

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL DURANTE A
GERMINAÇÃO DO FUNGO AQUÁTICO *Blastocladiella emersonii***

**SILVIA MARIA SALEM IZACC
Tese de Doutorado**

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

**São Paulo
2006**

Aos meus pais, ao meu marido e a minha amada Carolina
pelo amor e pela confiança que me tornam mais
forte e com mais vontade de continuar...

AGRADECIMENTOS

A Dra. Suely Lopes Gomes pela dedicação e competência com que desempenhou seu papel de orientadora, pelo apoio e incentivo ao longo deste trabalho.

Aos amigos do laboratório Michele, Tie, Raphaela, Karina, Cristina, Rogério, André, Humberto, José Humberto pela colaboração, amizade e convivência agradável durante todo este tempo.

A Luciana Pugliese e a Rita Simão, que já deixaram o laboratório, pelas dicas importantes no início do trabalho.

A Luci e a Sandra, além do trabalho técnico, pelas conversas e amizade. Particularmente a Luci que me auxiliou no desempenho de diversas atividades.

Aos professores Marílis do Valle Marques, Regina Baldini, Frederico J. Gueiros Filho e Beny Spira que contribuíram com este trabalho através das sugestões valiosas apresentadas nos seminários dos laboratórios.

Aos bioinformatas Apuã Paquola, Abimael Machado, Robson de Souza e Adriano Freitas por transformarem tarefas quase impossíveis em atividades simples, facilitando enormemente as análises desenvolvidas.

Em especial a Tie Koide e ao Ricardo Vêncio pela ajuda indispensável nas análises dos micro-arranjos, pelas explicações sobre estatística e pela empolgação com que trataram os dados.

A Flavia Papini Terzi que me passou todas as dicas para a construção dos micro-arranjos.

A Michele, minha grande amiga, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

A Adriana e Denise, técnicas do CAGE, sempre dispostas a ajudar.

Ao departamento de Bioquímica, Biofísica e Biologia Molecular da UFG que me liberou das minhas atividades docentes para que eu pudesse realizar este trabalho.

ÍNDICE

RESUMO	VI
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	1
1. Modelo experimental: o fungo aquático <i>Blastocladiella emersonii</i>	1
2. Síntese de RNA e proteína durante a germinação de <i>B. emersonii</i>	4
3. O processo de germinação nos fungos em geral.....	6
4. Análise em larga escala da expressão gênica em nível transcricional.....	10
OBJETIVOS	16
MATERIAL E MÉTODOS	17
1. Soluções.....	17
2. Meios de cultura.....	17
3. Cultivo do fungo <i>B. emersonii</i>	18
4. Obtenção de germinação sincrônica de <i>B. emersonii</i> para extração de RNA total.....	18
5. Extração do RNA total de <i>B. emersonii</i> e purificação do mRNA.....	19
6. Construção das bibliotecas de cDNA.....	20
7. Crescimento dos clones das bibliotecas de cDNA e preparação dos plasmídeos.....	20
8. Seqüenciamento dos cDNAs.....	22
9. Processamento das seqüências de cDNA e anotação dos genes putativos....	22
10. <i>Northern digital</i>	23
11. Micro-arranjos de DNA.....	24
11.1- Montagem dos micro-arranjos de DNA.....	24
11.2- Síntese dos cDNAs e marcação com fluoróforos.....	25
11.3- Hibridização nos micro-arranjos.....	25
11.4- Quantificação dos sinais de fluorescência.....	26
12. Análise dos dados dos micro-arranjos de DNA.....	26
12.1- Normalização dos dados.....	26
12.2- Determinação dos genes diferencialmente expressos.....	27
12.3- Agrupamento dos genes de acordo com o perfil de expressão.....	28
12.4- Determinação das categorias funcionais melhor representadas entre os genes diferencialmente expressos.....	28

