

Tabela 12: Os 20 genes que apresentaram maior nível de repressão durante a germinação de *B. emersonii* em meio nutriente.

Clone	Melhor alinhamento (Swiss-Prot)	Razão de repressão				K	Descrição GO
		*t=0	*t=30	*t=60	*t=90		
BeG90N03D10	No match	1,04	24,93	67,18	39,95	10	
BeE120N38E01	No match	1,04	16,34	30,70	14,22	10	
BeZSPN13C02	No match	1,06	8,94	26,35	28,64	10	
BeZSPN11A12	No match	1,01	8,82	18,38	13,00	10	
BeE60N19C09	No match	1,09	6,73	15,35	20,97	10	
BeZSPN15B02	No match	0,90	6,50	13,64	10,56	10	
BeE90N21E03	No match	0,97	5,28	10,93	6,41	10	
BeZSPN15F06	No match	1,00	5,28	13,09	9,71	10	
BeE60H28B01	P10989 Actin	1,04	4,38	9,25	3,29	8	actin cytoskeleton
BeZSPN11G07	No match	1,01	4,17	7,78	5,13	10	
BeG30N01C09	No match	1,08	4,03	5,21	7,46	10	
BeZSPN11B02	Q8NIQ8 Histone H4	1,03	3,97	10,56	10,70	10	chromosome organization and biogenesis
BeZSPN17H06	O06479 YFNA protein	1,00	3,71	13,18	7,31	10	amino acid transport
BeE30N02C10	Q9HDN1 Histone H3	1,02	3,14	11,24	11,39	10	chromosome organization and biogenesis
BeE30N14D03	Q7ZUY3 Hypothetical protein	0,93	2,50	7,84	7,16	10	chromosome organization and biogenesis
BeZSPN17B10	No match	1,01	2,50	9,06	16,45	10	
BeE60H06B09	Q07135 Histone H2A, orphon	1,01	2,45	7,46	12,04	10	chromosome organization and biogenesis
BeZSPN16H11	Q8W0U2 Hypothetical protein	1,00	2,38	9,13	9,92	10	membrane
BeZSPN13F01	No match	1,06	2,27	9,00	10,48	10	
BeZSPN15A06	No match	1,07	2,01	12,82	8,40	10	

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

7- Comparação da germinação em meio nutriente com a germinação induzida por adenina ou potássio

Analizamos também as diferenças entre a germinação induzida em meio nutriente e a germinação em solução inorgânica contendo adenina ou potássio. Como já foi descrito na Introdução, a adenina é um inibidor da fosfodiesterase e parece induzir a germinação por acarretar um aumento na concentração intracelular de cAMP. Por sua vez, sugeriu-se que o potássio dispara a germinação porque causa a despolarização da membrana celular, possivelmente ativando uma proteína G heterotrimérica, que por sua vez ativaria a adenilato ciclase.

Morfologicamente, no microscópio ótico (Figura 16), observamos poucas diferenças nos primeiros 30 minutos entre a germinação induzida em meio nutriente e a germinação em solução inorgânica. A única diferença morfológica que pode ser observada neste tempo

é que as células tratadas com adenina apresentam-se um pouco maiores do que as células cuja germinação foi induzida em meio nutriente, ou na presença de potássio. Aparentemente, este fato está relacionado com a cinética de indução da germinação descrita por Gomes e colaboradores (1980), que relataram que o pico de formação das células redondas ocorre alguns minutos antes na presença de adenina. Conforme mostra a figura 16, aos 30 minutos de germinação, a parede celular já está formada e o tubo germinal começa a aparecer. A partir dos 60 minutos podemos verificar o crescimento do tubo germinal em todas as condições estudadas. Aos 90 minutos torna-se evidente que as células incubadas em meio nutriente apresentam um crescimento maior do que aquelas que germinaram em solução inorgânica. Observamos também a presença de pontos escuros no citoplasma das células tratadas com adenina ou potássio.

