

supor que a medida (M, S) de um determinado gene esteja fora dos limites das curvas homotípicas utilizando um nível de credibilidade de 99%. Este gene será considerado diferencialmente expresso, pois, em princípio, existe uma chance de apenas 1% de que o valor da razão de expressão obtido seja devido a variações ao acaso. Consideramos diferencialmente expressos os genes com no mínimo 3 réplicas válidas e que apresentaram mais de 80% das réplicas usadas fora do intervalo determinado. A figura 14 mostra as curvas homotípicas (a) e um exemplo da aplicação destes limites aos dados obtidos nas hibridizações competitivas (b).

6- Análise dos genes diferencialmente expressos ao longo da germinação em meio nutriente.

6.1- Agrupamento dos genes segundo o padrão de expressão e determinação das categorias funcionais altamente representadas.

Agrupar os genes com perfil de expressão similar é muito útil para explorar dados de expressão gênica, principalmente quando se trata de uma série temporal. O agrupamento permite a identificação de padrões e de relações entre os dados, favorecendo o entendimento das funções biológicas (Eisen *et al.*, 1998; Quackenbush, 2001). Existem diversos métodos para o agrupamento de dados, no entanto a escolha do algoritmo é feita de forma empírica.

De acordo com o critério estabelecido para determinação dos genes diferencialmente expressos, 535 genes foram induzidos e 389 genes foram reprimidos em pelo menos um tempo analisado (30, 60 ou 90 minutos) na germinação em meio nutriente. Estes genes foram agrupados conforme o padrão de expressão, em 10 grupos, utilizando o algoritmo *K-means* (figura 15).

Os micro-arranjos de DNA, bem como outras análises pós-genômicas, normalmente originam uma quantidade enorme de dados, como listas contendo centenas de genes diferencialmente expressos ou grandes grupos de genes reunidos de acordo com o perfil de expressão. A dificuldade em se extrair informações importantes destes conjuntos de genes tem levado os pesquisadores a resumir os resultados em categorias funcionais. Assim, é possível destacar categorias altamente representadas nas listas de genes obtidas pelas

