTGG
 CGACCGTGTACAACGACCACTGCGCGCTCGAGAACCACCACTGCGCGGTCGGGTTACGATCATCCGGAACAAGGACTGCAACATCT
 TTAAGAACCTGACGGACAAGGAGTACGACGCGCGCGCAAGGGCATTGTGCGGTGTGTGCTGTGACGGACCTGACCAAGCACGGCG
 ACATCATGGCCAAGTTCAAGGTGGTGGCCGACAACCTCTCGTTACGGACCCGGAGCACCGCATGCAGCTGCTCGTCATGATGGTCA
 AGTGCGCCGACATCAGCAACGAGGCGCGCCCGCGACGTGGCCGAGCCGTGGCTCGACTGCCTGCTCGAGGAGTACTTTGCGCAGT
 CGGACCGCGAGAAGGCCGAGGGCTCCCGCTCGCGCCCTTCATGGACCGGACAAGGTGACCAAGCCCGGCGCCAGGTGGCTTCA
 TCCAGTTCGTTCATGATCCCGCTGTTTCGAGCACCTCGCCCGCTCCTGCCCCAGCTCGAGGGCGACGTGATCCCGCAGATCCGCAAGT
 CGCTCGCCTACTACCAGGAGCTCCAGCAGAAGATGCAGAAGCCCATGTAA

Figura 9. Sequência de nucleotídeos do gene BePDE construída a partir da comparação da sequência obtida por PCR utilizando o DNA genômico como molde com a obtida utilizando cDNA. Em negrito encontra-se destacado o domínio catalítico e em vermelho os íntrons encontrados, sendo sublinhadas as sequências conservadas em íntrons de *B. emersonii*.

Os passos posteriores para expressão e purificação da enzima BePDE recombinante foram feitos utilizando os clones obtidos através do uso de cDNA como molde. A figura 10 mostra a sequência de aminoácidos resultante da tradução *in silico* da sequência completa da BePDE.

MAKVSPTRIHVKLDDKTEAFELYPGSSNDDVRAILYSLASLSLDDKDVFVKLTCPDGTVPVPSPLLPNGTEKDPYVLSVKRATASPK
 DTNAQIASKLAPLELKLNDIAKQLEPLRDISAFREQLVSFQKRVEVAEKNLTMSQFPATKVTSKTIKRISKIDPIFTHQPKYVFTDE

TVAYLKQPSFNNWQWEENEMVALIEHMFSELGLIERFKIELPLLKRFLHTVKDNYNNNP**FHNFRHCF**CVT**QMFY**GIVNVTKIMDKVE
 PIDLLIGLVACIIHDIDHPGFNNAYQVNARTELATVYNDQSPLENHHCAVGFTIIRNKDCNIFKNLTDKEYDAARKGIVRCVLSTDL
 TKHGDIMAKFKVVADNFSFTDPEHRMQLLVMMVKCADISNEARPADVAEPWLDCLLEEF**FAQSDREKA**EGLPVAPFMDRDKVTKPGA
 QVGFIQFVMIPLFEHLARVLPQLEGDVIPQIRKSLAYYQELQQKMQKPM*

Figura 10. Sequência de aminoácidos traduzida *in silico* de BePDE. Destacada em negrito a sequência correspondente ao domínio catalítico.

Com o objetivo de expressar a enzima BePDE para posterior mensuração da atividade de fosfodiesterase, os fragmentos foram isolados do vetor pGEM-T e ligados ao vetor de expressão pPROEX-Hta (figura 11). Importante notar que a sequência escolhida para expressão corresponde ao possível domínio catalítico da enzima, uma vez que trabalhos da literatura mostraram que a expressão de somente esse domínio é suficiente para a expressão com atividade de enzimas da família 9A (Wang et al. 2010; Meng et al. 2012).

Figura 11. Eletroforese de DNA plasmidial dos possíveis clones de BePDE no vetor pPROEX-Hta digeridos com *EcoRI* e *HindIII*. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. **P**: padrão de tamanho molecular GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Fermentas); **BePDE**: plasmídeo digerido contendo a sequência correspondente ao domínio catalítico da fosfodiesterase.

A fim de obter a enzima BePDE recombinante na forma solúvel para posteriores testes de atividade foram utilizadas diferentes condições de expressão variando-se a temperatura de indução e a quantidade de indutor (IPTG). Para a análise da expressão, alíquotas de células foram coletadas antes e após a indução. Posteriormente as células foram lisadas e seu conteúdo avaliado por eletroforese em gel de SDS/poliacrilamida quanto à solubilidade da proteína recombinante. A condição que mostrou melhor resultado foi quando a indução foi feita a 20° C por 14h com 0,3mM de IPTG. Nesse ensaio uma pequena quantidade de proteína foi detectada por Western blot na fração solúvel (figura 12).

Figura 12. Eletroforese em gel SDS-PAGE e Western blot das frações solúvel e insolúvel resultante da expressão da proteína BePDE recombinante. O painel A corresponde a um gel de SDS-PAGE corado com azul de comassie e o painel B corresponde à foto do western blot revelado com o anticorpo anti-His tag. **P:** padrão de tamanho molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); **1:** lisado de *E. coli* BL21-DE3 transformada não-induzida com IPTG; **2:** lisado de BL21-DE3 transformada induzida com 0,3 mM de IPTG por 3h; **3:** lisado de BL21-DE3 transformada induzida com 0,3 mM de IPTG por 2h; **4:** fração solúvel do lisado de BL21-DE3 induzida por 3h; **5:** fração insolúvel do lisado de BL21-DE3 induzida por 3h.

Com o objetivo de melhorar a solubilidade da proteína BePDE recombinante, outros vetores e outras linhagens de *E.coli* foram utilizados para a análise de expressão. Foram testadas as linhagens Origami, ArcticExpression e OverExpress C43. A linhagem Origami é conhecida por aumentar as chances de se produzir proteínas recombinantes com ponte dissulfeto, portanto com atividade; a linhagem ArcticExpression Cell co-expressa duas chaperonas (cpn60 e cpn10) ativas a baixas temperaturas, aumentando a probabilidade de se obter uma proteína com enovelamento correto. A linhagem OverExpress C43 contém algumas mutações que lhe conferem mais tolerância a proteínas tóxicas. A tabela 3 descreve as condições utilizadas e os resultados obtidos.

Tabela 3 - Descrição dos vetores e linhagens usadas para expressão e seus resultados referentes à solubilidade das proteínas heterólogas expressas.

Vetor	Linhagem de bactéria	Solubilidade
pPROEX-Hta	BL21 (DE3)	Insolúvel
pPROEX-Hta	Origami (DE3)	Insolúvel
pPROEX-Hta	ArcticExpression (DE3)	Pouco solúvel
pMAL-c2	BL21 (DE3)	Insolúvel
pMAL-c2	ArcticExpression (DE3)	Pouco solúvel
pET28a	BL21 (DE3)	Pouco solúvel
pET28a	OverExpress C43 (DE3)	Parcialmente solúvel

Conforme consta na tabela a construção que apresentou melhor resultado foi utilizando-se o vetor pET28a e a linhagem OverExpress C43 (DE3) (Figura 13).

Figura 13. Eletroforese em gel SDS-PAGE e Western blot das frações solúvel e insolúvel da expressão da BePDE recombinante. O painel **A** corresponde a um gel de SDS-PAGE corado com azul de comassie e o painel **B** corresponde à foto do western blot revelado com o anticorpo anti-His tag. **P**: padrão de tamanho molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas); **1**: lisado da linhagem OverExpress C43 -DE3 transformada e não induzida com IPTG; **2**: lisado da linhagem OverExpress C43 -DE3 transformada e induzida com 0,3 mM de IPTG por 3h; **3**: fração solúvel do lisado da linhagem OverExpress C43 -DE3 induzida por 3h; **4**: fração insolúvel do lisado da linhagem OverExpress C43 -DE3 induzida por 3h.

4.1.4. Teste de atividade enzimática da fosfodiesterase BePDE recombinante selvagem e do mutante E389A

Para análise da atividade BePDE sobre GMP cíclico, realizou-se um ensaio no qual foi utilizada a parte solúvel do extrato de *E.coli* contendo a enzima recombinante induzida por 3h a 20°C e esta foi comparada em termos de atividade com o extrato de *E. coli* transformada com o vetor pET28a vazio (sem o gene de interesse) e induzida sob as mesmas condições. A quantidade de cGMP foi mensurada utilizando o kit Cyclic GMP Direct ELISA kit da Abcam. Ao compararmos os valores obtidos na quantificação de cGMP observamos que a fração solúvel

contendo a fosfodiesterase BePDE degradou em média $0,4 \pm 0,1$ pmols de cGMP/min/ μ L de fração solúvel do extrato a mais que a fração solúvel controle sem a BePDE. Os testes de atividade foram realizados no mesmo dia da indução, sendo que não houve nenhuma etapa envolvendo o armazenamento das células ou do extrato de proteína, uma vez que em testes nos quais algum desses procedimentos foi realizado o extrato perdeu sua atividade sobre cGMP. Outro fator limitante foi a baixa quantidade de proteína expressa nessa fração solúvel sendo somente detectada por western blot utilizando um anticorpo contra a cauda de histidina.

Uma hipótese para explicar estes resultados seria que esta proteína é instável ou, quando solúvel, citotóxica para a célula, o que explicaria a razão pela qual a linhagem OverExpress C43 foi mais eficiente para sua expressão. Assim, quando expressa em grandes quantidades, a mesma não adquire o enovelamento correto e é deslocada para corpos de inclusão na célula sendo que somente uma pequena fração da proteína expressa consegue enovelar-se e ficar na fração solúvel.

Foram feitas tentativas de purificar a proteína recombinante a partir da expressão de quantidades maiores de cultura bacteriana (500 mL), porém a pequena quantidade obtida após a purificação da fração solúvel não mostrou atividade sobre cGMP. Uma explicação para isso seria a sua instabilidade provocando sua inativação durante o processo de purificação levando assim à obtenção de uma fração de proteína purificada, porém sem atividade.

Devido a essas limitações nós optamos por dar segmento aos testes utilizando diretamente a fração solúvel contendo a proteína induzida e comparando com a mesma linhagem induzida contendo o vetor vazio. Para investigar o papel do glutamato E389 na especificidade de BePDE, o mutante E389A foi construído (figura 14 e 15) e a proteína recombinante contendo a mutação foi expressa utilizando o vetor pET28a e a linhagem de *E. coli* OverExpress C43 (DE3). O

resíduo de glutamato 389 é descrito como responsável pela especificidade das fosfodiesterases da família 9A por cGMP, uma vez que ele seria importante para o posicionamento da glutamina invariável 436 através da interação entre a cadeia lateral amino da glutamina com o oxigênio do glutamato (figura14).

Figura 14. Mutante sítio dirigido E389A. **A.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Canaletas 1 e 2: fragmentos amplificados utilizando iniciadores que continham o códon que codifica o Glutamato 389 substituído pelo códon que codifica Alanina. 3: Segundo PCR feito com os fragmentos complementares produzindo o domínio catalítico completo de BePDE E389A. **B.** Modelagem 3D mostrando a posição do resíduo mutado (em vermelho) e sua proximidade com o substrato cGMP (em ciano). Em verde a estrutura de BePDE e em azul escuro a estrutura da PDE9A de *Homo sapiens*.

Figura 15. Clonagem em vetor de expressão pET28a dos fragmentos correspondentes ao domínio catalítico de BePDE (nativo e mutante). Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Plasmídeo pET28a contendo

fragmentos correspondentes ao domínio catalítico de BePDE nativo (canaleta **1**) e contendo a mutação pontual E389A (canaleta **2**) digeridos com *EcoRI* e *HindIII*.

As enzimas selvagem e mutante foram expressas e submetidas ao teste de atividade enzimática sobre cGMP. Para comparar a influência do resíduo E329 na especificidade de BePDE foram realizados testes utilizando três combinações de substrato: 100 nM cGMP (somente cGMP), 100 nM cGMP + 100 nM cAMP (mesma concentração de cGMP e cAMP) e 100 nM cGMP + 1 μ M cAMP (concentração de cAMP dez vezes maior do que de cGMP). Os testes foram realizados de acordo com o descrito no item 4.15. de Materiais e Métodos, sendo o tempo de indução das proteínas recombinantes de 4h a 20°C. A média da velocidade de degradação de cGMP na triplicata de experimentos é mostrada na tabela abaixo.

Tabela 4. Resultados dos testes de atividade expressos em velocidade de degradação de cGMP.

Concentração de substrato	BePDE	E389A
100 nM cGMP	1,5 $\pm$ 0,2 pmols/ μ L de extrato/min	1,2 $\pm$ 0,3 pmols/ μ L de extrato/min
100 nM cGMP + 100 nM cAMP	1,5 $\pm$ 0,2 pmols/ μ L de extrato/min	0,6 $\pm$ 0,2 pmols/ μ L de extrato/min
100 nM cGMP + 1 μM cAMP	1,0 $\pm$ 0,3 pmols/ μ L de extrato/min	0,5 $\pm$ 0,2 pmols/ μ L de extrato/min

Como podemos observar na tabela 4, a adição de cAMP na mesma concentração que cGMP aparentemente não influenciou na degradação de cGMP pela enzima selvagem confirmando sua especificidade por cGMP. Entretanto, quando o mutante E389A foi submetido às mesmas condições a quantidade de cGMP degradado no ensaio foi 2 vezes menor do que na ausência de cAMP, mostrando que este resíduo deve realmente influenciar na especificidade de BePDE por cGMP. Ambas as enzimas mostraram diminuição na velocidade de degradação de

cGMP quando dez vezes mais cAMP é adicionado em relação a cGMP, sendo que essa diminuição é mais significativa na enzima mutante (2,4 vezes menor) quando comparada à proteína selvagem (1,5 vezes menor). A enzima nativa mostrou maior atividade neste ensaio quando comparado com os ensaios preliminares provavelmente devido ao maior tempo de indução no experimento mostrado na tabela e consequentemente maior quantidade de proteína produzida por microlitro de extrato.

Para verificar se as quantidades das proteínas recombinantes induzidas em ambos os extratos eram equivalentes, os extratos solúveis da proteína recombinante selvagem e da mutante foram analisados em géis de SDS-PAGE. Para comparação dos níveis de ambas as proteínas, a intensidade da banda correspondente a cada proteína recombinante foi investigada em experimentos de western blot revelados com anticorpo contra a cauda de histidina presente em ambas as proteínas. Como controle do western blot foi utilizada a proteína recombinante selvagem purificada a partir do precipitado de 100 mL de cultura induzida. Na figura 16, podemos ver um desses blots como exemplo.

Figura 16. Eletroforese em gel SDS-PAGE e Western blot dos extratos induzidos da expressão das proteínas recombinantes BePDE e E389A usadas para os ensaios de atividade. O painel A corresponde a um gel de SDS-

PAGE corado com azul de comassie e o painel **B** corresponde à foto do western blot revelado com o anticorpo anti-His tag. Em **A** temos na canaleta **P**: padrão de tamanho molecular PageRuler™ Unstained Protein Ladder (Fermentas). Em **A** e **B**: canaleta 1: Proteína recombinante referente ao domínio catalítico de BePDE selvagem purificada usada como controle; canaleta 2: lisado da linhagem OverExpress C43-DE3 transformada com pET28a-BePDE e induzida com 0,4 mM de IPTG por 4h; canaleta 3: lisado da linhagem OverExpress C43 -DE3 transformada com pET28a-E389A e induzida com 0,4 mM de IPTG por 4h. A quantificação de bandas foi feita usando o programa ImageJ e está expressa em porcentagem, sendo a proteína controle considerada como 100%

Para assegurar que as quantidades de proteínas eram semelhantes foi feita a quantificação da intensidade das bandas do western blot utilizando o programa Image J. Como podemos observar, as bandas correspondentes a BePDE e E389A possuem intensidades bastante próximas indicando que a diferença da atividade observada não seria causada pela diferença na quantidade de proteína expressa. Assim, nossos resultados sugerem que o resíduo E389 de BePDE é importante para a especificidade desta fosfodiesterase por GMP cíclico, a exemplo do que reportado por Liu e colaboradores para a fosfodiesterase 9A humana (Liu et al. 2008).

4.2. Análise das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2, e BeGC3

4.2.1. Obtenção das sequências completas das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3 e sua modelagem tridimensional

Para caracterização das guanilato ciclases, as sequências completas de BeGC1, BeGC2 e BeGC3 foram obtidas a partir dos dados do sequenciamento do genoma de *B. emersonii*, realizado por nosso grupo em colaboração com o grupo do Dr. Thomas A. Richards da Universidade de Exeter-UK.

4.2.1.1. Obtenção da sequência completa de BeGC1

O sequenciamento do gene BeGC1 revelou que a proteína codificada possui além do domínio de guanilato ciclase localizado no C-terminal da proteína, um domínio N-terminal que codifica uma rodopsina (Figura 17). Nenhuma proteína contendo esses dois domínios (rodopsina e guanilato ciclase) na mesma cadeia polipeptídica havia sido descrita quando encontramos esta proteína de fusão em *B. emersonii*. Esta organização de domínios de BeGC1 sugeria a ativação do domínio guanilil ciclase por luz via rodopsina. A possível ativação da guanilato ciclase de bastonetes da retina de vertebrados por rodopsina foi proposta recentemente por Bondarenko e colaboradores (Bondarenko et al. 2010). No entanto, na via de sinalização da visão de vertebrados o mecanismo melhor aceito envolve a foto-excitação da rodopsina, que após mudança conformacional, ativa de forma indireta via a proteína G trimérica transducina, uma cGMP fosfodiesterase. A diminuição dos níveis de cGMP causa o fechamento de canais iônicos dependentes de cGMP, o que leva à queda da concentração de cálcio em bastonetes da retina e à ativação da guanilato ciclase ROS-GC, recuperando os níveis de cGMP (Zhang and Cote 2005).