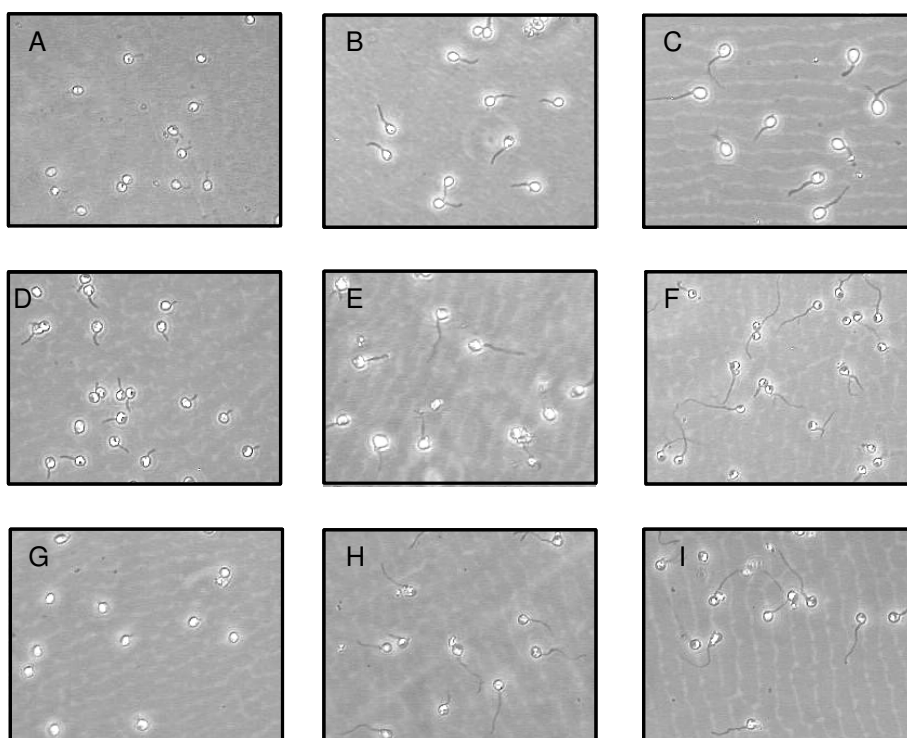


Figura 16: Microscopia ótica de células em diferentes tempos e condições de germinação. A, B e C- germinação em meio nutriente DM4 (30, 60 e 90 minutos, respectivamente); D, E e F- germinação na presença de adenina 2,5mM (30, 60 e 90 minutos, respectivamente); G, H e I- germinação induzida por potássio 50mM (30, 60 e 90 minutos, respectivamente).

7.1- Análise da expressão gênica na germinação na ausência de nutrientes

Comparamos a expressão gênica global entre a germinação induzida por adenina ou potássio com a germinação em meio nutriente utilizando os micro-arranjos de DNA. Para isso, foram empregados RNAs isolados de células aos 30 e 60 minutos de germinação, conforme o esquema de hibridizações competitivas mostrado na tabela 5.

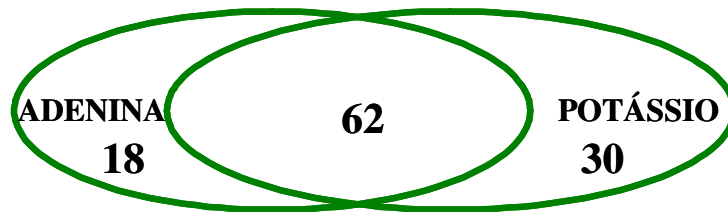
Observamos que um grande número de genes diferencialmente expressos foram induzidos ou reprimidos tanto na germinação induzida por adenina como por potássio, em comparação com a induzida em meio nutriente (figura 17). Estes dados indicam que a ausência de nutrientes no meio é o fator responsável pela ativação ou repressão de vários genes.