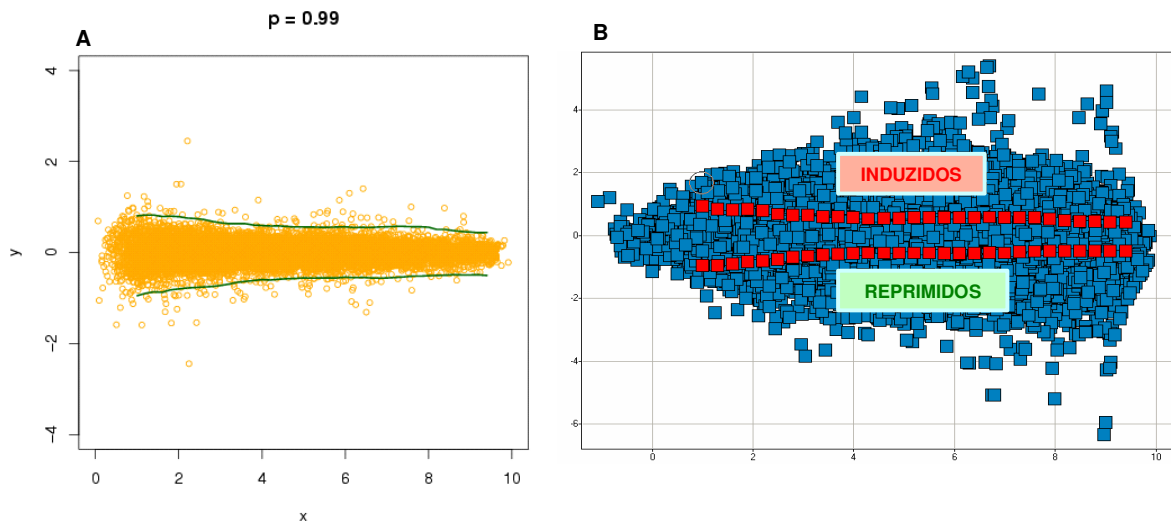


Figura 14: A- Gráfico de dispersão representando as curvas homotípicas, onde $x = \log_2(\text{Iteste}/2 + \text{Ireferência}/2)$ e $y = \log_2(\text{Iteste}/\text{Ireferência})$. O gráfico mostra o resultado de 2 experimentos independentes com RNAs de zoósporos e de 30 minutos de germinação em DM4. As linhas representam as curvas homotípicas, ou seja, os limites superior e inferior para os genes considerados não diferencialmente expressos. B- Aplicação das curvas homotípicas aos dados das hibridizações competitivas para determinação dos genes diferencialmente expressos. Os pontos acima ou abaixo das linhas vermelhas (curvas homotípicas) são considerados induzidos ou reprimidos, respectivamente.

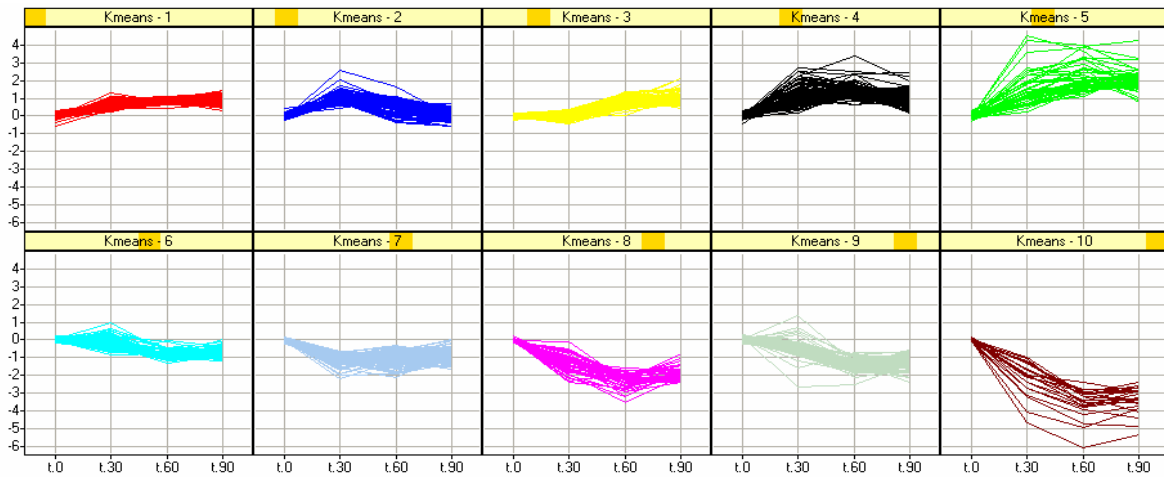


Figura 15: Agrupamento dos genes diferencialmente expressos ao longo da germinação em meio nutriente utilizando o algoritmo *K-means*. O eixo vertical representa o \log_2 da razão de expressão dos dados normalizados e o eixo horizontal representa o tempo (minutos) após a indução da germinação.

análises em larga escala dos genes expressos em determinada situação. Para facilitar a análise das nossas listas de genes diferencialmente expressos e dos grupos de genes definidos pelo *K-means*, nós utilizamos uma ferramenta implementada em <http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/BayGO> (Vêncio *et al.*, 2006) desenvolvida com o objetivo de encontrar categorias funcionais (de acordo com a terminologia do *Gene Ontology*) altamente representadas em listas de genes. Assim, analisamos as categorias funcionais com maior representação para cada grupo de genes diferencialmente expressos ao longo da germinação, conforme descrito a seguir.

6.2- Genes induzidos durante a germinação em meio nutriente

Os genes induzidos durante a germinação estão nos grupos 1 a 5 do *K-means* e aqueles que pertencem às categorias destacadas pelo BayGO estão listados na tabela 7. Estes genes correspondem principalmente aos processos biológicos necessários para o crescimento e a manutenção do crescimento celular, incluindo síntese de proteínas, metabolismo energético, transporte de nutrientes, transcrição do DNA e regulação do ciclo celular (tabelas 8).