A proteína BeGC1 completa possui 626 resíduos de aminoácidos, tendo o domínio catalítico da guanilil ciclase 173 aminoácidos. É interessante ressaltar que um trabalho anterior realizado por nosso grupo mostrou que o gene de BeGC1 é o mais transcrito dentre as três guanilato ciclasas putativas descritas e que seus níveis variam ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii* (Vieira et al. 2009), com níveis máximos no final da esporulação, durante a biogênese do zoósporo, sugerindo sua possível importância nesta fase.

Figura 17. Domínios conservados da proteína BeGC1 reconhecidos pelo programa "Blastp" do NCBI. CHD: cyclase homology domain

A comparação da sequência de aminoácidos de cada domínio de BeGC1 foi realizada separadamente com o banco de dados do NCBI através do algoritmo “blastp” do programa BLAST disponível na plataforma online do NCBI. Como podemos ver na tabela 5 o domínio de rodopsina tem maior similaridade com rodopsinas do coanoflagelado *Salpingoeca rosetta* e da alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. É interessante notar que todas essas rodopsinas pertencem à classe das rodopsinas microbianas ou rodopsinas do tipo I. Recentemente muitos trabalhos têm discutido se as rodopsinas microbianas (tipo I) e as de animais (tipo II) teriam uma origem comum, porém um consenso sobre o assunto ainda não foi alcançado (Gehring 2014).

Outro fato interessante é que a rodopsina em *Chlamydomonas* com similaridade à rodopsina de BeGC1 faz parte de uma proteína histidina quinase (HKR1) que foi localizada no “eyespot” dessa alga verde, sendo aparentemente relacionada à adaptação comportamental da alga em resposta à presença de luz UVA (Luck et al. 2012). Esta proteína, também chamada de “chlamyopsin-5 sensory rhodopsin” (cop5), similar à rodopsina de BeGC1, poderia estar relacionada à fototaxia de *Chlamydomonas* (Hegemann 2008). Importante ressaltar que HKR1 possui um possível domínio de ciclase (adenilil/guanilil ciclase) além dos domínios de rodopsina, histidina quinase e regulador de resposta, embora a atividade deste domínio não tenha sido demonstrada (Hegemann 2008).

Tabela 5. Comparação da sequência de aminoácidos do domínio rodopsina de BeGC1 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI

Acesso	Descrição	Identidade	Valor “e”
AIC07007.1	bacterio-rhodopsin/guanylyl cyclase 1 fusion protein [Blastocladiella emersonii]	100%	0.0
XP_004998010.1	learning/memory process protein [Salpingoeca rosetta]	33%	1e-16
AAQ16277.3	histidine kinase rhodopsin 1 [Chlamydomonas reinhardtii]	22%	1e-10

Descrição dos “hits” que possuem os dois maiores “scores” de identidade da sequência de aminoácidos do domínio rodopsina de BeGC1 com sequências depositadas em banco de dados públicos utilizando o programa “blastp” do NCBI. A identidade entre as sequências foi priorizada em relação ao valor “e” durante a classificação decrescente apresentada na tabela.

O resultado obtido para a comparação do domínio de guanilato ciclase de BeGC1, apresentado na tabela 6, mostrou que este domínio apresenta alta similaridade às guanilato ciclases de retina dos insetos *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, mostrando também similaridade com uma proteína hipotética do poliqueto *Capitella teleta*. É importante ressaltar que as guanilato ciclases de retina estão relacionadas à sinalização envolvida na visão desses insetos corroborando com a hipótese de que nossa proteína seria ativada por luz. Proteínas similares a BeGC1 também estão presentes apenas nos Blastocladiomicetos *Allomyces macrogynus* e *Catenaria anguillulae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity_project/GenomesIndex.html e <http://genome.jgi.doe.gov/Catan1/Catan1.home.html>, ver tabela 11), mostrando a conservação desta guanilato ciclase e sua provável importância nesses fungos.

Tabela 6. Comparação da sequência de aminoácidos do domínio de guanilato ciclase de BeGC1 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI

Acesso	Descrição	Identidade	Valor “e”
AIC07007.1	bacterio-rhodopsin/guanylyl cyclase 1 fusion protein [Blastocladia emersonii]	100%	1e-131
XP_001663188.1	retinal guanylate cyclase [Aedes aegypti]	46%	5e-49
ELT92823.1	hypothetical protein CAPTEDRAFT_122722 [Capitella teleta]	45%	2e-48
XP_001866044.1	retinal guanylate cyclase [Culex quinquefasciatus]	46%	2e-48

Descrição dos “hits” que possuem os três maiores “scores” de identidade da sequência de aminoácidos do domínio guanilato ciclase de BeGC1 com sequências depositadas em banco de dados utilizando o programa “blastp” do NCBI.

A modelagem 3D da enzima BeGC1 utilizando o programa SWISS_MODEL no modo automático, mostrado na figura 18, confirmou que a enzima é composta de dois domínios, um de rodopsina e um de guanilato ciclase unidos por uma hélice de sinalização (HS). Segundo Ma e colaboradores (Ma et al. 2010), essa hélice de sinalização está presente em proteínas envolvidas com sinalização celular incluindo guanilato ciclastes (GCs) e histidinas quinases, sendo que a hélice de sinalização teria por função transmitir o sinal recebido pelo domínio sensor para o domínio de resposta da proteína.

A.

B.

Figura 18. Modelagem da enzima BeGC1. **A.** Estrutura esquemática mostrando os domínios presentes em BeGC1.

B. Estrutura tridimensional por homologia dos domínios presentes em BeGC1.

É importante notar que o domínio de guanilato ciclase provavelmente forma um homodímero, sendo que o sítio catalítico é formado entre as duas subunidades no dímero (figura 19). Além disso, bem como na fosfodiesterase, os resíduos descritos por Winger e colaboradores (Winger et al. 2008) como importantes nas GCs para a especificidade (Glu 523 e Cys 592), para coordenação dos íons divalentes (Asp 482, Asp 527), para orientação da ribose (Asn 599), para a catálise (Arg 603) e para o posicionamento do trifosfato (Arg 571 e Lys 640) estão presentes em BeGC1 (figura 19) sugerindo que esta enzima seria funcional em *B. emersonii*.

A.

B.

Figura 19. Sobreposição das estruturas do domínio catalítico de BeGC1 (modelagem feita pelo SWISS-MODEL) e do domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel de *C. reinhardtii* (PDB ID: 3ET6) Visão frontal (A) e rotacionada 180° (B).

Figura 20. Sobreposição das estruturas do domínio catalítico de BeGC1 (modelagem feita pelo SWISS-MODEL) e do domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel de *C. reihardtii* (PDB ID: 3ET6), com destaque para os aminoácidos conservados importante para especificidade, coordenação dos íons divalentes e para a catálise.

A sequência obtida pelo sequenciamento do genoma de *Blastocladiella* referente ao gene BeGC1 foi confirmada por experimentos de 5'RACE. Através deste experimento foi encontrado o início de transcrição do gene e foi confirmada a presença de um íntron localizado antes do domínio de rodopsina. Este íntron também possui as sequências conservadas descritas acima para BePDE, sendo iniciado com GTACG, possuindo em seu interior a sequência ACTGAC e tendo em sua terminação a sequência TGTAG (Georg et al. 2009). As sequências nucleotídica e protéica completas de BeGC1 encontram-se na figura 21. Nesta figura estão destacados os aminoácidos importantes do domínio rodopsina e do domínio guanilil ciclase, além do sítio de início de transcrição de BeGC1 determinado por 5'RACE.

Figura 21. Sequências nucleotídica e protéica completas de BeGC1. A seta indica o início de transcrição do gene. O domínio de rodopsina encontra-se sublinhado por uma linha contínua, a hélice de sinalização encontra-se sobrescrita e o domínio catalítico de guanilato ciclase encontra-se sublinhado por uma linha tracejada. Em vermelho estão os resíduos V, Y, F e W que são apontados como importantes para a ligação do retinal no domínio rodopsina. Em azul encontra-se a lisina K que liga o cromóforo retinal por ligação de Schiff. Os resíduos do domínio de guanilato ciclase importantes para a catálise estão em verde e os resíduos responsáveis pelo reconhecimento da guanina no GTP estão em amarelo.

4.2.1.2. Obtenção da sequência completa de BeGC2

A análise do genoma de *B. emersonii* também revelou a sequência completa da guanilil ciclase BeGC2, sendo que esta mostrou possuir além do domínio catalítico localizado no C-terminal, uma extensa região N-terminal de cerca de 1200 pb (~400 aminoácidos) na qual não foi possível encontrar qualquer domínio conservado (Figura 22). A proteína inteira possui um

tamanho deduzido de 640 aminoácidos e o domínio catalítico possui um tamanho de 173 aminoácidos. Também não foi predita nenhuma hélice transmembrana na região N-terminal, indicando que provavelmente não se trata de uma guanilato ciclase receptora.

Figura 22. Domínios conservados da proteína BeGC2 reconhecidos pelo programa "Blastp" do NCBI. CHD: cyclase homology domain

Na figura 23 encontra-se a sequência nucleotídica e na figura 24 a sequência protéica deduzida para BeGC2.

```
ATGGACAGCCACGCGCGCTCACGCGCAACCTGACCATCTACCGCAAGCTGCTCATCGAGACCAACCCGTCGCTCGCC
CGCATCATCGCCACGAGCAAGGACAAGGACGCCAAGACCGCCCGCTCATCGGGAACAAGTCGGGCTCGGCGCTCGCC
ATCACCGACGGGACCGCCGCTGGGGCGACGCCAACCAGCACGGCCGTCACGGTGGTCGCGCCCGCGGGGCCCGCGGC
AACGCGGCGCCCGGGCATCCGGCGACTCGATCTCCAAGGACGCGGACCGGCTGCACGAGGCCAAGATGATGCAGCTC
AAGGTGCGGCAGCAGAAGGAGGTGGAGCAGATGCGCGAGGAGCACCTGCTGCGCGTCAAGCACTCGAACAAGCTGTTT
GAGCTCGAGCTCGACCAGGCCGAGGAGTGGGAGTCGATGCAGGCGGACCAGCGGGTGCAGGAGCTCGAGATGGAGGCC
GAGCACGTCAAGGAGATCGAGACGGAGCAGTTCAACCTCCAGCAGCAGCTGTCTGTCGCTCAAGGCCTACAACGTGCGC
CGCCTGCAGCAGCACAAGGCCAGCGAGCTCCTGCACATGCAGAAGGCCGAGGCCAAGCAGCTCACCAAGCAGTTCAAG
CTCGCCGCCAAGTACCGCAAGAAGGCCTTCTACGAGCGCGAGGAGGCGCTCAAGTCCTTCAACGCGGCCGAGGCCGGC
AAGGAGGACGGGTCCGATGCCGGGTCCGACTCGGATGGCGACACGGGCAGCGACGGCACCGGGTCCGAGGGTTCACAGC
TCGGACGGCGGCATCTCCAAGCAGACGTCCGAGGCCTTACGTCCGAGACGTCCGGCAGCGACGTGTCCGGGGTCTCG
AACGCGACCACGGACCTCATGATCGAGGCGCAGCGCGCCGAGGAGGAGACGGCCAAGGGCCGCCAGGCCATCGAG
CAGCTCATGTCTCCGGCAGCGCGAGATGCGCGAGTCGCTGCAGCAGCAGCACCGCGAGCAGCGCGACTCGATCAAGGTC
GACCAGCGCCAGGCCATGTCCGACATCCACGCCGAGCAGGAGCGCGAGTACCAGGCGCTCAAGCGGCAGCAGGCCATC
GAGATGGACCACCTCATGTCTGCTGCAGAAGTCGGTCGACGACATGGAGAAGGACAACAAGGTCAGCAACGACATTCTG
TCGTCTGATGCTGCCAAGTTCTGTGTCGAGGCGCTCAAGCTCGGCAAGGAGGTGCGCCCGCGCGACTTCAACAACATC
ACGGTGCTGTGCACGGATATCGTGCAGTTACCAACCTCACGTGCGGGTCCACGTGCGGCCAGATCGTCAGCCTGCTC
AACCGCATGTACACGGCCTTCGACACGATCCTCGACGACTACCAGGACGTGTACAAGATGGAGACGATCGGCGACGCG
TACATTCTCGTCGGCGGGCTCAACACGTCCAACACGTCCGACGAGAAGCCCGGGTTCGCTCACGCAGCGCCAGCACGCG
GTCGAGATCACCGAGTGCGCGTTCCGGTTCCCTCAAGGTGGTCGAGGAGCTCGACATGTCTGGACCAGGTCCAGGACTCG
GTCCAGATCCGCATCGGCATGCACTCGGGCTCGGCCGTGCGCGGCGTCGCGGCATCGTCATGCCCCGCTTCGCCCTG
TTCGGCGAGACCCCCAACATCGCCGGCCAGATGGAGCAGAAGTCGACGCCAACCAGCATCCACGTCTCGCCCCGCCACA
TACGAGCTCATCAAGAAGGACTACGACCTCGACGCCCCGCCCGAACCCTGTCAGCTCGAGGGCGGCAGCAACATGAGC
ACCTACTGGCTCAAGGGCAAGAAGGCCGCCGCGACCGCCTCGGCCAAGTCCAACCGCCGCGCCGGTATGGGCCGACC
ACGTCTCTGTCCGCGTCCAGCAACCGCAAGTCGGTGCGCATGGCCGAGTAA*
```

Figura 23. Sequência de nucleotídica de BeGC2.

MDSHARVTRNLTIIYRKLLIETNP SLARIATS KDKDAKTA AAVIGNKSGSALAITDGT AAGATPTSTAVTVVAPAGPGGNAA
 PAASGDSISKDADRLHEAKMMQLKVRQQKEVEQMREEHLLRVKHSNKLFELELDQAEEWESMQADQRVQELEMEAE
 HVKEIETE QFNLQQQLSSLKAYNVRRLLQ QHKASELLHMQKAEAKQLTKQFKLAAKYRKKA FYEREEALKSFNAAEAGKE
 DGSDAGSDSDGDTGSDGTGSEGHSSDGGISKQTSEAF TSETSGSDVSGVSNATTDLMIEAQRAEEEETAKGRQAIEQL
 MLRQREMRESLQQQHREQRDSIKVDQRQAMSDIHAEQEREYQALKRQQAIEMDHLSLQKSVDDMEKDNKVSNDI
 LSSMLPKFVSEALKLGKEVRPRDFNNITVLCTDIVQFTNLTSRSTSRQIVSLLNRMYTAFDTILDDYQDVYKMETIGDAYIL
 VGGLNTSNTSDEKPGSLTQRQHAVEITECAFRFLKVVEELDMSDQVQDSVQIRIGMHSGSAVGGVAGIVMPRFALFGE
 TPNIAGQMEQKSQPNRIHVSPATYELIKKDYDLARPEPVTLEGGSNMSTYWLKGKAAATASAKSNRRAGMGRRTSS
 SASSNRKSVRMAE*

Figura 24. Sequência de aminoácidos traduzida *in silico* de BeGC2.

Para obter maiores informações acerca da proteína BeGC2 realizamos a comparação da sequência primária dessa proteína com sequências presentes no banco de dados do NCBI. Na tabela 7 podemos observar que o domínio guanilato ciclase de BeGC2 mostrou similaridade com duas proteínas hipotéticas do nematodo *Ancylostoma ceylanicum* e uma possível adenilil/guanilil ciclase do nematodo *Hemonchus contortus*. Foi também observada similaridade quando comparamos separadamente o domínio N-terminal de BeGC2 com proteínas presentes no banco de dados do NCBI, como podemos ver na tabela 8. Este domínio mostrou similaridade de sequência com uma guanilato ciclase receptora do nematodo *Ascaris suum*, duas proteínas hipotéticas do nematodo *Ancylostoma ceylanicum* e uma guanilato ciclase do cordado *Latimeria chalumnae*. O fato das proteínas de *Ancylostoma* terem apresentado similaridade com ambos os domínios da BeGC2 (tabelas 7 e 8) e duas outras proteínas classificadas como guanilato ciclastes de *Ascaris* e de *Latimeria* terem mostrado similaridade com o domínio N-terminal de BeGC2 é bastante interessante. BeGC2 também possui alta similaridade (61-56%) com quatro proteínas preditas no genoma de *Allomyces macrogynus* embora não tenhamos encontrado nenhuma proteína predita similar em *Catenaria anguillulae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity_project/GenomesIndex.html e <http://genome.jgi.doe.gov/Catan1/Catan1.home.html>, ver tabela 11).

Tabela 7. Comparação da sequência de aminoácidos do domínio GC de BeGC2 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI

Acesso	Descrição	Identidade	Valor “e”
ACS49834.1	guanylyl cyclase 2 [Blastocladiella emersonii]	97%	2e-158
EYC15076.1	hypothetical protein Y032_0038g3618 [Ancylostoma ceylanicum]	38%	6e-51
CDJ89511.1	Adenylyl cyclase class-3 4 guanylyl cyclase domain containing protein [Haemonchus contortus]	37%	2e-49
EYC08307.1	hypothetical protein Y032_0066g3689 [Ancylostoma ceylanicum]	38%	5e-49

Descrição dos “hits” que possuem os três maiores “scores” de identidade da sequência de aminoácidos de BeGC2 com sequências depositadas em banco de dados utilizando o programa “blastp” do NCBI.