Genes Induzidos

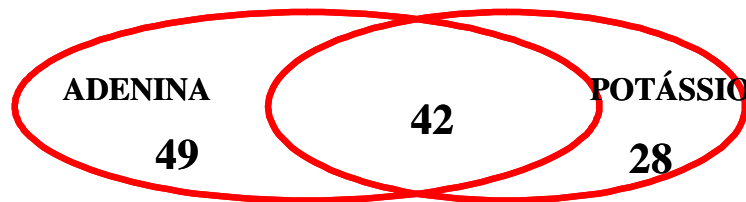
Aos 30 minutos da germinação, 42 genes foram induzidos tanto na presença de adenina como de potássio, em comparação com a induzida na presença de nutrientes. Destes, apenas 27 apresentaram identificação putativa, conforme mostrado na tabela 13. Quando comparamos a tabela 13 com a tabela 10, observamos que grande parte destes genes já estava presente nos zoósporos e desapareceram na germinação em meio nutriente, mas continuaram sendo expressos quando a germinação foi induzida na ausência de nutrientes. Os processos biológicos mais comuns, representados nesta lista de genes foram transporte de aminoácidos (8 genes) e organização e biogênese de cromossomos (6 genes). Estes dados reforçam a idéia de que os transportadores de aminoácidos agem como sensores e por isso não desapareceram quando a germinação ocorreu na ausência de nutrientes. Os genes que codificam as histonas também foram reprimidos em meio nutriente, mas não por adenina e potássio, indicando que a repressão da transcrição de alguns genes e da replicação do DNA se mantém quando a germinação ocorre na ausência de nutrientes. O mesmo aconteceu com os genes envolvidos no metabolismo de ácidos graxos, apontando a necessidade da utilização das reservas endógenas da célula na germinação induzida por adenina ou por potássio.

30 MINUTOS DE GERMINAÇÃO

Expressão ↓ em relação ao meio nutriente

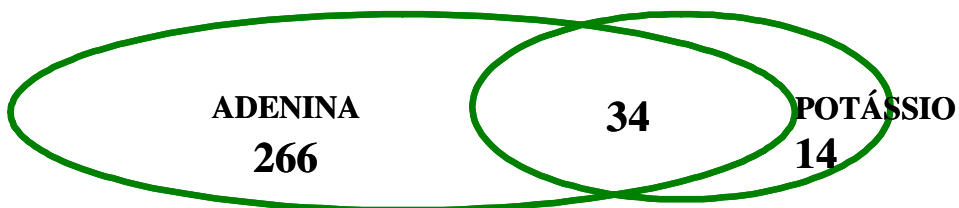


Expressão ? em relação ao meio nutriente



60 MINUTOS DE GERMINAÇÃO

Expressão ↓ em relação ao meio nutriente



Expressão ? em relação ao meio nutriente

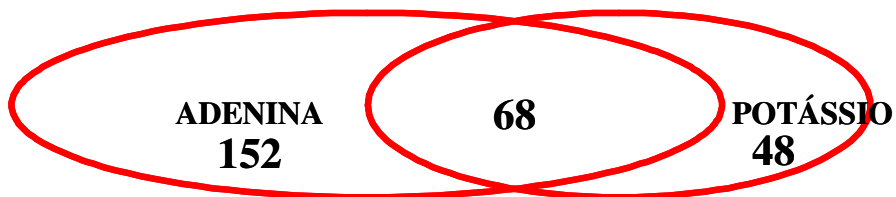


Figura 17: Número de genes diferencialmente expressos na germinação promovida por adenina e por potássio e os genes comuns, induzidos ou reprimidos nas duas situações.

Tabela 13: Genes induzidos aos 30 min de germinação na presença de adenina ou potássio em relação à germinação em meio nutriente mostrando suas respectivas descrições nas categorias do GO.

Clones	Melhor Alinhamento (Swiss-Prot)	Descrição GO
BeE120N01A01	Q87C40 Cationic amino acid transporter	Amino acid transport
BeE120N09C08	Q8P9N1 Cationic amino acid transporter	Amino acid transport
BeE30N06E01	Q9A910 Amino acid permease family protein	Amino acid transport
BeE60H21G09	Q8RBT1 Amino acid transporters	Amino acid transport
BeG60N01F09	Q7S4C6 Hypothetical protein	Amino acid transport
BeZSPN17H06	O06479 YFNA protein	Amino acid transport
BeG30N13H09	Q7NK14 Gll1666 protein	Amino acid transport
BeE30N10F07	Q81IU3 Amino acid permease	Amino acid transport
BeE60C17C02	P38356 Metal homeostatis protein BSD2	cation transport
BeE30N02C10	Q9HDN1 Histone H3	chromosome organization and biogenesis
BeE60H06B09	Q07135 Histone H2A, orphon	chromosome organization and biogenesis
BeE60N03D06	O15819 Histone H3	chromosome organization and biogenesis
BeZSPN03D06	Q9HDN1 Histone H3	chromosome organization and biogenesis
BeZSPN11B02	Q8NIQ8 Histone H4	chromosome organization and biogenesis
BeE30N14D03	Q7ZUY3 Hypothetical protein	chromosome organization and biogenesis
BeZSPN10H02	Q7RW00 Hypothetical protein	electron transport
BeZSPN02F03	P33121 Long-chain-fatty-acid—CoA ligase 2	fatty acid metabolism
BeE60N19B01	Q95R88 SD01152p	fatty acid metabolism
BeG90N18F10	Q8SZ87 RE13747p	mitosis
BeE60N09D01	Q86A56 Similar to Cucurbita cv. Kurokawa Amakuri.	oxidoreductase activity
BeG30N06H02	P48234 Hypothetical WD-repeat protein in MOL1-NAT2	rRNA processing
BeE60N09G02	Q12702 Protein phosphatase PP2A regulatory subunit	signal transduction
BeZSPN14D10	O93787 Chs3	transferase activity
BeG30N09H07	P52493 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	ubiquitin cycle
BeE90N01D10	Q9Y823 Probable homocitrate synthase, mitochondria	amino acid biosynthesis
BeZSPN09E08	Q7Z8B6 H(+)-ATPase	proton transport
BeG30N15D05	Q8Y2Q8 Probable carbonic anhydrase protein	carbon utilization