13. RT-PCR quantitativo em tempo real.....	29
RESULTADOS.....	31
1. Construção das bibliotecas de cDNA e seqüenciamento das ESTs.....	31
2. Processamento e análise das ESTs.....	32
3. Anotação putativa dos genes.....	34
4. <i>Northern digital</i>	37
5. Micro-arranjos de DNA.....	39
5.1-Seleção dos clones e construção dos micro-arranjos de DNA.....	39
5.2-Hibridizações competitivas.....	44
5.3-Normalização dos dados.....	47
5.4-Determinação dos genes diferencialmente expressos.....	48
6. Análise dos genes diferencialmente expressos ao longo da germinação em meio nutriente.....	50
6.1- Agrupamento dos genes segundo o padrão de expressão e determinação das categorias funcionais altamente representadas.....	50
6.2- Genes induzidos durante a germinação em meio nutriente.....	53
6.3- Genes reprimidos durante a germinação em meio nutriente.....	60
7. Comparação da germinação em meio nutriente com a germinação induzida por adenina ou potássio	67
7.1- Análise da expressão gênica na germinação na ausência de nutrientes..	69
8. Comparação dos resultados obtidos com as técnicas de micro-arranjos de DNA e <i>Northern digital</i>	73
9. Validação dos micro-arranjos de DNA utilizando RT-PCR quantitativo em tempo real.....	74
DISCUSSÃO.....	79
1. Análise de seqüências expressas de <i>B. emersonii</i>	79
2. Análise da expressão gênica global durante a germinação em meio nutriente..	80
2.1- Genes induzidos ao longo da germinação em meio nutriente.....	80
2.2- Genes reprimidos ao longo da germinação em meio nutriente.....	82
2.3- Genes diferencialmente expressos na ausência de nutrientes.....	85
CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89
CURRICULUM VITAE.....	104
ANEXOS.....	106

RESUMO

Foi realizado um programa de seqüenciamento de cDNAs obtidos de bibliotecas da fase de germinação do fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. Os dados gerados, em conjunto com o projeto de seqüenciamento de cDNAs da fase de esporulação do fungo, permitiram a descoberta de aproximadamente 4.900 genes diferentes de *B. emersonii* (Ribichich *et al.*, 2005). Os genes putativos foram anotados e associados com as categorias funcionais descritas pelo *Gene Ontology Consortium* e encontram-se na base de dados <http://www.blasto.iq.usp.br>. O perfil de expressão dos genes foi avaliado por *Northern* digital e vários transcritos apresentaram perfil de expressão regulado durante a germinação.

Numa segunda etapa deste trabalho, cerca de 3.600 genes putativos de *B. emersonii* foram arranjados em lâminas de vidro e empregados como sondas para a investigação da expressão gênica global em células de diferentes tempos após a indução da germinação. Analisamos ainda, as diferenças entre a germinação induzida em meio nutriente e a germinação em solução inorgânica, na qual os indutores efetivos da germinação foram adenina ou íons potássio. Na germinação em meio nutriente mais de 900 genes, cerca de 26% do total presente nos micro-arranjos, mostraram-se diferencialmente expressos em pelo menos um dos tempos analisados. Foram induzidos durante a germinação, principalmente, genes envolvidos no crescimento celular, incluindo biossíntese de proteínas, transcrição e ativação do metabolismo energético. No entanto, estes genes não foram induzidos quando a germinação ocorreu em solução inorgânica. Verificamos ainda que vários transcritos envolvidos com a percepção do meio extracelular e com a sinalização celular, codificando proteínas necessárias para disparar o programa de germinação, encontram-se presentes nos zoósporos. Além disso, observamos que alguns dos transcritos encontrados nos zoósporos foram reprimidos na germinação em meio nutriente, mas mantiveram níveis elevados de expressão quando a germinação foi feita em solução inorgânica, indicando que os nutrientes exercem um papel importante na regulação da expressão de determinados genes nesta fase do desenvolvimento.

ABSTRACT

We conducted large scale cDNA sequencing from libraries obtained using RNA from germinating cells of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. Data obtained in this work, along with cDNAs from sporulating cells, lead to the discovery of nearly 4.900 different genes from *B. emersonii* (Ribichich *et al.*, 2005). The putative genes were annotated and associated with the functional categories described by the *Gene Ontology Consortium* and are available at the web site <http://www.blasto.iq.usp.br>. The expression patterns of these genes were evaluated by digital Northern analysis and we detected several transcripts that presented expression profile regulated during germination.

In a second approach, nearly 3.600 putative genes from *B. emersonii* were spotted into glass slides and used as probes to investigate the global gene expression pattern in cells isolated at different times after induction of germination. We also analyzed the differences between the germination triggered in nutrient medium and the germination in inorganic solution, in which the effective inducers of germination were either adenine or potassium ions. More than 900 genes were differentially expressed during germination in nutrient medium in at least one of the time points analyzed, which correspond to 26 % of the total genes in the microarrays. The genes induced during this process were mainly those involved in cellular growth, including protein biosynthesis, transcription and energetic metabolism. However, these genes were not induced when germination occurred in inorganic solution. In addition, we verified that many transcripts involved in sensing the environment and also in signal transduction, encoding proteins necessary to trigger the germination program, were present in the zoospores. Another finding is that some of the transcripts found in zoospores were repressed when germination proceeded in nutrient medium, but were maintained at high levels when germination occurred in inorganic solution, suggesting that nutrients exert an important role in regulating the expression of some genes in this stage of development.