Tabela 8. Comparação da sequência de aminoácidos do domínio de N-terminal de BeGC2 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI

Acesso	Descrição	Identidade	Valor “e”
ERG86823.1	guanylate cyclase receptor-type gcy-1 [Ascaris suum]	29%	6e-09
XP_005996341.1	PREDICTED: guanylate cyclase 2G-like [Latimeria chalumnae]	27%	2e-07
EYC08309.1	hypothetical protein Y032_0066g3689 [Ancylostoma ceylanicum]	42%	2e-07
EYC08307.1	hypothetical protein Y032_0066g3689 [Ancylostoma ceylanicum]	42%	3e-07

Descrição dos “hits” que possuem os três maiores “scores” de identidade da sequência de aminoácidos do domínio N-terminal de BeGC2 com sequências depositadas em banco de dados utilizando o programa “blastp” do NCBI. As duas proteínas hipotéticas de Ancylostoma são distintas formas de ‘splicing alternativo’.

Foi também realizada a modelagem tridimensional da enzima BeGC2 utilizando o programa SWISS_MODEL no modo automático, porém novamente nenhum domínio na região N-terminal foi reconhecido (figura 25). Nessa modelagem uma hélice de sinalização também foi reconhecida em BeGC2.

Figura 25. Modelagem da enzima BeGC2. Modelagem por homologia realizada pelo programa SWISS MODEL no modo automático. O domínio de guanilato ciclase foi modelado de acordo com o domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel de *C. reinhardtii* (PDB ID: 3ET6) e o domínio de hélice de sinalização foi modelado de acordo com a hélice de sinalização da subunidade beta1 da guanilato ciclase solúvel *Rattus norvegicus* (PDB ID: 3hslA).

Tentativas de se confirmar a sequência de BeGC2 completa por 5'RACE foram realizadas, porém não obtivemos sucesso utilizando essa abordagem. Uma possível explicação para a dificuldade de se obter um clone contendo essa sequência completa e a presença de clones que se apresentaram falsos positivos poderia ser a baixa expressão desse gene. Vieira e colaboradores (Vieira et al. 2009) observaram que o transcrito de BeGC2 aparentemente possui uma menor expressão em relação ao transcrito de BeGC1. Outra explicação seria algum possível erro na sequência predita com relação à posição dos íntrons ou à região que se encontra mais próxima ao N-terminal dessa proteína, o que dificultaria o planejamento dos iniciadores para sua amplificação. Assim, embora o mRNA tenha sido extraído na fase de maior expressão e vários clones sequenciados não conseguimos a confirmação de sua sequência por 5'RACE.

4.2.1.3. Obtenção da sequência completa de BeGC3

A sequência completa de BeGC3 foi obtida tal qual as outras guanilato ciclases, através do sequenciamento do genoma de *B. emersonii* (figura 26) e sua sequência proteica deduzida possui 1071 aminoácidos (figura 27).

ATGTCGTCGCCGCGAGCCCAAGCTCGCCGGCGGGCTTGTCCAAGCCCGGCGCCCGCAAGGGCGGGGAACCTCAAGTACGTC
CACGCCGCCGCTCCGTGCTCGCGGATCGGGCGGTCCACTCACCTTTGCGGGATGTGTAGGCCGACGTTTCAGCGTCGA
GACGAGCGACGTGTCGGGCTCGCGCCTGATCAACGAGCGTTTCGCCGCTCGCGTCGACGGACGATCTCGAGAGCGACGA
CGACTCGAGCGTTAACGGCCTGTCGCACGGTCCCGCGGGCGGGCATGGGCGGCCACGGGCACGGGCACGGCAACGACAC
GGCCAGCGAGGACCGGTGCTCGTCGCGCATCGCGCTCGCCGAGGACTCGGCCACGGCGCAGATCGGCAGCGACGCGAC
CAAGGATTTTCGCCGCGATATCAACTCCGGGATCAAGGGCATCTTCGAGGGGCTCCGCACTGACCTCAACAAGATGGA
GGTCCGCATCAAGGCGGCCATGGTGTGAGTCTCGAGAAGGTACGGTCTGCGCGGGTTCGAGGGACGTTGGA
TCTGACTCGCGTACCGTGTGTGTGTAGGACGAAATGACCTTCTTCGCCAAGCAGGACGAGAAGGAGCTGCTCCGCCTG
CGCGCGCGCCAGGAGCAGGAGATCCAGCGCGAGAAGCGCGCCTTCAAGACGCTCATGGAGTCGCGCGAGGCCCGCCAG
CGCGGCCAGGTCTCCAGGCCACCATGAACCTTTACGGCCAAGAACC CGCGATATCATCATCCAGTGCCTGTGCTCGTCTG
TCCGTGGTTCGGTTGACCTGTCACTGACCCCATGCGCGTGTGTAGGGAGCAGGACAAGGCCAGTGCATCGACGCCGAG
GTCAAGGCCATGCTCGACGACCACCGCCAGGCCTTCGAGGAGTACCTGCAGCAGGTCGAGGCCCGCCACACCAAGAAG
CGCAAGAAGCTCACGGCTGCGTTTCGAGCGGTACGCGCCTCTCTCGCTCTCGACGACTCGACTTGCCTCAAACCTTTCC
CCGCTCATCTTTCGAGCCACCCACACACGCCCCAAATCTTGCCCATCATCGAACACGATCACTGACCATGATCCTCGCC
GACCACGACGTGTAGTAAGCTCCAGGACAAGCGCACGCTGTTCAACCTCGAGACGGCGCACCTGTGCGCCGAGATGCG
TCAGGACCGGATCAAGGATTTCCAGTTCAAGGTGAACCACCAGAAGGCCGAGGACAAGAAGGTGGCCGAGCACCGGCG
CGACACGCAGTCGCTCGAGATCCGGCAGATGAAGGAGATGTTTCGACCTGCAGATCAAGTCGCTCGAGGAGACGCACAC
GCTCAAGGCGACCAAGGACCGCGAGATGATGGAGCTGCAGGAGAACCAGCGGCGCGAGGTGCAGCGGTCCAAGGAGGC
GATCCGCGAGGTTCGAGTTCTCTGTCGTAAGGCCGTCAAGCTGCAGCTCGAGCACAACAAGCACATGCGCGACGTGGCGAT
CCGCCACAAGTCGGCCATCGAGACGGTCTGTCGCGCCAGCACCAGCTGCGGTGGGCGCGCATCTCCAAGTGGAAGGT
GGTCTCTCAAGCGCGAGACCGGGCTCGACGTGACCTTCTTCAACGACCCGACCCGGGCGTGCACCTGTGCGACGCTGTT
CATGGACCCGCGAGACCACCATCACGCGGTACCTCGACATCCCGAACCACCGCGCCATCAACCCGACCCCAAGTCGCC
GCCGATTCCGCTCATGCCCAACATCCTCGAGGGCGTCAACGACGAGGTGGACCCGATCCCGCACCAGATCCTGGGCGA
GGGCGAGTCGGGCTACTCCAACCTCGCCGTCGAGCCCGATCTCGCCGTCGAGCCTGCTCACGTCCAACGAGAAGAACGA
CCGCGTCGCGCAGGAGGAGAAGGACCGGCTCGAGCAGAAGCTCGAGCGCATGCGGCTCGACGTCAAGGAGCTCAAGGA
GCACCACCGCGCGCAGCTCGAGGCCATGCGCAAGCAGCACGCCGACGAGCTCGGCCGCTCGAGTCGACGATCCGCAC
CCGCGTCAACGAGCTCCGCGAGGCGCAGAAGACGCGCGCGATGCAGCTCAAGAAGCAGCAGGACGACGAGCTCGACCA
GCTCCAGCTCCACGCGACCCAGGAGAAGGAGGCCGCCATGGAGGAGAACATCCGGTTCGGCCGAGCACAAGATGCTCAT
GGAGCGCAAGACGCTCAACTCGGTCTCTGAGACGGTTCGGGACGGCATCATCAACATCATGCCCAACGGCGTGTGAC
GCGGTTCAACGCGCGCGCCGAGATCATCTTCTGGTACTCGTTCGAGGTGCTCGGCCGCAACGTGTGATGCTGCA
GCCCCGAGAACATTGACCCCATGGACAAGCTCGCGACCTACCTGACCTCTGAGACGTACATGCTCGGCGTTCGGGCGCAC
CGTCACGGGCCGCAAGCGCGACGGCACCAACTTCCCGCTGCACCTGTCCATCTCCGAGGTCAAGGAGAACGACATGCA
CCTGTTACGGCGATCGTTCGCGACCTGACCGAGGAGGTGGCCGCGCAGGAGGCGGACCGCCGCGAGACGGAGCGCAA
GCGCCAGCAGATGGAGACGCTGATCCAGCAGCTCGCGCGCAGCGGTTCGCGGTGCTCGGATCTCATCCACTCGATGCT
GCCGCCGACGATCGCGCCCCGATGCTGCGCGGCGAGGTGGTCCCGCCGAGTCTGTTTCGACGACGCGACCATCATGTT
CACCGAGATCGAGGGCTTCTCGGAGCTCACCAACACGTTTCACGGGGCTCGACATGGTTCGACCTGCTCGACACGCTGTA
CTGCGTCTTTGACGAGATCATCCTCGGCTACAACGTGTACAAGGTTCGAGACCATCGGCGACTCGTACGTGTGCGTGTG
GGGCGTGGCCGAGCCGACGGCCGACACGCGTCCGAGATCGCCAAGCTCGCGCTCCACTTCACGCGCGCCATCACCAA
GATCCGGATCCGGTTCGAACCCGACCTCGAGCTCAAGCTCAAGGTTCGGGATCCACTCGGGCCCCGTCGTGGCCGGCGT
CGTTCGGCAAGAAGTGTCTCGCGTACTGCCTGTTTCGGCGACACGGTCAACACGTGTCGCGCATGAAGTCGACGGGCGA
GCCGAGCCGATCCACATGTGCGCGGCCCGCCACACGCGCCTGGCCGCCGCAAGGCCGGGTTCCACCTCGAGCGCCG
CGGCGAGGTGCCCGTCAAGGGCAAGGGCACCATGGAGACGTTCTGGCTCAACGGCCTCGACGGGTTTCGAGCCCGACCT
CAAGATCATCGACCGCATGATGGAGTCGAGCGCTCGTTCGCCGCTTCGCCAAGTTCGACCATCGTTCGAGCCCGCGG
CGAGGAGCCCCCTCCGCCGCAACGACTCGGCGCCCCAACGGCGGCCCGGCAACGGCCGCCCGGCATGCTGACCGCGTC

CAAGGATATCGGCGCCATGGGCCTCGGCAGCGGCATGGTCGCTCCGCCCTCGCCCTCGAACGGCCAGGCGCAGACGAG
CCCGTTCCGCCGCGCCGTCATGGGCGGCGACCGCGTCTGA

Figura 26. Sequência de nucleotídica de BeGC3, em azul encontra-se a parte da sequência que foi confirmada por sequenciamento por Sanger. Em vermelho encontram-se os íntrons preditos contendo as sequências conservadas sublinhadas.

MSSPQPKLAGGLSKPGARKGGNLKPTFSVETSDVSGSRLINERSPLASTDDLESDDSSVNGLSHGPPAGGMGGHGHGH
GNDTASEDRSSSRIALAEDSATAQIGSDATKDFRRDINSIGIKGIFEGRLTDLNKMEVRIKAAMVSSLEKDEMTFFAKQ
DEKELLRLRARQEIEIQREKRAFKTLMESREARQRGQVLQATMNFTAKNRDIIIEQDKAQCIDAEVKAMLDHRQAF
EEYLQQVEARHTKKRKKLTAAFERKLQDKRTLNFLETAHLSPEMRQDRIKDFQFVNVHQAEDKKVAEHRDTSLEI
RQMKEMFDLQIKSLEETHTLKATKDREMMELQENQRREVQRSKEAIREVEFLVKAVKLQLEHNKHMRDVAIRHKSAIE
TVLSRQHQLRWARISKWKVVLKRETGLDVTFFNDPDPGVHLSTLFMDPQTITITRYLDIPNHRAINPDPKSPPIPLMPN
ILEGVNDEVDPPIPHQILGEGESGYNSPSSPISPSLLTSNEKNDRVAQEEKDRLEQKLERMRLDVKELKEHHRAQLE
AMRKQHADELGRLESTIRTRVNELREAQKTRAMQLKKQQDDELQQLQHLATQEKEAAMEENIRSAEHKMLMERKTLNS
VLETVGDIINIMPNGVLTRFNARAEIIFWYSSSEVLGRNVSMQLPENIDPMDKLATYLTSETYMLGVGRTVTGRKRD
GTNFPPLHLSISEVKENDMHLFTAIVRDLTEEVAQAEDRRETERKRQOMETLIQQLARERSRSSDLIHSMLPPTIAPR
MLRGEVVPPEFDDATIMFTEIEGFSELTNTFTGLDMVDLLDTLYCVFDEIILGYNVYKVETIGDSYVCVSGVPEPTA
DHASEIAKLALHFTRAITKIRIRSNPDLELKLKVGIIHSGPVVAGVVGKKCSRYCLFGDTVNTSSRMKSTGEPSRIHMS
AAAHTRLAAAKAGFHLERRGEVPVKGKGTMETFWLNGLDGFEPDLKIIDRMMSQRSLLAFAFANSTIVEPAGEEPLRN
DSAPNGGAGNGRPGMLTASKDIGAMGLGSGMVAPPSPSNGQAQTSPPFRRAVMGGDRV*

Figura 27. Sequência de aminoácidos traduzida *in silico* de BeGC3, em azul se encontra parte da sequência que foi confirmada por sequenciamento por Sanger.

A análise de BeGC3 utilizando o algoritmo “blastp” (NCBI) demonstrou que sua sequência de aminoácidos compreende um domínio de função desconhecida, um domínio PAS, um domínio denominado HNOBA (Heme NO Binding Associated) e um domínio guanilato ciclase. Esses três domínios estão presentes nas guanilato ciclasas responsivas a óxido nítrico sendo que o domínio PAS é apontado como importante para a dimerização dessas guanilato ciclasas, elemento essencial para sua atividade (Haase et al. 2010). Com base nessas observações acreditamos que esta enzima possa ser uma guanilato ciclase ativada por óxido nítrico (Figura 28).

Figura 28. Domínios conservados da proteína BeGC3 reconhecidos pelo programa "Blastp" do NCBI. DUF - Protein of unknown function (DUF3584); PAS domain (Per, Arnt, Sim), HNOBA: heme NO binding associated, CHD: cyclase homology domain.

Ao compararmos esta proteína BeGC3 no banco de dados do NCBI podemos observar uma maior similaridade com sequências de guanilato ciclases dos quitrídios *Batrachochytrium dendrobatidis* e *Rozella allomycis* e com a anêmona *Nematostella vectensis* (tabela 9). Proteínas similares a BeGC3 também estão presentes nos Blastocladiomicetos *Allomyces macrogynus* e *Catenaria anguillulae* (http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/multicellularity_project/GenomesIndex.html e <http://genome.jgi.doe.gov/Catan1/Catan1.home.html>, ver tabela 11), mostrando a conservação desta guanilato ciclase e sua provável importância nesses fungos.

Tabela 9. Comparação da sequência de aminoácidos completa de BeGC3 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI

Acesso	Descrição	Identidade	Valor “e”
ACS49835.1	guanylyl cyclase 3 [<i>Blastocladiella emersonii</i>]	99%	0.0
XP_006676319.1	hypothetical protein BATDEDRAFT_84768 [<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i> JAM81]	36%	3e-120
EPZ36949.1	PAS domain-containing protein [<i>Rozella allomycis</i> CSF55]	34%	2e-99
XP_001626375.1	<u>predicted protein</u> [<i>Nematostella vectensis</i>]	50%	3e-65

Descrição dos “hits” que possuem os três maiores “scores” de identidade da sequência de aminoácidos de BeGC3 com sequências depositadas em banco de dados utilizando o programa “blastp” do NCBI.

Análise estrutural *in silico* de BeGC3 realizada utilizando programa de modelagem 3D por homologia SWISS-MODEL no modo automático (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) mostrou o domínio PAS com estrutura semelhante ao domínio Heme-PAS da proteína FixL de *Rhizobium meliloti* (PDB ID: 1d06A), que funciona como sensor de oxigênio, reforçando a

hipótese de que este domínio em BeGC3 seja ativado por óxido nítrico. O domínio de hélice de sinalização (coiled-coil) e o domínio catalítico da guanilato ciclase foram modelados com base no domínio “coiled-coil” da subunidade beta1 da guanilato ciclase solúvel de *Rattus norvegicus* (PDB ID: 3hslA) e no domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel de *C. reinhardtii* (PDB ID: 3ET6), respectivamente (Figura 29).

Estes dados corroboram os resultados de Vieira e colaboradores (2009), que sugerem a presença de uma guanilato ciclase responsiva a óxido nítrico em *B. emersonii*, visto que verificaram queda nos níveis de cGMP quando adicionado o inibidor específico de guanilato ciclasas ativadas por óxido nítrico, ODQ (1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one) durante a esporulação do fungo. Esse trabalho também mostrou que quando este inibidor é adicionado até 90 minutos depois da indução da esporulação, ocorre inibição desta fase, sugerindo a importância desta guanilato ciclase no ciclo de vida de *Blastocladiella*. Li e colaboradores (2010) também observaram uma possível atividade de guanilato ciclase ativada por óxido nítrico envolvida com a conidiação (produção de conídios) do fungo *Coniothyrium minitans*, embora a enzima responsável por essa atividade não tenha sido identificada (Li et al. 2010).