Encontramos apenas 7 transcritos induzidos por adenina ou potássio que não estavam presentes nos zoósporos. Dentre estes, 3 apresentaram identificação putativa: uma H⁺-ATPase, envolvida no transporte de prótons; uma provável anidrase carbônica, envolvida na utilização de carbono e na manutenção do pH intracelular; e uma homocitrato sintase. A enzima homocitrato sintase catalisa a primeira reação da via α -aminoadipato, utilizada para síntese de lisina em alguns fungos. Esta enzima parece ser um ponto importante no controle do fluxo metabólico desta via (Bhattacharjee, 1985). A lisina pode ser convertida em acetil-CoA e então entrar no ciclo do ácido cítrico. Portanto é possível que na ausência de nutrientes, a célula passe a sintetizar precursores metabólicos para produção de energia.

Aos 60 minutos da germinação em solução inorgânica, as categorias do GO indicam que as células começaram a expressar genes relacionados às condições de estresse a que foram submetidas pela ausência de nutrientes no meio (tabela 14). Foram induzidos genes envolvidos no catabolismo de DNA, proteólise, resposta a toxinas e apoptose.

Tabela 14- Categorias do GO altamente representadas entre os genes induzidos aos 60 minutos na germinação em solução inorgânica em relação à germinação na presença de nutrientes.

P*	Descrição GO
0	DNA catabolism
0,02	response to toxin
0,11	amino acid transport
0,12	acyl-CoA metabolism
0,15	amino acid metabolism
0,16	carbon utilization
0,16	osmosensory signaling pathway via two-component system
0,17	calcium-transporting ATPase activity
0,18	arginine catabolism
0,2	Apoptosis
0,23	DNA repair
0,23	proteolysis and peptidolysis
0,3	G-protein coupled receptor protein signaling pathway
0,3	microtubule associated complex
0,31	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity

*P- significância da associação

Genes reprimidos

A tabela 15 mostra as categorias do GO altamente representadas entre os genes que foram reprimidos quando a germinação ocorreu em solução inorgânica contendo adenina ou potássio (30 e 60 min), em relação àquela que ocorre na presença de nutrientes. Dentre os genes reprimidos nestas condições estão aqueles envolvidos na biogênese de ribossomos, biossíntese de proteínas, biossíntese de nucleotídeos, transcrição, estabelecimento da polaridade celular, transporte e glicólise. Todos estes processos são necessários para o crescimento celular. Uma outra categoria destacada foi a de ciclo celular, o que sugere um bloqueio neste evento quando a célula germina na ausência de nutrientes.

Tabela 15: Categorias do GO altamente representadas entre os genes reprimidos na germinação em solução inorgânica em relação à germinação em meio nutriente.