Ao todo, 56 genes para biossíntese de proteínas foram induzidos ao longo da germinação em meio nutriente. A maioria destes genes está nos grupos K1, K3 e K4 e correspondem principalmente a proteínas ribossômicas, fatores de iniciação e de alongação da tradução. Além disso, encontramos genes envolvidos no dobramento de proteínas (K1) e na biogênese de ribossomos (K2). Estes resultados indicam que durante a germinação ocorre uma intensa síntese de partículas ribossômicas e um aumento significativo na taxa de síntese de proteínas, o que está de acordo com os dados da literatura (da Silva *et al.*, 1987).

No grupo K2 foram destacados os processos biológicos transcrição do DNA, biogênese de ribossomos, processamento de rRNAs, e biossíntese de nucleotídeos (este último em K2 e K5). Além disso, foram induzidos genes de adesão celular cuja função é necessária para fixar o fungo ao substrato, evento que ocorre durante a germinação.

VER TABELA 7

VER TABELA 7

VER TABELA 7

VER TABELA 7

Tabela 8: GOs altamente representados nos genes induzidos ao longo da germinação em meio nutriente

K	P	Descrição GO
K1	0,004	protein biosynthesis
	0,016	small GTPase mediated signal transduction
	0,022	calcium ion transport
	0,04	protein folding
K2	0,002	rRNA processing
	0,002	transcription
	0,014	ribosome biogenesis
	0,018	purine nucleotide biosynthesis
	0,018	cell adhesion
	0,022	amino acid metabolism
K3	0	protein biosynthesis
	0,026	glycolysis
K4	0	translation initiation factor activity
	0	protein biosynthesis
	0,016	carbohydrate transport
	0,022	oligopeptide transport
	0,034	cell cycle
K5	0	tricarboxylic acid cycle
	0,006	glycolysis
	0,008	fatty acid biosynthesis
	0,048	anion transport
	0,048	GTP biosynthesis
	0,05	UTP biosynthesis
	0,05	protein-nucleus import

P = significância da associação

Também foi possível observar a indução de transcritos que codificam transportadores de carboidratos e de oligopeptídeos (K4), provavelmente envolvidos na captação de nutrientes do meio. Neste mesmo grupo foram encontrados dois transcritos envolvidos na regulação do ciclo celular, os quais são necessários para entrada da célula na fase S e mitose. Estes genes podem estar associados à re-entrada do fungo no ciclo celular que ocorre na germinação.

Vários transcritos envolvidos no metabolismo energético foram induzidos durante a germinação, a maioria deles se encontra no grupo K5. Foram induzidos também genes que codificam enzimas da via glicolítica (K3 e K5), do ciclo do ácido cítrico (K5) e da biossíntese de ácidos graxos (K5). É importante ressaltar que alguns destes transcritos codificam enzimas regulatórias destas vias (piruvato quinase/glicólise; citrato sintase e isocitrato desidrogenase/ciclo do ácido cítrico).

Os genes que apresentaram maior nível de indução durante a germinação estão listados na tabela 9 e pertencem aos grupos K4 ou K5. Esses genes fazem parte de processos biológicos importantes na germinação de *B. emersonii*, sendo que vários destes processos foram destacados nas categorias funcionais altamente representadas entre os genes induzidos (tabela 8). O gene que corresponde a uma proteína contendo o domínio Brix, envolvido na biogênese e montagem de ribossomos, apresentou indução de 22 vezes aos 30 minutos da germinação. O gene codificando uma putativa difitina sintase também apresenta indução de cerca de 20 vezes neste mesmo tempo da germinação. A difitina é um aminoácido não usual encontrado no fator de alongação EF-2. Estes dados confirmam que durante a germinação em meio nutriente ocorre um aumento significativo na síntese de proteínas de *B. emersonii*. Genes envolvidos no transporte de peptídeos, utilização de carbono, biossíntese de ácidos graxos, glicólise e ciclo do ácido cítrico também apresentam nível de indução bastante alto ao longo da germinação induzida por nutrientes.

Tabela 9: Os 20 genes que apresentaram maior nível de indução durante a germinação de *B. emersonii* em meio nutriente.