Conseguimos confirmar parte da sequência de BeGC3 por 5'RACE e acreditamos que as explicações para a não obtenção da sequência completa sejam a falha no planejamento dos iniciadores, baixa expressão e/ou o grande tamanho do transcrito.

Figura 29. Modelagem da enzima BeGC3. Modelagem por homologia realizada pelo programa SWISS MODEL no modo automático. O domínio PAS foi modelado de acordo com o domínio Heme-PAS da proteína FixL de *Rhizobium meliloti* (PDB ID: 1d06A), o domínio de hélice de sinalização foi modelado de acordo com a hélice de sinalização da subunidade beta1 da guanilato ciclase solúvel *Rattus norvegicus* (PDB ID: 3hslA) e o domínio de guanilato ciclase foi modelado de acordo com o domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel de *C. reinhardtii* (PDB ID: 3ET6).

Da mesma forma que BeGC1, tanto o domínio de guanilato ciclase de BeGC2 quanto o de BeGC3 devem provavelmente formar um homodímero, sendo o sítio catalítico formado entre as duas subunidades componentes.

4.2.2. Localização das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3

4.2.2.1 Localização das guanilato ciclases BeGC1, BeGC2 e BeGC3 através de western blots de frações dos extratos celulares de zoósporos

Com a finalidade de investigar a localização subcelular das guanilato ciclases de *B. emersonii*, foram produzidas em *E. coli* proteínas recombinantes correspondentes ao N-terminal da região codificadora de BeGC1, BeGC2 e BeGC3. As proteínas recombinantes foram purificadas e utilizadas para produção de anticorpos policlonais em coelhos. Após imunização dos coelhos, o soro contendo os anticorpos para o reconhecimento das respectivas enzimas foi coletado e purificado pelo método de adsorção. Após a confirmação de ausência de reação

cruzada entre as guanilato ciclases testadas o soro purificado foi então utilizado em experimentos western blot com extratos celulares de *B. emersonii* fracionados por centrifugação. Para isso, zoósporos foram coletados, lisados e os extratos celulares separados em três frações por centrifugações sucessivas. A primeira fração, obtida após centrifugação a 12.000 xg, corresponde, em sua maior parte, a pequenas organelas e ao flagelo dos zoósporos; a segunda fração corresponde ao sobrenadante resultante de uma ultracentrifugação a 100.000 xg e contém as proteínas solúveis do extrato celular; a terceira corresponde ao ‘pellet’ após a mesma ultracentrifugação e contém as proteínas insolúveis associadas à membrana citoplasmática.

Como controle foram utilizados anticorpos contra a α -tubulina e a ATPase de membrana plasmática BePAT1 de *B. emersonii*. A proteína BePAT1 foi observada nas frações de 12.000 xg e no precipitado de 100.000 xg, indicando que também haveria uma fração de membrana plasmática na fração obtida após centrifugação a 12.000 xg. A α -tubulina, como esperado, foi localizada em sua maioria na fração de 12.000 xg indicando que o flagelo estaria nessa fração. O flagelo dos zoósporos de *B. emersonii* é composto em grande parte por α -tubulina e β -tubulina.

Figura 30. Localização subcelular de BeGC1. Western blots de lisados de zoósporos fracionados por centrifugação diferencial conforme o descrito no item 5.3, sendo 12.000 xg ppt: precipitado após centrifugação a 12.000 xg; 100.000 xg sup: sobrenadante após centrifugação a 100.000 xg; 100.000 xg ppt precipitado após centrifugação a 100.000 xg. Foram utilizados anticorpos primários policlonais de coelho contra BePAT1: ATPase 1 de *B. emersonii*; BeGC1: guanilato ciclase 1 de *B. emersonii* e α -tubulina.

Conforme podemos observar na figura 30, a guanilato ciclase BeGC1 apresentou uma banda no tamanho predito (68 kDa) somente na fração coletada após a centrifugação a 12000xg indicando que essa proteína pode estar associada a alguma organela e não somente à membrana plasmática dos zoósporos.

Figura 31. Localização subcelular de BeGC2 e BeGC3. Western blots de lisados de zoósporos fracionados por centrifugação diferencial conforme o descrito no item 5.3, sendo 12.000 xg ppt: precipitado após centrifugação a 12.000 xg; 100.000 xg sup: sobrenadante após centrifugação a 100.000 xg; 100.000 xg ppt precipitado após centrifugação a 100.000 xg. Para utilizados anticorpos primários policlonais de coelho contra BeGC2: guanilato ciclase 2 de *B. emersonii* e BeGC3: guanilato ciclase 3 de *B. emersonii*.

O soro anti-BeGC2 reconheceu uma banda que está presente tanto na fração de 12.000 xg quanto no pellet de 100.000 xg (figura 31). Este dado indica que embora BeGC2 não possua nenhum domínio transmembrana predito, ela pode estar associada à membrana plasmática e /ou organelas. Por outro lado, o soro anti-BeGC3 reconheceu uma banda presente na fração solúvel da centrifugação de 100.000 xg de extratos de zoósporos (figura 31), resultado consistente com

uma guanilato ciclase solúvel, característica esta apresentada por guanilato ciclasas ativadas por óxido nítrico (NO), corroborando a hipótese de que BeGC3 seja responsiva a NO.

4.2.2.2. – Imunolocalização das guanilato ciclasas BeGC1, BeGC2 e BeGC3

Os resultados de western blot com frações do extrato de zoósporos sugeriram as possíveis localizações subcelulares de BeGC1, BeGC2 e BeGC3. Para melhor definição da localização das proteínas foram realizados experimentos de imunolocalização por microscopia de fluorescência. Para tanto zoósporos foram fixados, permeabilizados e incubados com o antissoro purificado específico para cada guanilil ciclase e em seguida incubados com anticorpos secundários fluorescentes (conforme descrito em Materiais e Métodos, item 4.19.). Após revelação, as células foram visualizadas em microscópio de fluorescência. Para visualização dos grânulos de lipídeos foi utilizado o corante “Nile red” que fluoresce em ambiente hidrofóbico sendo assim bastante utilizado para coloração de lipídeos (Kim et al. 2013). Para identificação do corpo celular e do flagelo foi utilizado um anticorpo primário contra α -tubulina, seguido de secundário fluorescente.

Conforme podemos observar na figura 32, BeGC1 co-localiza com a estrutura denominada “eyespot” caracterizada por conter grânulos de lipídeos envoltos por membranas próximo ao flagelo. Essa localização está de acordo com a hipótese apresentada no trabalho de Saranak e Foster (Saranak and Foster 1997), onde os autores propõem que uma rodopsina seria responsável pela fototaxia de zoósporos de *Allomyces reticulatus*. Este fungo, também pertencente à classe dos blastocladiomicetos, e a rodopsina estaria localizada junto a grânulos de lipídios que se encontram próximos ao flagelo desses organismos, em uma estrutura denominada “eyespot”. Em 1970, Cantino e Truesdell (Cantino and Truesdell 1970), já haviam descrito uma

organela semelhante em *B. emersonii* que foi denominada “sidebody complex” ou “eyespot”, na qual grânulos de lipídios contendo proteínas estão envolvidos por uma dupla membrana. É interessante ressaltar que a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* também possui uma organela similar também denominada “eyespot” e nela estão localizadas as rodopsinas que guiam a fototaxia deste organismo corroborando com o observado em *Allomyces* e em nossos resultados com *B. emersonii* (Trippens et al. 2012).

Figura 32. Localização da proteína BeGC1 por microscopia de imunofluorescência. **A.** Zoósporos visualizados por contraste de fase (imagem DIC), **B.** BeGC1 em verde, **C.** Grânulos de lipídeos do “eyespot” em vermelho e **D.** sobreposição das três imagens. As setas indicam a posição da estrutura do “eyespot”.

Os resultados de western blot mostrados anteriormente sugerem que BeGC2 seja uma guanilil ciclase de membrana ou em um organela. Para melhor localizarmos BeGC2, imagens de

microscopia por imunofluorescência foram obtidas utilizando o soro purificado anti-BeGC2. Como podemos observar na figura 33, BeGC2 aparenta estar localizada na estrutura que representa o capacete nuclear. A função exata dessa organela ainda não foi determinada, porém alguns trabalhos indicam que ela armazena ribossomos, algumas proteínas e RNAs mensageiros que serão utilizados na fase inicial da germinação (Lovett 1968), sugerindo que BeGC2 poderia ser importante para esse processo.

Figura 33. Localização da proteína BeGC2 por microscopia de imunofluorescência. Da esquerda para a direita: Zoósporos visualizados por contraste de fase (imagem DIC), α -tubulina em vermelho, BeGC2 em verde, e sobreposição do DIC com BeGC2. As setas brancas indicam a posição da estrutura do capacete nuclear. As pontas de seta pretas indicam a localização do flagelo.

BeGC3 foi encontrada em western blots na fração solúvel de extratos de zoósporos após centrifugação de 100.000 xg, o que estaria de acordo com a classificação de BeGC3 como uma guanilato ciclase solúvel. A figura 34 mostra que BeGC3 foi identificada de forma difusa no citoplasma dos zoósporos, indicando portanto tratar-se de uma guanilato ciclase solúvel, como são as GCs ativadas por NO.

Figura 34. Localização da proteína BeGC3 por microscopia de imunofluorescência. Da esquerda para a direita: Zoósporos visualizados por contraste de fase (imagem DIC), α -tubulina em verde e BeGC3 em vermelho.

4.3. Identificação de um possível canal iônico ativado por GMP cíclico denominado BeCNG1

Buscando por outras possíveis proteínas que fariam parte da sinalização por cGMP em *B. emersonii* encontramos um gene codificando um possível canal de potássio ativado por GMP cíclico. Este canal de potássio putativo possui um total de 697 aminoácidos, com sua massa calculada aproximada de 78 kDa. Analisando sua sequência deduzida foi possível identificar as seis hélices transmembrana características, bem como a região correspondente ao poro do canal, contendo o filtro de seletividade para potássio GYGD, que está localizado entre as hélices cinco e seis. Também foi possível identificar o domínio de ligação a nucleotídeos cíclicos (Figuras 35).

```

MIQPQLHLDRLLLETTSAAAAAYSRTPLLSETVHFFSETGRRLGFFTRDGDDSDSPDDDDDPDDPDDDPAPAL
GPTAAGRRGDRDDADLLAGAARPMADARALARMGGSSSGSGSTQSTRKRNGAGGRSSRLADGPDNDLFIAGNQG
GGGLFGGLTWQDLWQKLLKFYLIPGEPFLTWWDYFMVLVAVTNGITIPFIAAFRGYLFTSFIVQYALDVIYLI
DIFIKFHVSYLDRGFYVIFPKEMAMHYMRSWEFSFDLFTNLPFDLIALSWSNSAVPGEVLYFLSIVRLHKLMR
TFKLLWWFHKEEKRLNAQAVFQMYKFTIYITLITHWCTCIWYVLACPDQCVTPSWATDPNQNPDFSRLSMYV
YALYWTVMTMTTGYGDVHATNDRERIWSIICMITGVFLYGYVSGTIIASSLSNLD SRRVAYRQKVEAIKQYML
DQNMDKDMQKRVTGWYEYTWERNKGIDVINVFNDLPSNFRAEVALSVNEDIIEKAPIFRNTSLGFRRMLS IAM
RINFFTADTYIVHRGEIGKEMFFVVQGRVDVLNHDESKPISSMVEGSYFGEYMLILGNVCEASAI AVCNCDVY
VLSKDDYDQACANYPEDANKVLAATKDAYQKQLEKQORSQRKKSTDDFDL GTTSGLLGVG GATNLTAMP SVIM
EEMGSTMGMASPPQSGVQTRRASGDDARKSRPTLTVPEED

```

Figura 35. Sequência referente ao canal de potássio putativo de *B. emersonii* BeCNG1. Os seis segmentos transmembrana encontram-se sublinhados (S1- S6). Em azul, encontra-se a região do poro contendo o filtro de seletividade, mostrado em laranja. Em vermelho, temos a sequência correspondente a região de ligação a nucleotídeos cíclicos.

4.3.1. Comparação de BeCNG1 com outros canais presentes no banco de dados do NCBI.

O tamanho predito para essa proteína é similar ao encontrado em canais de potássio de vertebrados superiores nos quais 4 proteínas independentes formariam um tetrâmero que assim constituiriam o canal. O canal ativado por nucleotídeos cíclicos CNGA1 presente em bastonetes de retina de humanos possui 40% de similaridade e 23% de identidade com BeCNG1, contendo algumas regiões bastante conservadas e mantendo também a conservação das estruturas secundárias previstas utilizando o programa de predição de estruturas SOPMA do ExPASy (figura 36).

CNGA1	--MKLSMKNNIINTQQSFVTMPNVIVPDIEKEIRRMEN-----GACSSFSEDDDSASTSE	53
BeCNG1	MIQPQLHLDRLLLETTSAAYSRTPLLSETVHFFSETGRRLGFFTRDGDSDSPDDDD	60
	:.:::* .: .: . . * :.: : :.: * : .:*.***. .:	
CNGA1	ESENENPHARGSFYSYKSLRKGGPSQREQYLPGAIALFNVNSSNKD--QEPEEKKKKKKE	111
BeCNG1	DPDDPDDDPAPALGPTAAGRRGDRDDADLLAGAARPMADARALARMGGSSSGSGSTQSTRK	120
	:.: : .: .: .: : * : : *.** : .: : .: .: .: .: .: .:	
CNGA1	KKSKSDDKNENKNDPEKKKKKKDKKKKKKEKSKDKKEEKKEVVVIDPSGNTYYNWLFC	171
BeCNG1	RNGAGGRSSRLADGPDNDLFIAGNQGGGLFGGLTWQDLWQKLLKFYLIPGEFPLTWWDY	180
	:.: .:	
CNGA1	ITLPVMYNWMTVIARACFDELQSDYLEYWLILDYVSDIVYLIDMFVRTRTGYLEQGLLVK	231
BeCNG1	FMVLVAVTNGITIP--FIAAFRGYLFSTFIVQYALDVIYLIDIFIKFHVSYLDRGFYVI	237
	: : * . :.*. * .** :.:*. *.:*****: : .:*.***: *	
CNGA1	EELKLINKYKSNLQFKLDVLSLIPTDLLYFKLG-----WNYPEIRLNRLRFSRMF	282
BeCNG1	FPKEMAMHYMRSWEFSFDLFTNLFPDLIALSWSNSAVPGEVLYFLSIVRLHKLMRTFKLL	297
	: : * . :*.***: : * ** : .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:	
CNGA1	EFFQRTETRTNYPNIFRISNLVMIYIVIIHWNACVFYSISKAGFGNDTWVYPDINDPEF	342
BeCNG1	WWFHKEEKRLNAQAVFQMYKFTIYITLITHWCTCIWYVLACPDQCVTPSWATDPNQNPDF	357
	:.: *.* * :.: :.:*.***: * ** :.:*** : : .: .: .: .: .: .: .: .: .: .:	
CNGA1	GRLARKYVYSLYWSTLTLTITIG-ETPPPVRDSEYVFVVVDFLIGVLIFATIVGNIGSMIS	401
BeCNG1	SDRLSMVYVYALYWTMTTGYGDVHATNDRERIWSIICMITGVFLYGYVSGTIASSLS	417
	. ***:***:~*** * .:.* * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *	
CNGA1	NMNAARAEFQARIDAIAIKQYMHFRNVSKDMEKRVIKWFDYLWTKKTVDKEVLKYLDPDKL	461
BeCNG1	NLDSRRVAYRQKVEAIKQYMLDQNMCDKMQKRVGTGWYEYTWERNKGIDVINVFNDLPSNF	477
	*.: : * .: :	
CNGA1	RAEIAINVHLDTLKKVRIFADCEAGLLVELVLKLQPVYSPGDYICKKGDIGREMYIIKE	521
BeCNG1	RAEVALSVNEDIEKAPIFRNTSLGFRMLSLAMRINFFTADTYIVHRGEIGKEMFFVVQ	537
	***:~*: * :.: * * : . * : * :	
	β4 β5 β6 αP PB loop β7 β8	
CNGA1	GKLAVVADDGVTQFVVLSDGSYFGEISILNIKSGKAGNRRTANIKSIGYSDFCLSKDDL	581
BeCNG1	GRVDVLNHDESKPISSMVEGSYFGEYMLI-----LGNVCEASAIACVNCDDVYVLSKDDY	591

```

*:: *: .* . : : :***** ::          **  * . : : .*:: *****
αB                               αC

CNGA1      MEALTEYPDAKTMLEEKGKQILMKDGLLDLNIANAGSDPKDLEEKVTRMEGSVDLLQTRF 641
BeCNG1      DQACANYPEDANKVLAATKDAYQKQ-LEKQQRSQRKKSTDDFDLGTTSGLLGVGATNLT 650
           :* ::*: . :      * :      * : * . : : . . . * : . * . .

CNGA1      ARILAEYESMQQKLKQRLTKVEKFLKPLIDTEFSSIEGPGAESGPIDST 690
BeCNG1      AMPSVIMEEMGSTMGMASPPQSGVQTRRASGDDARKSRPTLTVPPEED-- 697
           * . * . * . : . . . . . : : . *      *

```

Figura 36. Alinhamento da sequência de BeCNG1 e do canal ativado por nucleotídeos cíclicos CNGA1 (acesso NCBI: NP_000078.2) Os seis segmentos transmembrana encontram-se assinalados por retângulos (S1- S6). Em azul encontra-se a região do poro contendo o filtro de seletividade e em vermelho a sequência correspondente a região de ligação a nucleotídeos cíclicos. Hélices (marcadas com α) e folhas-beta (marcadas com β) foram preditas utilizando o programa online SOPMA do Expasy.

Comparando-se a sequência de aminoácidos desse canal com sequências depositadas no banco de dados do NCBI através do programa “Blastp” foi possível confirmar a similaridade entre BeCNG1 e canais de potássio tetraméricos ativados por nucleotídeos cíclicos. As maiores identidades foram com os canais presentes no hemicordado *Saccoglossus kowalevskii*, no ouriço do mar *Strongylocentrotus purpuratus* e na cianobactéria *Trichodesmium erythraeu* (Tabela 10).

Tabela 10. Comparação da sequência de aminoácidos do de BeCNG1 com sequências depositadas em banco de dados do NCBI

<u>Acesso</u>	<u>Descrição</u>	<u>“E value”</u>	<u>Identidade</u>
<u>XP_002731383.1</u>	PREDICTED: tetrameric potassium-selective cyclic nucleotide gated channel-like, partial [Saccoglossus kowalevskii]	3e-72	34%
<u>NP_001075433.1</u>	tetrameric potassium-selective cyclic nucleotide gated channel [Strongylocentrotus purpuratus]	1e-69	34%
<u>YP_724331.1</u>	cyclic nucleotide-binding protein [Trichodesmium erythraeu IMS101]	2e-69	30%

Descrição dos “hits” que possuem os três maiores “scores” de identidade na comparação da sequência de aminoácidos do BeCNG1 com sequências depositadas em banco de dados utilizando o programa “Blastp” do NCBI.

O alinhamento da região do poro, que contém o filtro de seletividade para potássio, com a mesma região de outros canais de potássio confirmou a conservação dos resíduos importantes para seletividade deste íon. Também foi possível observar a conservação da região que liga nucleotídeos cíclicos quando comparada a outras proteínas que ligam cGMP (figura 37).

Figura 37. Alinhamento da sequência correspondente à região do poro (A) e da região de ligação a nucleotídeos cíclicos (B) com outros canais de potássio e com outras proteínas responsivas a cGMP. ApKCNG - *Arbacia punctulata* (NCBI Reference Sequence: ABH10136.1), MloK1 - *Mesorhizobium loti* (NCBI Reference Sequence: NP_104392.1), KcsA - *Streptomyces Lividans* (PDB: 1BL8_D), DmShaker - *Drosophila melanogaster* (NCBI Reference Sequence: NP_728120.1), SpKCNG - *Strongylocentrotus purpuratus* (NCBI Reference Sequence: NP_001075433.1), bovA1 - *Bos taurus* (NCBI Reference Sequence: NP_776703.1), PKG1 - *Homo sapiens* (NCBI Reference Sequence: NP_001091982.1). (*) denota os resíduos idênticos; (:) resíduos altamente conservados e (.) resíduos conservados. Resíduos idênticos estão em preto e similares estão em cinza.

Strünker e colaboradores (Strunker et al. 2006) mostraram a participação do canal de potássio de *Arbacia punctulata* (ApKCNG) na quimiotaxia do espermatozóide desse ouriço do mar. A sinalização celular proposta na quimiotaxia do espermatozóide de *A. punctulata* inicia-se com uma guanilato ciclase receptora (ainda não caracterizada) que é ativada por um quimioatraente e assim passa a produzir o segundo mensageiro cGMP. Os autores sugerem que a molécula de cGMP liga-se ao canal de potássio ApKCNG, provocando sua abertura, processo que geraria uma mudança de polaridade na membrana e consequentemente abriria canais de cálcio que seriam responsáveis pelo movimento flagelar em direção ao quimioatraente. Uma vez que o canal de potássio BeCNG1 é bastante semelhante ao canal de potássio de *A. punctulata* decidimos investigar o possível papel desse canal na sinalização por cGMP em *B. emersonii*.

4.3.2. Localização do canal de potássio BeCNG1 utilizando Western blot e microscopia por imunofluorescência.

Parte da sequência que codifica a região de ligação a nucleotídeos cíclicos de BeCNG1 foi amplificada a partir do cDNA, clonada, a proteína expressa e purificada conforme mostrado na figura 38. A proteína purificada foi então utilizada para produção de anticorpos policlonais em coelho. O soro foi purificado por adsorção para melhor sua especificidade. A fim de encontrar a localização subcelular do canal BeCNG1, western blots utilizando extratos fracionados de zoósporos foram realizados e, conforme mostra a figura 39, podemos observar que o canal pode ser encontrado principalmente no precipitado da centrifugação a 100.000 xg. Esta localização indica que o canal está presente na membrana plasmática dos zoósporos, o que já era esperado devido à presença de seis hélices transmembrana previstas na sequência da proteína.

Figura 38. Expressão e purificação da proteína recombinante referente à parte do canal de potássio BeCNG1.

Eletroforese em gel SDS-PAGE da expressão e purificação da proteína recombinante em coluna de Ni-NTA (Invitrogen). **Canaleta P:** padrão de massa molecular PageRuler™ Unstained Broad Ranger Protein Ladder (Fermentas); **canaleta 1:** lisado da bactéria BL21-DE3 transformada não-induzida com IPTG; **canaleta 2:** lisado da bactéria BL21-DE3 induzida com 0,4 mM de IPTG; **canaleta 3:** Proteína purificada foi eluída por mudança de pH com o tampão de eluição desnaturante (6 M ureia, 20 mM de Fosfato de sódio, 500 mM NaCl₂, pH 4,0).

Figura 39. Localização subcelular de BeCNG1. Western blots de lisados de zoósporos fracionados por centrifugação diferencial conforme o descrito nos materiais e métodos, sendo 12.000 xg ppt: precipitado após centrifugação a 12.000 xg; 100.000 xg sup: sobrenadante após centrifugação a 100.000 xg; 100.000 xg ppt precipitado após centrifugação a 100.000 xg. Foram utilizados anticorpos policlonais de coelho purificados contra BeCNG1.

Para a localização subcelular do canal presente nos zoósporos de *Blastocladiella* foram realizados experimentos de microscopia por imunofluorescência. Como podemos observar na figura 40, BeCNG1 mostrou uma provável localização na membrana do corpo celular quanto no

flagelo dos zoósporos. Essa localização mostrou-se bastante interessante uma vez que o canal responsivo a cGMP que participa da sinalização envolvida na quimiotaxia de espermatozóides de ouriço do mar localiza-se no flagelo desses espermatozóides (Bonigk, Loogen et al. 2009). BeCNG1 apresenta similaridade de sequência com este canal, sugerindo que talvez ele possa estar relacionado com a sinalização envolvida na locomoção dos zoósporos (Strunker et al. 2006; Bonigk et al. 2009).

Figura 40. Localização da proteína BeCNG1 por microscopia de imunofluorescência. Da esquerda para a direita: Zoósporos visualizados por contraste de fase (imagem DIC), BeCNG1 em verde e α -tubulina em vermelho. As setas indicam a posição do flagelo.

Com o objetivo de melhor caracterizar a função de BeCNG1 investigamos o efeito *in vivo* do inibidor específico de canais responsivos a nucleotídeos cíclicos Cis-diltiazem (Plachetzki et al. 2012) em zoósporos. Para isso adicionou-se 5 μ M do inibidor à suspensão de zoósporos, sendo observado seu efeito em microscópio óptico. Observou-se que os zoósporos param imediatamente de nadar após a adição do inibidor. Importante ressaltar que embora imóveis os zoósporos germinam, as células entram na fase vegetativa e esporulam com a mesma cinética que zoósporos não expostos ao inibidor, mostrando que a viabilidade das células não foi afetada. Os resultados reforçam a hipótese de que a motilidade dos zoósporos está relacionada com este tipo

de canal, sugerindo que BeCNG1 possa ter participação na via de sinalização envolvida com o movimento dos zoósporos de *Blastocladiella*.

4.3.3. Perfil de expressão do transcrito do canal BeCNG1 é semelhante ao da guanilato ciclase BeGC1

O perfil de expressão do mRNA de BeCNG1 durante a esporulação foi investigado usando como controle o transcrito da guanilato ciclase BeGC1. Nós escolhemos utilizar esta guanilato ciclase como controle, pois tanto BeGC1, quanto BeGC2 e BeGC3 apresentam o mesmo perfil de expressão ao longo do ciclo de *B. emersonii* e aparentemente BeGC1 apresenta a maior expressão dentre as três guanilato ciclases (Vieira et al. 2009). Podemos observar na figura 41 que a variação dos níveis do transcrito do gene BeCNG1 segue um perfil semelhante do transcrito de BeGC1, sendo que a expressão máxima de ambos os transcritos ocorre por volta de 120 min de esporulação. Esses dados estão de acordo com a hipótese de que BeCNG1 participaria da via de sinalização por cGMP nos zoósporos de *B. emersonii*.

Figura 41. Perfil de transcrição dos gene BeGC1 e BeCNG1 de *B. emersonii* ao longo da fase de esporulação. Mudanças nos níveis de mRNA dos gene BeGC1 e BeCNG1 foram avaliadas por RT-qPCR em diferentes tempos após a indução da esporulação (0 min, 60 min, 120 min, 150 min e nos zoósporos resultantes). Os experimentos foram feitos em triplicatas biológicas e técnicas.

4.3.4. Análise da influencia de um canal responsivo a cGMP na variação do potencial de membrana e no fluxo de potássio

Para melhor investigarmos a existência desse tipo de canal e sua função in vivo, decidimos avaliar a variação do potencial de membrana do zoósporo em função da adição de GMP cíclico na presença ou ausência do inibidor específico de canais responsivos a nucleotídeos cíclicos Cis-diltiazem. Para isso utilizamos o kit FLIPR® Membrane Potential Assay (Molecular Devices) segundo o protocolo do fabricante. Este kit detecta modulações de canais iônicos através do aumento ou diminuição do sinal fluorescente de acordo com as mudanças no potencial de membrana. O corante se liga aos fosfolípidos de membrana e a fluorescência aumenta

durante a despolarização da membrana à medida que o corante segue a carga positiva dentro da célula. Um supressor do corante do lado externo da célula é utilizado senod a fluorescência somente detectada no interior celular. Como controle positivo foi utilizado 60 μ M de KCl e como controle negativo e de especificidade foi utilizado cAMP. Como podemos observar na figura 42 tanto KCl quanto cGMP foram capazes de alterar significativamente o potencial de membrana do zoósporo, o que não é observado com cAMP. Para confirmar esse resultado repetimos o mesmo experimento na presença do inibidor Cis-diltiazem. O efeito da adição de cGMP na variação do potencial de membrana é perdido na presença do inibidor, reforçando que esse efeito seria devido a canais específicos responsivos a GMP cíclico (figura 42). Embora não seja significativo, podemos observar uma leve tendência à redução do efeito com a adição de cloreto de potássio, o que também pode ser devido à presença de canais de potássio responsivos a cGMP. Sendo assim esses experimentos apontam para a existência de canais ativados por cGMP nos zoósporos de *Blastocladiella emersonii*.

Figura 42. Variação do potencial de membrana em função da presença de GMP cíclico. $\Delta\Psi$ - variação do potencial de membrana. RFU - unidade relativa de fluorescência. Neste experimento foram utilizados 60 μ M de KCL, 3mM cGMP, 3mM cAMP e 10 μ M de Cis-diltiazem. * $p<0,5$. Foi utilizado para análise o teste T-Student

Para confirmar o efeito do cGMP neste tipo de canal e verificar se este canal é realmente um canal de potássio e ainda analisar como ocorre o fluxo desse íon na presença de cGMP, utilizamos o corante por fluorescência seletivo para potássio PBFI, AM, (Molecular Probes). Assim, na presença do corante monitoramos os zoósporos usando microscopia de fluorescência após a adição de KCl, cGMP ou cAMP. As medidas de fluorescência foram quantificadas e sua variação foi expressa no gráfico mostrado na figura 43.

Figura 43. Variação do fluxo de potássio em função da presença de GMP cíclico. $[K^+]_i$ - variação da concentração de potássio, influxo. (F/F0) - Fluorescência final dividida pela fluorescência inicial. Neste experimento foram utilizados 60 μ M de KCL, 3mM cGMP, 3mM cAMP. . * $p<0,5$. Foi utilizado para análise o teste T-Student.

A adição de GMP cíclico provocou um influxo de potássio, corroborando com os resultados observados na figura 42. Esse influxo ocorre também quando é adicionado KCl, nosso controle positivo e não é observado com a adição de AMP cíclico, nosso controle negativo,

mostrando a especificidade deste canal para GMP cíclico. A captação e o acúmulo de potássio pelos zoósporos de *B. emersonii* já haviam sido descritos anteriormente, sendo que a concentração interna desse íon pode atingir níveis superiores a 50 mM (Dayal 1996), o que é bastante interessante visto que difere do padrão de células animais, nas quais normalmente ocorre efluxo de potássio (Dayal 1996). Acredita-se que esse acúmulo de potássio possa estar relacionado com a germinação uma vez que a adição de 50 mM de KCl mostrou ser um forte indutor desse processo (Jen and Haug 1981; Dayal 1996). O oomiceto *Achlya heterosexalis* possui concentrações de potássio vacuolar acima de 100 mM, sendo provavelmente o cátion mais abundante nesse organismo e relacionado com o movimento de seus zoósporos, aparentemente estimulando o movimento circular dessas células (Thomas and Butler 1989). Appiah e colaboradores também mostraram que mudanças na concentração de potássio alteram a velocidade, a frequência de mudanças de direção, trajetória e o encistamento de zoósporos de cinco espécies de oomycetos (Appiah et al. 2005). Sendo assim, nossos dados indicam que *B. emersonii* tem um canal de potássio responsivo especificamente a GMP cíclico envolvido com a captação desse íon e com o movimento flagelar dos zoósporos.

4.4. Perfil dos níveis de proteína de BeGC1, BeGC2, BeGC3 e BeCNG1 ao longo do ciclo de vida de *Blastocladiella emersonii* avaliados utilizando a técnica de western blot.

Uma vez que os níveis dos transcritos das três guanilato ciclases (Vieira et al. 2009) e do canal (item 3.3.) avaliados por qRT-PCR mostraram-se mais elevados nas fases finais da esporulação (correspondente ao término da formação e liberação dos zoósporos), começamos a avaliar se os níveis das proteínas correspondentes seguiam o mesmo padrão. Utilizando extratos proteicos totais obtidos em diferentes tempos após a indução da esporulação (0, 60, 90 e 120

minutos) e na fase de zoósporo, a quantidade relativa de cada proteína foi determinada, após separação em gel de poliacrilamida-SDS seguindo-se experimentos de western blot utilizando os anticorpos policlonais produzidos conforme descrito no item 4.16.

Figura 44 : Perfil dos níveis protéicos de BeGC1, BeGC2, BeGC3 e BeCNG1 ao longo da esporulação de *Blastocladiella emersonii*. Western blots de extratos proteicos de diferentes pontos da esporulação. Tempos de indução da esporulação por carência nutricional conforme descrito no item 4.2.: Tempo zero (0 min); 60 minutos (60 min); 90 minutos (90 min); 120 minutos (120 min) e zoósporos (zoos).

As quatro proteínas analisadas têm seus maiores níveis na fase de zoósporo (figura 44). Tendo em vista que os perfis dos transcritos observados anteriormente tinham seus maiores níveis nas fases finais da esporulação, podemos inferir o aumento dos mRNAs durante a esporulação se reflete no acúmulo das respectivas proteínas nos zoósporos liberados no final deste processo. O acúmulo dessas proteínas nos zoósporos corrobora a importância delas nesta fase.

4.5. Caracterização da fototaxia dos zoósporos de *Blastocladiella emersonii*

4.5.1. Investigação do papel de BeGC1 e BeCNG1 na fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii*

Como visto anteriormente, a proteína BeGC1 possui 2 domínios, um domínio rodopsina ligado a um domínio de guanilato ciclase por uma hélice de sinalização, sugerindo sua ativação por luz. Sua localização na estrutura de “eyespot” dos zoósporos de *B. emersonii* sugere também seu papel na resposta à luz. Saranak & Foster (1997) reportaram que zoósporos do fungo *Allomyces reticulatus* nadavam em direção a uma fonte de luz, e que essa ação seria devido a rodopsinas que provavelmente estariam presentes nos “eyespot” dos zoósporos deste fungo. Essas rodopsinas tinham sua excitação máxima no comprimento de onda de 530 nm, região correspondente ao verde no espectro de luz visível. Com base nesse artigo e tendo em vista a proximidade filogenética de *Blastocladiella* e *Allomyces*, decidimos investigar se os zoósporos de *B. emersonii* realizavam fototaxia e qual o possível papel de BeGC1 neste processo.