Clone	Melhor alinhamento (Swiss-Prot)	Razão de indução				K	Descrição GO
		t=0	t=30	t=60	t=90		
BeG30N20D08	Q9UUG1 Brix domain containing protein 1 homolog	0,96	22,94	12,38	2,85	5	ribosome biogenesis and assembly
BeG120N02B04	P32469 Diphthine synthase	0,96	19,29	15,78	6,06	5	diphthine synthase activity
BeE30N20D06	No match	0,96	12,04	14,52	9,71	5	
BeG60N06G05	P79078 Delta-9 fatty acid desaturase	1,02	3,41	15,14	18,64	5	fatty acid biosynthesis
BeE30N10D02	Q06593 Similar to S. CERVISIAE hypothetical prote	0,99	4,72	10,41	3,92	4	oligopeptide transport
BeG120N12G04	Q8TFN0 Nucleoside diphosphate kinase	0,87	5,54	9,58	9,19	5	GTP biosynthesis
BeG120N23E01	O13302 Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, m	0,99	3,56	9,58	2,41	5	tricarboxylic acid cycle
BeG30N20G08	Q8NIH8 Nuclease Le3	0,96	5,98	8,88	4,69	5	endonuclease activity
BeG60N08E04	O42468 PP2A inhibitor	0,90	5,06	7,41	3,10	5	nucleosome assembly
BeG60N19C12	No match	1,18	2,89	6,41	4,26	5	-
BeG30N19E11	No match	0,99	2,17	6,32	1,72	5	-
BeG30N17H01	O94122 Pyruvate kinase	0,92	2,99	6,19	4,00	5	glycolysis
BeE30N17A03	P40897 Oligopeptide transporter 1	1,15	4,00	4,00	6,36	5	oligopeptide transporter activity
BeE60N13C09	P07144 Outer mitochondrial membrane protein porin	1,10	2,00	2,75	6,19	5	ion transport
BeG120N26D12	Q9Y8G5 NAD-specific glutamate dehydrogenase	0,94	1,44	5,17	5,35	4	amino acid metabolism
BeG90N18F12	Q9SA73 T5I8.3 protein	1,03	6,41	5,78	4,63	4	GTP binding
BeG30N15D05	Q8Y2Q8 Probable carbonic anhydrase protein	1,01	6,59	4,44	4,63	5	carbon utilization
BeG90N02H02	Q871M5 Probable nucleosome assembly protein I	0,97	5,70	4,92	3,12	4	nucleosome assembly
BeE60H15C05	P87144 Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic	1,09	5,06	4,89	2,04	5	amino acid activation
BeE60N10G05	Q96MM6 Heat shock 70 kDa protein 12B	1,03	3,12	5,17	1,28	4	ATP binding

*os valores representam a mediana da razão de indução de todas as réplicas válidas.

6.3- Genes reprimidos durante a germinação em meio nutriente

É importante ressaltar que os eventos iniciais da germinação não dependem de síntese de RNA, portanto os mRNAs necessários para disparar este processo e para que ocorram as primeiras alterações morfológicas, como a retração do flagelo, a formação da célula redonda e a síntese da parede estão armazenados nos zoósporos. Assim, analisamos também os transcritos presentes nos zoósporos e que foram reprimidos durante a germinação.

Os genes reprimidos, pertencentes às categorias destacadas pelo BayGO, estão listados na tabela 10. Neste grupo encontramos vários transcritos envolvidos na percepção do ambiente e na sinalização celular, que são necessários para disparar o processo de germinação. Verificamos também a presença de transcritos envolvidos na síntese de parede celular, além de histonas, responsáveis pela organização dos cromossomos. Os processos biológicos altamente representados nos grupos K6 a K10, estão na tabela 11.