O experimento de fototaxia mostrado na figura 45 mostra que zoósporos de *B. emersonii* nadam em direção à luz, visto que placas expostas à luz apresentaram um número de células de cerca de 5 vezes maior na posição da fonte de luz do que em placas mantidas no escuro. O mesmo experimento também foi realizado na presença do inibidor de rodopsina hidroxilamina (500 μ M) (Saranak and Foster 1997), sendo observado que a fototaxia foi inibida, o que indica que o fenômeno observado nos zoósporos de *B. emersonii* também envolve uma rodopsina. É importante ressaltar que no genoma sequenciado de *B. emersonii* além da rodopsina em BeGC1, só encontramos uma sequência com similaridade a uma melanopsina. Assim o domínio rodopsina presente no gene BeGC1 é a única rodopsina encontrada em *B. emersonii*. Melanopsinas são

proteínas fotosensoras envolvidas na regulação do ritmo circadiano e outras respostas não visuais, possuindo sensibilidade máxima próxima do comprimento de onda de 480 nm (luz azul) (Bailes and Lucas 2013). O experimento de fototaxia foi realizado utilizando uma fonte de luz verde de 521 nm, próximo ao comprimento de onda descrito por Saranak e Foster (Saranak and Foster 1997), e também uma fonte de luz vermelha de 630 nm paralelamente. O resultado mostrou que o experimento utilizando a luz vermelha de comprimento de onda de 630 nm apresenta uma resposta menor em relação à luz verde de 521 nm, corroborando com o observado em *A. reticulatus* (Saranak and Foster 1997).

Figura 45. A. Fototaxia realizada por zoósporos de *Blastocladiella emersonii* é mais eficiente sob luz verde comparada com luz vermelha e depende de rodopsina. Gráfico mostrando a contagem de zoosporângios após fototaxia, conforme descrito no item 4.17. **A.1:** zoósporos mantidos no escuro, **2:** zoósporos expostos à luz verde (522 ± 17 nm; 4.4 mW/cm²); **3:** zoósporos expostos à luz verde na presença de hidroxilamina 500 μ M e **4:** placa exposta à luz vermelha (633 ± 13 nm; 4.4 mW/cm²). * $p < 0,5$. Foi utilizado para análise o teste T-Student **B.** Fotos tiradas ao final de dois dos experimentos de fototaxia.

Para melhor caracterizar a influência do comprimento de onda da fonte de luz para a fototaxia refizemos o experimento utilizando mais um comprimento de onda. Nesse experimento foi utilizada uma abordagem diferente, a migração dos zoósporos em uma câmara de

microfluídica em resposta à luz, método no qual não dependíamos mais da germinação dos zoósporos para a quantificação da fototaxia. Foram testados três comprimentos de onda correspondentes às regiões do azul, do verde e do vermelho do espectro de luz visível. Verificamos que a fonte de luz verde é mais eficiente para promover a fototaxia do que a fonte de luz vermelha ou a fonte de luz azul (figura 46). Assim, esses dados corroboram nossos resultados anteriores (figura 45) e aqueles descritos para *Allomyces reticulatus* (Saranak and Foster 1997), novamente reforçando a ideia de que uma rodopsina seria a responsável pela fototaxia observada nos zoósporos de *B. emersonii*.

Figura 46. Fototaxia é mais eficiente com fonte de luz verde comparada com luz azul e vermelha. Gráfico mostrando a contagem de zoósporos após fototaxia, conforme descrito no item 4.18. **1.** zoósporos expostos à luz azul (465 ± 25 nm; $67 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). **2.** zoósporos expostos à luz verde (565 ± 25 nm; $55 \mu\text{W}/\text{cm}^2$) e **3.** zoósporos expostos à luz vermelha (620 ± 30 nm; $35 \mu\text{W}/\text{cm}^2$). * $p < 0,5$. Foi utilizado para análise o teste T-Student

Para confirmar que uma rodopsina seria a proteína sensora responsável pela fototaxia de *B. emersonii*, uma nova abordagem foi realizada utilizando o inibidor da síntese de carotenóides Norflurazon (Boger 1983). A inibição da síntese de carotenóides leva a inibição da produção de retinal que tem como precursores alguns carotenóides como o betacaroteno. O retinal é o cromóforo responsável pela absorção de luz e mudança de conformação da rodopsina (Okada et

al. 2004). Assim, *B. emersonii* foi cultivado por duas gerações na presença de duas diferentes concentrações de Norflurazon e testes de fototaxia foram realizados. Importante ressaltar que os zoósporos obtidos do crescimento com o inibidor nadavam normalmente e não possuíam qualquer sinal de alteração morfológica ou em sua capacidade de germinar e seguir no ciclo de vida do fungo. Na ausência de retinal, a fototaxia foi inibida sendo essa inibição mais eficiente na presença de 50 μ M de Norflurazon comparada com 10 μ M do inibidor (figura 47, colunas 1-3). Para comprovarmos que essa inibição é específica e que este resultado observado não se deve a nenhum efeito secundário do inibidor, as células foram então complementadas com dois tipos de retinal: A1 ou A2. O retinal A1 ou 11-cis-retinal tem seu máximo de absorção na faixa do verde e está presente nas rodopsinas de mamíferos e outros eucariotos (Saari 2012; Gehring 2014). Resultados de eficiência da fototaxia em diferentes comprimentos de onda observados anteriormente nos levaram a supor que este seja o retinal nativo presente em *B. emersonii*. Esta suposição foi corroborada pela complementação dos zoósporos de *B. emersonii* com retinal A1 e restauração da fototaxia mais eficiente em luz verde em relação à luz vermelha na presença deste cromóforo (figura 47, colunas 4 e 5). Também realizamos o mesmo experimento complementando os zoósporos com o retinal A2 ou 11-cis-dehydroretinal. Este cromóforo é utilizado como pigmento visual por animais aquáticos primitivos cuja absorção máxima se situa na faixa do vermelho (Sineshchekov et al. 2012). Conforme o esperado, vimos que a fototaxia na presença do retinal A2 passa a ser mais eficiente em luz vermelha comparada com a luz verde (figura 47, colunas 6 e 7). Esta transição de absorção de luz do verde para o vermelho na presença de retinal A2 é característica de rodopsinas, distinguindo-as de melanopsinas e novamente reforçando a hipótese de que seria BeGC1 a responsável pela fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii*.

Para melhor compreendermos a função de BeGC1 e tendo em vista os resultados obtidos, passamos a investigar o papel do domínio de guanilato ciclase na fototaxia observada. Para tal, realizamos o experimento de fototaxia na presença do inibidor de guanilato ciclase LY83583 (Schmidt et al. 1985). Foi possível observar que a fototaxia é inibida na presença de LY83583, sem causar perda da motilidade do zoósporo, mostrando a importância do domínio de guanilato ciclase para esse processo (figura 47, coluna 8).

Figura 47. Fototaxia de zoósporos crescidos na presença de Norflurazon. Contagem dos zoósporos crescidos na ausência (coluna 1), na presença de 10 µM (coluna 2), ou 50 µM (coluna 3) de Norflurazon expostos a luz verde; colunas 4 -7: zoósporos crescidos na presença de 50 µM de Norflurazon e complementados com retinal A1 expostos a luz verde (coluna 4); ou vermelha (coluna 5); complementados com retinal A2 expostos à luz verde (coluna 6); ou vermelha (coluna 7). Coluna 8, zoósporos crescidos na ausência de Norflurazon, incubados com 10 µM do inibidor de guanilato ciclases LY83583 expostos a luz verde. O comprimento de onda utilizado para a luz verde foi 565 ± 25 nm; $55 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ e para a luz vermelha foi 620 ± 30 nm; $35 \mu\text{W}/\text{cm}^2$. * $p < 0,5$. Foi utilizado para análise o teste T-Student

Para melhor investigar o papel do domínio de guanilato ciclase e seu envolvimento com a rodopsina, os níveis de GMP cíclico em zoósporos na presença de luz verde foram determinados tanto na ausência ou presença do inibidor de rodopsina hidroxilamina. Os níveis de GMP cíclico

sofrem um rápido e transiente aumento na presença de luz verde, o que não é observado quando a rodopsina está inibida por hidroxilamina (figura 48A). Este resultado mostra que a ativação da rodopsina é necessária para o aumento dos níveis de GMP cíclico, sendo este provavelmente devido à ativação do domínio de guanilato ciclase. Para confirmar esse resultado, repetimos este experimento com zoósporos obtidos na presença de 50 μM de Norflurazon por duas gerações e complementados ou não com 10 μM retinal A1 (figura 48B). O aumento dos níveis de GMP cíclico é recuperado quando esse cromóforo é adicionado, mas não na ausência do retinal A1, comprovando assim a dependência da ativação da rodopsina para o aumento nos níveis de cGMP e reforçando a hipótese do envolvimento de BeGC1 na fototaxia em *B. emersonii*.

Figura 48. Níveis de cGMP após exposição a luz. **A.** Zoósporos exposto à luz verde na presença (colunas verde escuro) e na ausência (colunas verde claro) do inibidor de rodopsinas hidroxilamina (500 μM). **B.** Zoósporos crescidos na presença de 50 μM de Norflurazon expostos a luz verde, complementados (colunas verde claro) ou não (colunas verde escuro) com 10 μM de retinal A1. O comprimento de onda utilizado para a luz verde foi $522 \pm 17 \text{ nm}$; 4.4 mW/cm^2 . * $p < 0,5$. Foi utilizado para análise o teste T-Student

Uma vez determinado o envolvimento de rodopsina e retinal na fototaxia, investigamos se os genes codificando as proteínas relativas à síntese do cromóforo retinal (11-cis-retinal) estariam presentes no genoma de *B. emersonii*. Encontramos os genes codificando três enzimas

localizadas na via de biossíntese de carotenóides: 1) bifuncional licopeno ciclase/fitoeno sintase, 2) fitoeno desidrogenase e 3) carotenóide dioxigenase (Figura 49) (Yan et al. 2001; Sanz et al. 2011).

Figura 49. Esquema mostrando a via de produção do cromóforo retinal.

As três enzimas participam da síntese de retinal a partir geranilgeranil pirofosfato, gerado na via do mevalonato, sendo essas as principais enzimas para carotenogênese. Uma vez encontrados os genes dessas três enzimas comparamos suas sequências deduzidas com seus possíveis homólogos nos genomas dos blastocladiomicetos *A. reticulatus* e *Catenaria ssp* (que possuem genes homólogos a BeGC1 em seus genomas), do quitridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis* (que possui uma sequência similar a rodopsina em seu genoma), e do fungo patogênico de plantas *Blakeslea trispora*, pertencente a ordem dos zigomicetos e que possui as enzimas envolvidas na carotenogênese bem caracterizadas (Sahadevan et al. 2013). A comparação da sequência primária das proteínas preditas de *B. emersonii* e das espécies acima citadas mostrou que *B. emersonii* possui os genes envolvidos na síntese de carotenóides mais

similares com os genes de *A. reticulatus*, seguido por *Catenaria ssp* (tabela 11), o que era esperado devido à proximidade filogenética desses fungos. Curiosamente, embora *Batrachochytrium ssp* possua em seu genoma uma sequência similar a rodopsina, os genes envolvidos com a síntese de carotenoides e consequentemente com a produção de retinal não estão presentes nesse fungo. A baixa similaridade entre as enzimas carotenóide dioxigenase de *Blakeslea trispora* e de *Blastocladiella* provavelmente deve-se a síntese de produtos distintos por essas enzimas: a enzima de *Blakeslea trispora* tem como produto β -apo-12'-carotenal (C25), enquanto que a enzima de *B. emersonii* aparentemente produz retinal. Especula-se que o β -apo-12'-carotenal está envolvido na produção de hormônios sexuais em *Blakeslea* (Sahadevan et al. 2013).

Tabela 11. Comparação da sequência de aminoácidos deduzida das enzimas pertencentes à via de carotenogênese em diferentes fungos.

	<i>Blastocladiella emersonii</i>	<i>Allomyces macrogynus</i>	<i>Catenaria anguillulae</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	<i>Blakeslea trispora</i>
Bifuncional licopeno ciclase/fitoeno sintase	100% identidade 100% similaridade	49% identidade 63% similaridade	39% identidade 55% similaridade	-	32% identidade 49% similaridade
fitoeno dehidrogenase	100% identidade 100% similaridade	65% identidade 79% similaridade	58% identidade 66% similaridade	-	54% identidade 69% similaridade
Carotenóide dioxigenase	100% identidade 100% similaridade	57% identidade 68% similaridade	31% identidade 46% similaridade	-	29% identidade 44% similaridade

4.5.2. Modelo da sinalização celular na fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii* e comparação com a sinalização presente na visão de vertebrados.

Os resultados descritos neste trabalho indicam que BeGC1 seria a proteína sensora participante da fototaxia dos zoósporos de *Blastocladiella*. Além disso, mostramos a presença no genoma dos genes cujas proteínas estariam envolvidas na produção do cromóforo retinal e um possível canal de potássio responsivo especificamente a cGMP envolvido na captação desse íon e no movimento dos zoósporos. Com base nesses resultados, propusemos um modelo de sinalização (figura 50A) para a fototaxia de *B. emersonii* no qual a luz ativaria o domínio de rodopsina de BeGC1 provocando uma mudança conformacional que ativaria o domínio de guanilil ciclase presente nessa mesma enzima. Este domínio, uma vez ativado, produziria cGMP a partir de GTP, levando a um aumento dos níveis deste nucleotídeo cíclico na célula. As moléculas de GMP cíclico ligariam e ativariam canais de potássio responsivos a cGMP na membrana plasmática, levando a um influxo de potássio, alterando assim o movimento flagelar dos zoósporos. Assim, através dessa sinalização, os zoósporos de *B. emersonii* perceberiam a luz e nadariam em sua direção. Um ponto interessante a se levantar seria a motivação biológica para a fototaxia de *Blastocladiella*. Acredita-se que alguns organismos fotossintéticos que realizam fototaxia, como o caso da alga verde *Chlamydomonas sp.*, procuram uma iluminação ideal para fotossíntese realizando fototaxia (Jekely 2009). No caso de alguns fungos quitrídios parasitas, a fototaxia poderia conferir vantagem por aumentar seu potencial de encontro com seu hospedeiro, como no caso do quitrídio *Phlyctochytrium sp.* que parasita a alga verde *Bryopsis plumosa* (Jekely 2009). No caso de *B. emersonii* e outros Blastocladiomicetos saprófitas acreditamos que a razão biológica para a fototaxia esteja envolvida com a possível maior quantidade de nutrientes em lugares iluminados, quando comparado a ambientes escuros, relacionados à presença de algas e outros produtores de matéria orgânica (Jekely 2009).

Em invertebrados como a ostra do gênero *Pecten*, a via de fotoindução tem como um dos seus sinais o aumento de GMP cíclico, que causa a ativação de canais ativados por cGMP e seletivos para potássio, mostrando semelhança e ressaltando a importância evolutiva da sinalização encontrada em *B. emersonii*. (Gehring 2014). Para melhor ressaltar essa importância evolutiva, na figura 50 comparamos a sinalização proposta (A) com a sinalização presente em bastonetes da retina de vertebrados (B). Na sinalização envolvida com a visão em vertebrados, a luz ativa uma rodopsina na membrana de bastonetes da retina, que por sua vez ativa a proteína G transducina. A transducina troca o GDP por GTP e sua subunidade alfa é dissociada ativando uma fosfodiesterase específica para GMP cíclico pertencente à família 6. Essa fosfodiesterase hidrolisa cGMP citoplasmático a 5'GMP, reduzindo os níveis deste nucleotídeo cíclico. A redução dos níveis de cGMP leva ao fechamento de canais responsivos a esse segundo mensageiro na membrana plasmática como o canal não-seletivo de cátions CNG1. Este canal transporta principalmente sódio e cálcio levando à hiperpolarização da célula e transmissão do sinal sináptico (Fu 1995). Os níveis de cGMP são recuperados, uma vez que o fechamento dos canais leva à redução dos níveis intracelulares de cálcio, o que permite a ativação de proteínas acessórias chamadas proteínas ativadoras de guanilato ciclase (GCAPs) e essas por sua vez ativam guanilato ciclases membranares, produzindo GMP cíclico e restaurando assim os níveis desse segundo mensageiro. É interessante notar que organismos que divergiram a mais de um bilhão de anos, como *Blastocladia* e vertebrados (Lutzoni et al. 2004) possuam rodopsinas como proteínas sensoras e GMP cíclico como segundo mensageiro para sua resposta à luz. Isto nos leva a supor que a visão em vertebrados possa ter evoluído da fototaxia de organismos unicelulares como alguns autores já hipotetizaram, e que ambas as sinalizações possam ter uma origem comum (Foster 2009; Gehring 2014). Corroborando essa hipótese, alguns autores discutem se rodopsinas de microorganismos (tipo I) e animais (tipo II) teriam uma origem

comum. Embora as rodopsinas de animais possuam sua transmissão de sinal relacionada a uma proteína G sendo classificadas como GPCRs (ou receptores acoplados a proteína G), os dois grupos de rodopsinas possuem várias características em comum: a organização em sete hélices transmembrana, a ligação do retinal por uma ligação de Schiff em um resíduo específico de lisina localizado na hélice 7 e alguns resíduos importantes para ligação desse cromóforo, tornando improvável uma evolução convergente com tantas características específicas conservadas (Gehring 2014).

Figura 50. Modelo proposto para a sinalização envolvida na fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii* e sua comparação com a sinalização da visão presente em bastonetes de retina de vertebrados. A. Sinalização proposta para fototaxia de *B.emersonii*. B. sinalização da visão presente em bastonetes de vertebrados. RhII – rodopsina do tipo II, presente em animais. T - proteína G Transducina, PDE – fosfodiesterase, GC – guanilato ciclase, CNG channel, cyclic nucleotide gated channel, RhI – rodopsina do tipo I, presente em microorganismos, BeCNG1 channel - cyclic nucleotide gated channel 1 de *B. emersonii*, DM – membrana discoide, PM – membrana plasmática, EM – membrana do “eyespot”.

4.6. Comparação das proteínas da via de sinalização por cGMP encontradas em *B. emersonii* com as presentes em outros fungos da classe dos blastocladiomicetos e quitridiomicetos.

A sinalização pelo segundo mensageiro GMP cíclico parece estar ausente na maioria dos fungos incluindo ascomicetos e basidiomicetos (os fungos mais bem estudados), sendo que nenhuma guanilato ciclase ou fosfodiesterase específica para cGMP foi identificada em genomas publicados de fungos (Johnson and Leroux 2010).

No genoma de *Batrachochytrium dendrobatidis*, um fungo pertencente à classe dos quitridiomicetos que também tem uma fase móvel em seu ciclo de vida, encontramos genes similares a cGMP fosfodiesterases e guanilato ciclases sugerindo assim que este fungo possui a sinalização por GMP cíclico. *B. dendrobatidis* é um patógeno de anfíbios responsável pela morte e declínio de populações inteiras de sapos em todo o mundo (Rebollar et al. 2014). Como este fungo possui modo de vida e habitat distintos do nosso modelo de estudo, resolvemos procurar em seu genoma por genes similares aos encontrados nos Blastocladiomicetos, *Blastocladiella emersonii*, *Allomyces macrogynus* e *Catenaria anguillulae* (tabela 12). O resultado dessa busca mostrou que a sinalização por luz envolvida na fototaxia de *B. emersonii* pode estar presente também em *A. macrogynus* e *C. anguillulae*, o que é bastante interessante, pois a fototaxia em *A. macrogynus* já havia sido reportada anteriormente (Saranak and Foster 1997). Entretanto, esta sinalização aparentemente está ausente em *Batrachochytrium*, o que sugere que esta via seria específica de Blastocladiomicetos. Esses dados são corroborados pelas árvores filogenéticas construídas por nossos colaboradores no sequenciamento do genoma de *B. emersonii* (Avelar et al. 2014).

É interessante notar que embora algumas proteínas como BeGC1, BeGC3 e BeCNG1 possuam maior similaridade com proteínas de *C. anguillulae* do que com proteínas de *A. macrogynus*, outras proteínas como BeGC2 e a melanopsina só possuem homólogos em *A. macrogynus*. Ainda, para cada proteína encontrada em *B. emersonii*, mais de um homólogo é encontrado em *A. macrogynus*, sugerindo uma possível duplicação gênica neste fungo. Essas comparações evidenciam quão complexas são as relações entre o genoma desses fungos, sendo necessários mais estudos para esclarecê-las.

Tabela 12. Comparação das sequências primárias das proteínas de *Blastocladiella emersonii* com proteínas similares em *Allomyces macrogynus*, *Catenaria anguillulae* e *Batrachochytrium dendrobatidis*.

<i>Blastocladiella emersonii</i>	<i>Allomyces macrogynus</i>	<i>Catenaria anguillulae</i>	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>
BeGC1 (626 aa)	AMAG_09565.1 (585 aa) Identidade 67%/ Similaridade 87% AMAG_07932.1 (748 aa) Identidade 60%/ Similaridade 94% AMAG_13844.1 (634 aa) Identidade 59/ Similaridade 83%	Catan1 133119 (626 aa) Identidade 78%/ Similaridade 93%	
BeGC2 (640 aa)	AMAG_04266.1 (794 aa) Identidade 45%/ Similaridade 61% AMAG_01768.1 (794 aa) Identidade 45%/ Similaridade 61% AMAG_14633.1 (851 aa) Identidade 39%/ Similaridade 59% AMAG_12672.1 (778 aa) Identidade 37%/ Similaridade 56%		

BeGC3 (1071 aa)	AMAG_04610.2 (1062 aa) Identidade 44%/ Similaridade 65% AMAG_03310.1 (734 aa) Identidade 38%/ Similaridade 59% AMAG_00279.2 (1037 aa) Identidade 34%/ Similaridade 71% AMAG_10845.2 (1042 aa) Identidade 34%/ Similaridade 70% AMAG_05289.2 (1049 aa) Identidade 34%/ Similaridade 70%	Catan1 73564 (1040 aa) Identidade 63%/ Similaridade 84% Catan1 409340 (944 aa) Identidade 30%/ Similaridade 62%	BDEG_00667 (993 aa) Identidade 30%/ Similaridade 67% BDEG_02490 (1028 aa) Identidade 29%/ Similaridade 61%
BeCNG1 (697 aa)	AMAG_11395.1 (502 aa) Identidade 46%/ Similaridade 65% AMAG_13855.1 (565 aa) Identidade 46%/ Similaridade 65% AMAG_16089.1 (659 aa) Identidade 45%/ Similaridade 65% AMAG_14476.1 (739 aa) Identidade 31%/ Similaridade 57% AMAG_08057.1 (732 aa) Identidade 30%/ Similaridade 56% AMAG_12518.1 (475 aa) Identidade 30%/ Similaridade 56%	Catan1 122074 (755 aa) Identidade 52%/ Similaridade 70%	BDEG_00030 (609 aa) Identidade 21%/ Similaridade 52%
	AMAG_04178.1 (489 aa) Identidade 75%/ Similaridade 94% AMAG_01685.1 (490 aa)	Catan1 123900 (492 aa) Identidade 76%/ Similaridade 92%	BDEG_08369 (483 aa) Identidade 43%/ Similaridade 72%

BePDE (484 aa)	Identidade 74%/ Similaridade 93% AMAG_00863.1 (602 aa) Identidade 51%/ Similaridade 70% AMAG_02368.1 (644 aa) Identidade 48%/ Similaridade 57%		
Melanopsina (368 aa)	AMAG_11340.1 (493 aa) Identidade 34%/ Similaridade 56%		

Batrachochytrium possui genes similares aos genes BeGC3, BeCNG1 e BePDE, o que sugere a existência de uma via de sinalização por cGMP que envolveria guanilato ciclases responsivas a óxido nítrico, cGMP fosfodiesterases e canais responsivos a cGMP. Assim embora *B. emersonii*, *A. macrogynus*, *C. anguillulae* e *B. dendrobatidis* aparentemente possuam sinalização por cGMP, seus componentes divergem entre si, sendo as proteínas de *Blastocladiella* mais similares com as presentes nos genomas de *Allomyces* e *Catenaria* do que de *Batrachiochytrium*, o que já era esperado devido à posição filogenética relativa desses fungos (James et al. 2006).

5. Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho mostram que a sinalização por cGMP está presente em *B. emersonii* sendo demonstrada a função de uma nova guanilil ciclase BeGC1, que contém um domínio rodopsina N-terminal e um domínio guanilil ciclase C-terminal unidos por uma hélice de sinalização numa única cadeia polipeptídica, na fototaxia dos zoósporos deste fungo. Através de microscopia de imunofluorescência localizou-se a guanilil ciclase BeGC1 na organela denominada “eyespot”, encontrada próxima ao flagelo do zoósporo, corroborando com o papel desta guanilil ciclase na fototaxia. Experimentos de fototaxia e de determinação dos níveis de GMP cíclico em resposta à luz, realizados na presença ou ausência de inibidores tanto da função de rodopsina quanto de guanilil ciclase, demonstraram que ambos os domínios de BeGC1 são necessários para a fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii*.

Um dos resultados mais importantes encontrados durante a caracterização da via de sinalização da fototaxia de *B. emersonii* foi o papel da guanilil ciclase BeGC1 neste processo. A fusão entre o domínio sensor rodopsina e o domínio guanilil ciclase em uma única proteína, com a luz ativando diretamente a atividade ciclase é uma observação inédita na literatura. O envolvimento de cGMP na fototaxia de um organismo unicelular também não havia sido descrito anteriormente. Além disso, a presença da rodopsina e do cGMP na via de sinalização da fototaxia de *B. emersonii* reforça a hipótese de que a visão em vertebrados, que também envolve a rodopsina e o segundo mensageiro cGMP, tenha sua origem na fototaxia de um organismo ancestral unicelular o que está de acordo com o trabalho de Gerhing (Gehring, 2014).

A descoberta no genoma de *B. emersonii* de um possível canal de potássio ativado por cGMP, denominado BeCNG1, semelhante ao canal envolvido na visão de vertebrados e ao canal que atua na quimiotaxia de espermatozoides de ouriço do mar, sugeriu um possível papel para

este tipo de canal na fototaxia de zoósporos. Sua localização tanto na membrana plasmática quanto no flagelo do zoósporo reforçaram esta hipótese. Ensaios de microscopia e microfluorimetria utilizando o inibidor Cis-diltiazem, específico de canais dependentes de cGMP, indicaram uma possível relação de BeCNG1 com o influxo de potássio e a motilidade em zoósporos de *B. emersonii*. Em conjunto, esses resultados sugerem fortemente um possível papel deste tipo de canal na via de transdução de sinal da fototaxia de *B. emersonii*.

A análise da enzima recombinante correspondente à fosfodiesterase BePDE demonstrou a atividade desta enzima na degradação preferencial de cGMP a 5'GMP, quando comparada com a degradação de cAMP. A importância do resíduo E389 de BePDE para a especificidade por cGMP também foi demonstrada. Estes dados reforçam a semelhança observada entre essa fosfodiesterase e as pertencentes à família 9A, bem como sugerem sua importância para a sinalização por cGMP em *B. emersonii*. Assim, não podemos descartar a possibilidade de BePDE participar da própria via de sinalização da fototaxia dos zoósporos, já que o cGMP deve retornar a seus níveis basais após a exposição à luz.

As sequências completas das guanilil ciclases BeGC2 e BeGC3 também foram obtidas e comparadas com outras enzimas do banco de dados do NCBI, revelando semelhanças e diferenças importantes. Dados acerca da localização subcelular de cada proteína nos permitiram inferir suas possíveis funções celulares. BeGC2 mostrou semelhança com guanilil ciclases membranares, embora nenhum domínio transmembrana tenha sido predito *in silico*. Sua localização no capacete nuclear de zoósporos sugere uma relação com a sinalização envolvida na germinação e talvez na biossíntese de proteínas. BeGC3 apresentou similaridade de sequência com uma guanilil ciclase solúvel ativada por óxido nítrico, além de apresentar localização difusa no citoplasma que corrobora com a hipótese de sua provável regulação por NO. Esta identificação condiz com os dados obtidos previamente em nosso laboratório (Vieira et al, 2005)

que indicaram a existência e possível papel na esporulação de uma guanilil ciclase responsiva a óxido nítrico.

A comparação das proteínas estudadas neste trabalho com o banco de dados dos genomas dos fungos *Allomyces macrogynus*, *Catenaria anguillulae* e *Batrachochytrium dendrobatidis*, cujos genomas ainda não foram publicados, permitiu observar que embora os fungos analisados apresentem genes correspondentes a vários componentes da via de sinalização por cGMP, a via responsável pela fototaxia de *B. emersonii* parece ser específica da classe dos Blastocladiomicetos, visto que um ortólogo de BeGC1 não foi encontrado no quitridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Em conclusão, esta tese mostrou a importância da via de sinalização por cGMP para a fototaxia dos zoósporos de *B. emersonii* com a caracterização de alguns de seus componentes. Foi caracterizada uma proteína de fusão rodopsina-guanilil ciclase inédita e essencial para a resposta à luz em *B. emersonii*, sendo a via de sinalização por cGMP aqui analisada a primeira via de transdução de sinal regulada por este segundo mensageiro caracterizada em fungos.

6. Referências

- Appiah, A. A., P. van West, et al. (2005). "Potassium homeostasis influences the locomotion and encystment of zoospores of plant pathogenic oomycetes." *Fungal Genet Biol* **42**(3): 213-223.
- Avelar, G. M., R. I. Schumacher, et al. (2014). "A rhodopsin-guanylyl cyclase gene fusion functions in visual perception in a fungus." *Curr Biol* **24**(11): 1234-1240.
- Bailes, H. J. and R. J. Lucas (2013). "Human melanopsin forms a pigment maximally sensitive to blue light (lambda_{max} approximately 479 nm) supporting activation of G(q/11) and G(i/o) signalling cascades." *Proc Biol Sci* **280**(1759): 20122987.
- Baker, D. A. and J. M. Kelly (2004). "Purine nucleotide cyclases in the malaria parasite." *Trends Parasitol* **20**(5): 227-232.
- Barbieri, C. L. and E. P. Camargo (1975). "Esterase activity during the life cycle of *Blastocladiella emersonii*." *J Bacteriol* **124**(3): 1626-1627.
- Berthold, P., S. P. Tsunoda, et al. (2008). "Channelrhodopsin-1 initiates phototaxis and photophobic responses in *Chlamydomonas* by immediate light-induced depolarization." *Plant Cell* **20**(6): 1665-1677.
- Biel, M. (2009). "Cyclic nucleotide-regulated cation channels." *J Biol Chem* **284**(14): 9017-9021.
- Bieszke, J. A., E. L. Braun, et al. (1999). "The nop-1 gene of *Neurospora crassa* encodes a seven transmembrane helix retinal-binding protein homologous to archaeal rhodopsins." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(14): 8034-8039.
- Boger, P. a. S., G. (1983). "Pigment biosyntheses and herbicides interaction." *Photosynthetica* **28**: 481-493.
- Bondarenko, V. A., F. Hayashi, et al. (2010). "Involvement of rhodopsin and ATP in the activation of membranous guanylate cyclase in retinal photoreceptor outer segments (ROS-GC) by GC-activating proteins (GCAPs): a new model for ROS-GC activation and its link to retinal diseases." *Mol Cell Biochem* **334**(1-2): 125-139.
- Bonigk, W., A. Loogen, et al. (2009). "An atypical CNG channel activated by a single cGMP molecule controls sperm chemotaxis." *Sci Signal* **2**(94): ra68.
- Bracker, W. and C. J. Wirth (1984). "[Knee arthroplasty - another late result 34 years later]." *Aktuelle Traumatol* **14**(1): 20-22.
- Brown, L. S. (2004). "Fungal rhodopsins and opsin-related proteins: eukaryotic homologues of bacteriorhodopsin with unknown functions." *Photochem Photobiol Sci* **3**(6): 555-565.
- Cantino, E. C. (1951). "Metabolism and morphogenesis in a new *Blastocladiella*." *Antonie Van Leeuwenhoek* **17**(5): 325-362.
- Cantino, E. C. and L. C. Truesdell (1970). "Organization and fine structure of the side body and its lipid sac in the zoospore of *Blastocladiella emersonii*." *Mycologia* **62**(3): 548-567.
- Cantino, E. C. and L. C. Truesdell (1971). "Light-induced encystment of *Blastocladiella emersonii* zoospores." *J Gen Microbiol* **69**(2): 199-204.
- Correa, J. U., Rodrigues, V. and Lodi, W.R. (1979). Proteases of *Blastocladiella emersonii*: developmental patterns and sensitivity to inhibitors in vitro and in vivo. *International Conference on Limited Proteolysis in Microorganisms*. G. N. C. a. H. Holzer. Washington, D.C: 127-130.
- Dayal, R., Ed. (1996). *Advances in Zoosporic Fungi*. New Delhi, Vijay K. Gupta.
- de Oliveira, J. C., A. C. Borges, et al. (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**(1-2): 555-562.
- Fietto, L. G., L. Pugliese, et al. (2002). "Characterization and expression of two genes encoding isoforms of a putative Na, K-ATPase in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*." *Biochim Biophys Acta* **1576**(1-2): 59-69.
- Foster, K. W. (2009). "Eye evolution: two eyes can be better than one." *Curr Biol* **19**(5): R208-210.
- Francis, S. H., M. A. Blount, et al. (2011). "Mammalian cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular mechanisms and physiological functions." *Physiol Rev* **91**(2): 651-690.