Sensores/sinalização celular

Os zoósporos apresentam uma única alternativa de desenvolvimento, que é a germinação. Por isso, é essencial que possuam toda a maquinaria de sensoriamento ambiental e de sinalização que lhes permitam escolher o momento certo para germinar. No grupo K9 encontramos vários transcritos, presentes nos zoósporos, que codificam sensores de ambiente e também genes envolvidos em vias de sinalização celular. Dentre eles podemos citar os transportadores de aminoácidos (K9), que de acordo com a literatura atuam também como sensores de nutrientes (Holsbeeks *et al.*, 2004; Hatsoglou *et al.*, 2004). Também encontramos nos zoósporos transcrito codificando uma histidina-quinase sensora/reguladora de resposta putativa (anexo 2, K9). As histidina-quinases participam de um sistema de sinalização celular amplamente utilizado em procariotos e também em alguns eucariotos. Estas enzimas catalisam a transferência de grupos fosfato envolvendo dois componentes, uma proteína histidina-quinase (HK) e uma proteína efetora, o regulador de resposta (RR). A HK atua como um sensor do ambiente e se autofosforila,

VER TABELA 10

VER TABELA 10

Tabela 11: GOs altamente representados nos genes reprimidos ao longo da germinação em meio nutriente.

K	P*	Descrição GO
K6	0,014	chitin synthase activity
	0,036	proton transport
K7	0,016	signal transduction
	0,022	actin binding activity
K8	0,046	ion channel activity
K9	0	amino acid transport
	0,002	intracellular protein transport
	0,002	protein serine/threonine kinase activity
	0,016	calcium ion binding activity
	0,04	signal transducer activity
K10	0	chromosome organization and biogenesis

*P = significância da associação.

gerando um grupo fosfato de alta energia que é transferido para o RR, que por sua vez, efetua a resposta ao estímulo.

A sinalização celular está entre as categorias do GO melhor representadas entre os transcritos presentes nos zoósporos. Foram encontrados vários transcritos envolvidos em diferentes vias de sinalização (K7 e K9). Entre estes estão aqueles que codificam: a subunidade alfa de duas proteínas G heterotriméricas, uma fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos, as fosfatases PP2A e calcineurina, uma fosfatase estimulada pela calmodulina, proteínas da via MAP quinase, um membro da família das GTPases pequenas da família Ras e também a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP (PKA) de *B. emersonii*.

A subunidade catalítica da PKA de *B. emersonii* foi clonada e caracterizada (de Oliveira *et al.*, 1994). Foi demonstrado que esta proteína está presente em altos níveis nos zoósporos (Marques *et al.*, 1992) e que a sua atividade é máxima nos zoósporos, caindo na germinação (Juliani *et al.*, 1979).

A atividade da proteína fosfatase PP2A de *B. emersonii* também foi estudada. A PP2A é uma serina/treonina fosfatase envolvida em vários processos celulares, incluindo a

regulação de enzimas metabólicas e de proteínas envolvidas em sinalização celular. PP2A é uma proteína trimérica composta por uma subunidade catalítica, uma subunidade regulatória e uma terceira subunidade variável. Foi demonstrado que em *B. emersonii* a atividade desta fosfatase é regulada durante o desenvolvimento. Sua atividade é alta durante a esporulação e atinge níveis máximos nos zoósporos. A PP2A de *B. emersonii* parece estar envolvida na regulação da síntese de quitina. Demonstrou-se também que o ácido ocadáico, um potente inibidor desta fosfatase, induz o encistamento de *B. emersonii* (Etchebehere *et al.*, 1993). Nos nossos experimentos com micro-arranjos de DNA observamos que o transcrito correspondente à subunidade regulatória da PP2A está presente nos zoósporos e seus níveis diminuem significativamente durante a germinação. É interessante notar, que o oposto ocorre com o transcrito do putativo inibidor da PP2A, cuja expressão aumenta bastante durante a germinação (tabela 9).

Nossos resultados mostraram que vários transcritos relacionados à percepção do ambiente estão presentes nos zoósporos e são reprimidos durante a germinação em meio nutriente. O mesmo acontece com os mensageiros de genes que participam de diferentes vias de sinalização (proteínas G, MAP quinases, Ras, fosfatases, fosfodiesterase de nucleotídeos cíclicos e PKA). Estes dados indicam que as alterações morfológicas que ocorrem durante a germinação de *B. emersonii* podem ser o resultado da atuação de várias vias de sinalização atuando de forma coordenada.