- Francis, S. H., J. L. Busch, et al. (2010). "cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action." *Pharmacol Rev* **62**(3): 525-563.
- Friebe, A. and D. Koesling (2003). "Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase." *Circ Res* **93**(2): 96-105.
- Fu, Y. (1995). "Phototransduction in Rods and Cones."
- Gehring, W. J. (2014). "The evolution of vision." *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* **3**(1): 1-40.
- Georg, R. C. and S. L. Gomes (2007). "Transcriptome analysis in response to heat shock and cadmium in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*." *Eukaryot Cell* **6**(6): 1053-1062.
- Georg, R. C., R. M. Stefani, et al. (2009). "Environmental stresses inhibit splicing in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*." *BMC Microbiol* **9**: 231.
- Goldstein, A. and E. C. Cantino (1962). "Light-stimulated polysaccharide and protein synthesis by synchronized, single generations of *Blastocladiella emersonii*." *J Gen Microbiol* **28**: 689-699.
- Gomes, S. L., L. Mennucci, et al. (1978). "Adenylate cyclase activity and cyclic AMP metabolism during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*." *Biochim Biophys Acta* **541**(2): 190-198.
- Gomes, S. L., Mennucci, L., and da Costa Maia, J. C. (1980). "Induction of *Blastocladiella emersonii* germination by cyclic adenosine-3',5'-monophosphate." *Cell Differentiation* **9**(3): 163-169.
- Gottschalk, W. K. and D. R. Sonneborn (1982). "Phenotypic dissections of the *Blastocladiella emersonii* zoospore's developmental choice." *Dev Biol* **93**(1): 165-180.
- Haase, T., N. Haase, et al. (2010). "Fluorescent fusion proteins of soluble guanylyl cyclase indicate proximity of the heme nitric oxide domain and catalytic domain." *PLoS One* **5**(7): e11617.
- Hader, D. P. and M. Lebert (2009). "Photoorientation in photosynthetic flagellates." *Methods Mol Biol* **571**: 51-65.
- Heckman, D. S., D. M. Geiser, et al. (2001). "Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants." *Science* **293**(5532): 1129-1133.
- Hegemann, P. (2008). "Algal sensory photoreceptors." *Annu Rev Plant Biol* **59**: 167-189.
- James, T. Y., P. M. Letcher, et al. (2006). "A molecular phylogeny of the flagellated fungi (Chytridiomycota) and description of a new phylum (Blastocladiomycota)." *Mycologia* **98**(6): 860-871.
- Jekely, G. (2009). "Evolution of phototaxis." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**(1531): 2795-2808.
- Jen, C. J. and A. Haug (1981). "Potassium-induced depolarization of the transmembrane potential in *Blastocladiella emersonii* zoospores precedes encystment." *Exp Cell Res* **131**(1): 79-87.
- Johnson, J. L. and M. R. Leroux (2010). "cAMP and cGMP signaling: sensory systems with prokaryotic roots adopted by eukaryotic cilia." *Trends Cell Biol* **20**(8): 435-444.
- Juliani, M. H., M. R. Brochetto, et al. (1979). "Changes in cyclic AMP binding and protein kinase activities during growth and differentiation of *Blastocladiella emersonii*." *Cell Differ* **8**(6): 421-430.
- Keravis, T. and C. Lugnier (2012). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) isozymes as targets of the intracellular signalling network: benefits of PDE inhibitors in various diseases and perspectives for future therapeutic developments." *Br J Pharmacol* **165**(5): 1288-1305.
- Kim, S., H. Kim, et al. (2013). "Rapid induction of lipid droplets in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris* by Brefeldin A." *PLoS One* **8**(12): e81978.
- Li, B., Y. Fu, et al. (2010). "Cyclic GMP as a second messenger in the nitric oxide-mediated conidiation of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*." *Appl Environ Microbiol* **76**(9): 2830-2836.
- Linder, J. U. and J. E. Schultz (2002). "Guanylyl cyclases in unicellular organisms." *Mol Cell Biochem* **230**(1-2): 149-158.
- Liu, S., M. N. Mansour, et al. (2008). "Structural basis for the catalytic mechanism of human phosphodiesterase 9." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(36): 13309-13314.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* **25**(4): 402-408.
- Lovett, J. S. (1968). "Reactivation of ribonucleic acid and protein synthesis during germination of *Blastocladiella* zoospores and the role of the ribosomal nuclear cap." *J Bacteriol* **96**(4): 962-969.

- Lovett, J. S. (1975). "Growth and differentiation of the water mold *Blastocladiella emersonii*: cytodifferentiation and the role of ribonucleic acid and protein synthesis." *Bacteriol Rev* **39**(4): 345-404.
- Lucas, K. A., G. M. Pitari, et al. (2000). "Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP." *Pharmacol Rev* **52**(3): 375-414.
- Luck, M., T. Mathes, et al. (2012). "A photochromic histidine kinase rhodopsin (HKR1) that is bimodally switched by ultraviolet and blue light." *J Biol Chem* **287**(47): 40083-40090.
- Lutzoni, F., F. Kauff, et al. (2004). "Assembling the fungal tree of life: progress, classification, and evolution of subcellular traits." *Am J Bot* **91**(10): 1446-1480.
- Ma, X., A. Beuve, et al. (2010). "Crystal structure of the signaling helix coiled-coil domain of the beta1 subunit of the soluble guanylyl cyclase." *BMC Struct Biol* **10**: 2.
- Maia, J. C. and E. P. Camargo (1974). "c-AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*." *Cell Differ* **3**(3): 147-155.
- Marques Mdo, V., A. C. Borges, et al. (1992). "Coordinate pretranslational control of cAMP-dependent protein kinase subunit expression during development in the water mold *Blastocladiella emersonii*." *Dev Biol* **149**(2): 432-439.
- Marques Mdo, V. and S. L. Gomes (1992). "Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*." *J Biol Chem* **267**(24): 17201-17207.
- Matsuo, Y., B. McInnis, et al. (2008). "Regulation of the subcellular localization of cyclic AMP-dependent protein kinase in response to physiological stresses and sexual differentiation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*." *Eukaryot Cell* **7**(9): 1450-1459.
- Meng, F., J. Hou, et al. (2012). "Structure-based discovery of highly selective phosphodiesterase-9A inhibitors and implications for inhibitor design." *J Med Chem* **55**(19): 8549-8558.
- Mills, G. L. and E. C. Cantino (1977). "Isolation and characterization of lipid globules from the zoospores of *Blastocladiella emersonii*." *Arch Microbiol* **112**(2): 195-200.
- Nagel, G., D. Ollig, et al. (2002). "Channelrhodopsin-1: a light-gated proton channel in green algae." *Science* **296**(5577): 2395-2398.
- Okada, T., M. Sugihara, et al. (2004). "The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure." *J Mol Biol* **342**(2): 571-583.
- Omori, K. and J. Kotera (2007). "Overview of PDEs and their regulation." *Circ Res* **100**(3): 309-327.
- Pankey, S., H. Sunada, et al. (2010). "Cyclic nucleotide-gated channels are involved in phototransduction of dermal photoreceptors in *Lymnaea stagnalis*." *J Comp Physiol B* **180**(8): 1205-1211.
- Plachetzki, D. C., C. R. Fong, et al. (2012). "Cnidocyte discharge is regulated by light and opsin-mediated phototransduction." *BMC Biol* **10**: 17.
- Potter, L. R. (2011). "Guanylyl cyclase structure, function and regulation." *Cell Signal* **23**(12): 1921-1926.
- Rebollar, E. A., M. C. Hughey, et al. (2014). "The lethal fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* is present in lowland tropical forests of far eastern Panama." *PLoS One* **9**(4): e95484.
- Ribichich, K. F., S. M. Salem-Izacc, et al. (2005). "Gene discovery and expression profile analysis through sequencing of expressed sequence tags from different developmental stages of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*." *Eukaryot Cell* **4**(2): 455-464.
- Saari, J. C. (2012). "Vitamin A metabolism in rod and cone visual cycles." *Annu Rev Nutr* **32**: 125-145.
- Sahadevan, Y., M. Richter-Fecken, et al. (2013). "Early and late trisporoids differentially regulate beta-carotene production and gene transcript Levels in the mucoralean fungi *Blakeslea trispora* and *Mucor mucedo*." *Appl Environ Microbiol* **79**(23): 7466-7475.
- Salem-Izacc, S. M., T. Koide, et al. (2009). "Global gene expression analysis during germination in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*." *Eukaryot Cell* **8**(2): 170-180.
- Sanz, C., A. Velayos, et al. (2011). "Functional analysis of the *Phycomyces carRA* gene encoding the enzymes phytoene synthase and lycopene cyclase." *PLoS One* **6**(8): e23102.
- Saranak, J. and K. W. Foster (1997). "Rhodopsin guides fungal phototaxis." *Nature* **387**(6632): 465-466.
- Schaap, P. (2005). "Guanylyl cyclases across the tree of life." *Front Biosci* **10**: 1485-1498.

- Schmidt, M. J., B. D. Sawyer, et al. (1985). "LY83583: an agent that lowers intracellular levels of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate." *J Pharmacol Exp Ther* **232**(3): 764-769.
- Scott, J. D. (1991). "Cyclic nucleotide-dependent protein kinases." *Pharmacol Ther* **50**(1): 123-145.
- Selitreffnikoff, C. P. and D. R. Sonneborn (1977). "Alkaline phosphatase of *Blastocladiella emersonii*: partial purification and characterization." *J Bacteriol* **130**(1): 249-256.
- Shah, S. and D. R. Hyde (1995). "Two *Drosophila* genes that encode the α and β subunits of the brain soluble guanylyl cyclase." *J Biol Chem* **270**(25): 15368-15376.
- Silva, A. M., J. C. Maia, et al. (1987). "Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*." *J Bacteriol* **169**(5): 2069-2078.
- Silverman, P. M. (1976). "Regulation of guanylate cyclase activity during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*." *Biochem Biophys Res Commun* **70**(2): 381-388.
- Silverman, P. M. and P. M. Epstein (1975). "Cyclic nucleotide metabolism coupled to cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*." *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**(2): 442-446.
- Sineshchekov, O. A., E. G. Govorunova, et al. (2009). "Photosensory functions of channelrhodopsins in native algal cells." *Photochem Photobiol* **85**(2): 556-563.
- Sineshchekov, O. A., E. G. Govorunova, et al. (2012). "Enhancement of the long-wavelength sensitivity of optogenetic microbial rhodopsins by 3,4-dehydroretinal." *Biochemistry* **51**(22): 4499-4506.
- Singh, S., D. G. Lowe, et al. (1988). "Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases." *Nature* **334**(6184): 708-712.
- Smith, H. K., L. Luo, et al. (2013). "Defining specificity determinants of cGMP mediated gustatory sensory transduction in *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **194**(4): 885-901.
- Soll, D. R. and D. R. Sonneborn (1972). "Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. IV. Ion control over cell differentiation." *J Cell Sci* **10**(2): 315-333.
- Strunker, T., I. Weyand, et al. (2006). "A K⁺-selective cGMP-gated ion channel controls chemosensation of sperm." *Nat Cell Biol* **8**(10): 1149-1154.
- Subbaraya, I., C. Zhao, et al. (2003). "Structure and Ca²⁺ regulation of frog photoreceptor guanylate cyclase, ROS-GC1." *Mol Cell Biochem* **254**(1-2): 9-19.
- Thomas, D. D. and D. L. Butler (1989). "Cationic Interactions Regulate the Initiation and Termination of Zoospore Activity in the Water Mould *Achlya heterossexualis*." *Journal of General Microbiology* **135**: 1917-1922.
- Trippens, J., A. Greiner, et al. (2012). "Phototropin influence on eyespot development and regulation of phototactic behavior in *Chlamydomonas reinhardtii*." *Plant Cell* **24**(11): 4687-4702.
- Vale, M. R., S. L. Gomes, et al. (1975). "Independent cAMP and cGMP phosphodiesterases in *Blastocladiella emersonii*." *FEBS Lett* **56**(2): 332-336.
- Vale, M. R. and J. C. Maia (1976). "Changes in cGMP phosphodiesterase levels during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*." *FEBS Lett* **70**(1): 205-208.
- Vale, V. L., S. L. Gomes, et al. (1976). "Transient cyclic AMP accumulation in germinating zoospores of *Blastocladiella emersonii*." *FEBS Lett* **67**(2): 189-192.
- Van der Auwera, G. and R. De Wachter (1996). "Large-subunit rRNA sequence of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, and implications for the evolution of zoosporic fungi." *J Mol Evol* **43**(5): 476-483.
- Vieira, A. L. and S. L. Gomes (2010). "Global gene expression analysis during sporulation of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*." *Eukaryot Cell* **9**(3): 415-423.
- Vieira, A. L. G., E. Linares, et al. (2009). "Evidence of a Ca²⁺-NO-cGMP signaling pathway controlling zoospore biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*." *Fungal Genetics and Biology* **46**(8): 575-584.
- Wang, H., X. Luo, et al. (2010). "Insight into binding of phosphodiesterase-9A selective inhibitors by crystal structures and mutagenesis." *J Med Chem* **53**(4): 1726-1731.
- Winger, J. A., E. R. Derbyshire, et al. (2008). "The crystal structure of the catalytic domain of a eukaryotic guanylate cyclase." *BMC Struct Biol* **8**: 42.

-
- Yan, W., G. F. Jang, et al. (2001). "Cloning and characterization of a human beta,beta-carotene-15,15'-dioxygenase that is highly expressed in the retinal pigment epithelium." Genomics **72**(2): 193-202.
- Yu, S., L. Avery, et al. (1997). "Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3384-3387.
- Zayas, R. M., S. Qazi, et al. (2000). "Neurons involved in nitric oxide-mediated cGMP signaling in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*." J Comp Neurol **419**(4): 422-438.
- Zhang, X. and R. H. Cote (2005). "cGMP signaling in vertebrate retinal photoreceptor cells." Front Biosci **10**: 1191-1204.

SÚMULA CURRICULAR

1. DADOS PESSOAIS

Nome : Gabriela Mól Avelar Tamaki

Local e data de nascimento: São Paulo –SP, 16 de março de 1987

Endereço eletrônico: gabrielamol@usp.br ; gabriela.mol@gmail.com

2. FORMAÇÃO ACADEMICA

2.1. Graduação

Universidade Federal de Minas gerais (UFMG), Belo Horizonte –MG, 2008.

Licenciatura em Ciências Biológicas.

2.1.1. Estágios de Iniciação Científica

Estudo de atividade de proteinases do látex de *Carica candamarcensis*. Realizado no Laboratório de Biologia Molecular de Produtos Naturais. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade federal de minas Gerais, Belo Horizonte –MG, 2005-2006. Orientador Prof. Carlos Edmundo Salas Bravo.

Caracterização de leveduras que colonizam a baia de Guanabara (Rio de Janeiro-RJ) e identificação de leveduras contaminantes na indústria de vinho. Realizado no Laboratório de Biotecnologia e Ecologia de Leveduras. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade federal de minas Gerais, Belo Horizonte –MG, 2005-2006. Orientador Prof. Carlos Augusto Rosa.

3. FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

3.1. Proteção Radiológica. (Carga horária: 40h).
Universidade de São Paulo, USP. (2010)

3.2. Fundamentos da Técnica de RNA de Interferência. (Carga horária: 4h).
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. (2008)

- 3.3.** Biologia das Células-tronco. (Carga horária: 12h).
Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil. (2008)

4. OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado Direto, FAPESP, de 1 de agosto de 2009 a 31 de julho de 2014.

5. PUBLICAÇÕES

5.1. Artigos Completos em periódicos

Avelar, Gabriela M.; Schumacher, Robert I.; Zaini, Paulo A.; Leonard, Guy; Richards, Thomas A.; Gomes, Suely L. A Rhodopsin-Guanylyl Cyclase Gene Fusion Functions in Visual Perception in a Fungus. *Current Biology*, v. 24, p. 1-7, 2014.

Kohler, Christian ; Lourenço, Rogério F.; **Avelar, Gabriela M.**; Gomes, Suely L. Extracytoplasmic function (ECF) sigma factor sigmaF is involved in *Caulobacter crescentus* response to heavy metal stress. *BMC Microbiology*, v. 12, p. 210, 2012.

Denadai, A. M. ; Santoro, M. M. ; Salas, C. E. ; Lopes, M. T. ; **Avelar, G. M.** ; Guzman, F. A supramolecular complex between proteinases and beta-cyclodextrin that preserves enzymatic activity: physicochemical characterization. *BioDrugs* (Auckland), v. 20, p. 287-291, 2006.

5.2. Resumos em congressos

Avelar, G. M. ; Gomes, S. L. . Visual perception in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* In: 43 Annual Meeting SBBq, 2014, Foz do Iguaçu. 43 Annual Meeting SBBq, 2014.

Avelar, G. M. ; Gomes, S. L. . Characterization of the cyclic GMP signaling pathway in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. In: 42 Annual Meeting SBBq, 2013, Foz do Iguaçu. 42 Annual Meeting SBBq, 2013.

Avelar, G. M. ; Gomes, S. L. . Evidences of a cGMP signaling pathway in the primitive aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. In: 22nd IUBMB - 37th FEBS, 2012, Sevilla. Annals of the Congress- Abstracts, 2012. p. P06-19.

Avelar, G. M. ; Gomes, S. L. . Studies on cyclic GMP signaling in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2012, Foz do Iguaçu. Resumos do congresso, 2012.

Avelar, G. M. ; Gomes, S. L. . Study on cyclic GMP signaling in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. In: XL Annual Meeting of the Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society, 2011, Foz do Iguaçu. Anais do Congresso, 2011.

Gomes, M. T. R. ; Turchetti, A.P. ; **Avelar, G. M.** ; Campos, D. R. ; Cruz, J. S. ; Lopes, M. T. P. ; Salas, C. E. . The mechanism of action of therapeutic proteinases from caricaceae. In: The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, Porto de Galinhas. The 4th Brazilian Symposium on Medicinal Chemistry, 2008.

Avelar, G. M. ; Gomes, M. T. R. ; Goes, A. M. ; Lopes, M. T. P. ; Salas, C. E. . Diferenciação e proliferação de osteoblastos de cultura primária induzidas por cms2ms2, uma proteína de carica candamarcensis. In: IX Encontro de Pesquisa do ICB-UFMG e IV ENAPEBI, 2008, Belo Horizonte. IX Encontro de Pesquisa do ICB-UFMG e IV ENAPEBI, 2008.

Avelar, G. M. ; Gomes, M. T. R. ; Valerio, P. ; Goes, A. M. ; Lopes, M. T. P. Salas, C. E. Efeito da protease cms2ms2 na proliferação e diferenciação de cultura primária de osteoblastos. In: XVI Semana de Iniciação Científica, 2007, Belo Horizonte. XVI Semana de Iniciação Científica, 2007.

Avelar, G. M. ; Gomes, M. T. R. ; Denadai, A. M. ; Millan, R. D. S. ; Lopes, M. T. P. ; Salas, C. E. . A atividade amidásica em complexos de beta-ciclodextrina e proteinases de carica candamarcens. In: XIV Semana de Iniciação Científica, 2005, Belo Horizonte. XIV Semana de Iniciação Científica, 2005.

5.3. Apresentações orais

Gordon Research Conferences on Cellular & Molecular Fungal Biology. Light perception in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. 2014. (Congresso).

Seminários do Departamento de Bioquímica. Visual perception in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. 2014. (Seminário)

X Encontro do Departamento de Bioquímica. New guanylate cyclase containing a rhodopsin domain is essential in phototaxis in *Blastocladiella emersonii*. 2013. (Encontro).