Síntese da parede celular

Entre as categorias altamente representadas nos genes reprimidos durante a germinação está o gene da quitina sintase, enzima necessária para a síntese da parede celular de *B. emersonii*. Nossos dados mostram que dois genes distintos codificando quitina sintases putativas (K6) têm seus transcritos presentes nos zoósporos, porém durante a germinação a expressão de ambos foi reprimida. Sabe-se que a síntese da parede acontece nos primeiros 10 a 15 minutos da germinação e ocorre mesmo na ausência de transcrição e de síntese de proteínas. Portanto, este parece ser um evento regulado em nível de pós-tradução (Maia, 1994).

Actina

A germinação de *B. emersonii* envolve um rearranjo radical da arquitetura celular: os zoósporos são convertidos em células redondas que dão origem aos germes, capazes de crescer. A actina é uma das principais proteínas do citoesqueleto e está envolvida na determinação da morfologia celular. Pudemos observar que o transcrito da actina (anexo 2, grupo K8) está presente nos zoósporos e seus níveis diminuem durante a germinação. Além da actina, encontramos uma categoria do GO altamente representada no grupo K7: “ligação à actina”. Observamos dois transcritos envolvidos nesta função molecular: a profilina putativa e também um transcrito que apresenta similaridade com uma proteína hipotética de *N. Crassa*.

A actina e os genes necessários para a organização do citoesqueleto estão envolvidos nos estágios iniciais da germinação de *S. cerevisiae*, *S. pombe* e *D. discoideum*. Em *B. emersonii* sabe-se que a actina não é sintetizada durante a germinação. No entanto, a proteína está presente até 1 hora após a indução da germinação e só desaparece após duas horas de crescimento, sugerindo o envolvimento de microfilamentos na reorganização das organelas típicas dos zoósporos durante a germinação (da Silva e Juliani, 1988). Vale ressaltar mais uma vez que as alterações morfológicas que acontecem nos primeiros 25 minutos da germinação não dependem da síntese de proteínas ou de RNA, o que justifica a diminuição na expressão dos genes da actina e das proteínas que se ligam a actina após os 30 minutos de germinação.

Histonas

O nível de expressão dos mRNAs das histonas cai muito durante a germinação de *B. emersonii*, como podemos observar no grupo K10. Este fato pode estar relacionado com alterações na estrutura da cromatina e com o desbloqueio da transcrição e da replicação do DNA durante a germinação. Os genes que codificam as histonas também são reprimidos na transição dimórfica de *Cryptococcus neoformans* (Steen *et al.*, 2002) e *P. brasiliensis* (Nunes *et al.*, 2005), resultando em alterações significativas no transcrito destes fungos.

Em *S. cerevisiae*, a depleção da histona H4 induz alterações na expressão de aproximadamente 25 % dos genes (Wyrick *et al.*, 1999).

Observamos ainda que a expressão do gene da histona desacetilase também cai durante a germinação de *B. emersonii* (anexo 2, grupo K6). A desacetilação das histonas serve como uma etiqueta para a repressão epigenética e desempenha um papel importante na regulação da transcrição, na progressão do ciclo celular e durante o desenvolvimento. Portanto, a presença de transcritos que codificam as histonas e a histona desacetilase nos zoósporos parece um dos mecanismos utilizados pelo fungo para bloquear a transcrição e a replicação nesta fase do desenvolvimento. A repressão destes genes durante a germinação pode induzir alterações na estrutura da cromatina, favorecendo a retomada da transcrição e da replicação do DNA.

Genes que apresentaram o maior nível de repressão durante a germinação em meio nutriente

A tabela 12 mostra os genes que apresentaram a maior queda no nível de expressão durante a germinação de *B. emersonii*. Vários destes genes putativos não apresentam qualquer similaridade com o banco de dados utilizado (a descrição deste banco de dados está em material e métodos, item 9). Entre os genes com identificação putativa estão 3 histonas, além da actina e de um transportador de aminoácidos. Os genes que apresentaram maior nível de repressão fazem parte, principalmente, do grupo K10.