30 minutos de germinação		60 minutos de germinação	
P*	Descrição GO	P	Descrição GO
0,01	ribosome assembly	0,08	rRNA primary transcript binding activity
0,03	ribosome biogenesis	0,11	protein targeting
0,03	establishment of cell polarity	0,11	protein biosynthesis
0,04	rRNA processing	0,14	protein transport
0,18	cell motility	0,2	processing of 27S pre-rRNA
0,2	citrulline metabolism	0,2	pseudouridine synthesis
0,22	regulation of translational initiation	0,21	protein-mitochondrial targeting
0,23	CTP biosynthesis	0,25	ribosome biogenesis
0,24	translational termination	0,26	Transcription
0,25	GTP biosynthesis	0,34	nucleosome assembly
0,26	ubiquitin-dependent protein catabolism	0,37	helicase activity
0,27	purine salvage	0,38	rRNA processing
0,3	arginine biosynthesis	0,4	Transport
0,32	cytokinesis	0,44	translation initiation factor activity
0,32	glycolysis	0,45	small GTPase mediated signal transduction
0,33	UTP biosynthesis	0,48	regulation of transcription, DNA-dependent
0,35	nucleosome assembly	0,5	chaperone activity
0,48	transcription		
0,5	cell cycle		

*P- significância da associação

Genes envolvidos em sinalização celular

Vários genes envolvidos em sinalização cujos transcritos são observados nos zoósporos, não foram diferencialmente expressos quando comparamos a germinação em meio nutriente com a germinação induzida por adenina ou potássio (tabela 16). Estes resultados sugerem que as mesmas vias de sinalização celular foram ativadas independentemente do estímulo inicial utilizado para disparar o processo de germinação.

Tabela 16: Genes envolvidos em sinalização celular que apresentaram o mesmo perfil de expressão independentemente do indutor da germinação.

Clone	Melhor alinhamento (Swiss-Prot)
BeE60N16D02	P34046 Guanine nucleotide-binding protein alpha-8
BeE120N18F01	Q86WN6 Phosphodiesterase PDE9A13
BeE60N03C06	Q9HDE1 Calcineurin B regulatory subunit
BeE120N04B04	Q95WR8 PXF isoform C
BeG60N08H03	Q8J0B8 G protein alpha subunit
BeE60N11G06	Q05116 Dual specificity mitogen-activated protein
BeZSPN16D09	Q12741 cAMP-dependent protein kinase catalytic sub
BeZSPN18G07	Q9HEW4 Ste20 a kinase
BeE120N28F02	Q9Y7W8 MAP kinase kinase

8- Comparação dos resultados obtidos com as técnicas de micro-arranjos de DNA e Northern digital

Avaliamos os resultados obtidos nos micro-arranjos de DNA com os resultados do Northern digital (<http://blast0.iq.usp.br>) a fim de comparar as duas técnicas utilizadas na determinação da expressão dos genes estudados. Para isso, comparamos o perfil dos genes diferencialmente expressos ao longo da germinação em meio nutriente com o perfil de expressão dos contíguos correspondentes no Northern digital. Ao todo, 167 transcritos foram checados manualmente.

É importante notar que as duas metodologias determinam o perfil de expressão dos genes de forma diferente. O Northern digital avalia a abundância de cada transcrito em relação ao número total de seqüências analisadas; enquanto os micro-arranjos de DNA comparam a expressão de cada gene em duas condições diferentes. Assim, optamos por comparar as duas metodologias considerando a direção da modulação na expressão gênica de cada transcrito nos tempos 0, 30, 60 e 90 minutos da germinação.

Dos 167 transcritos analisados, 120 (71,8 %) apresentaram perfil de expressão semelhante em pelo menos 3 dos 4 tempos avaliados nesta análise, sendo que 62 (37,1%) apresentaram coincidência nos 4 tempos. Apenas 10 entre os transcritos analisados (5,9 %) mostraram uma direção contrária na modulação da expressão na comparação entre as duas técnicas. A figura 18 mostra alguns exemplos de perfis de expressão semelhantes entre os dados obtidos com os micro-arranjos de DNA e com o Northern digital.

9- Validação dos micro-arranjos de DNA utilizando RT-PCR quantitativo em tempo real

Para validar os dados obtidos nos experimentos com os micro-arranjos de DNA, realizamos ensaios de RT-PCR quantitativo em tempo real para alguns genes selecionados. Este ensaio possibilita o monitoramento da quantidade do produto de PCR a cada ciclo da amplificação, através da medida da intensidade de fluorescência do reagente intercalante SYBR Green, que é incorporado ao DNA dupla fita.

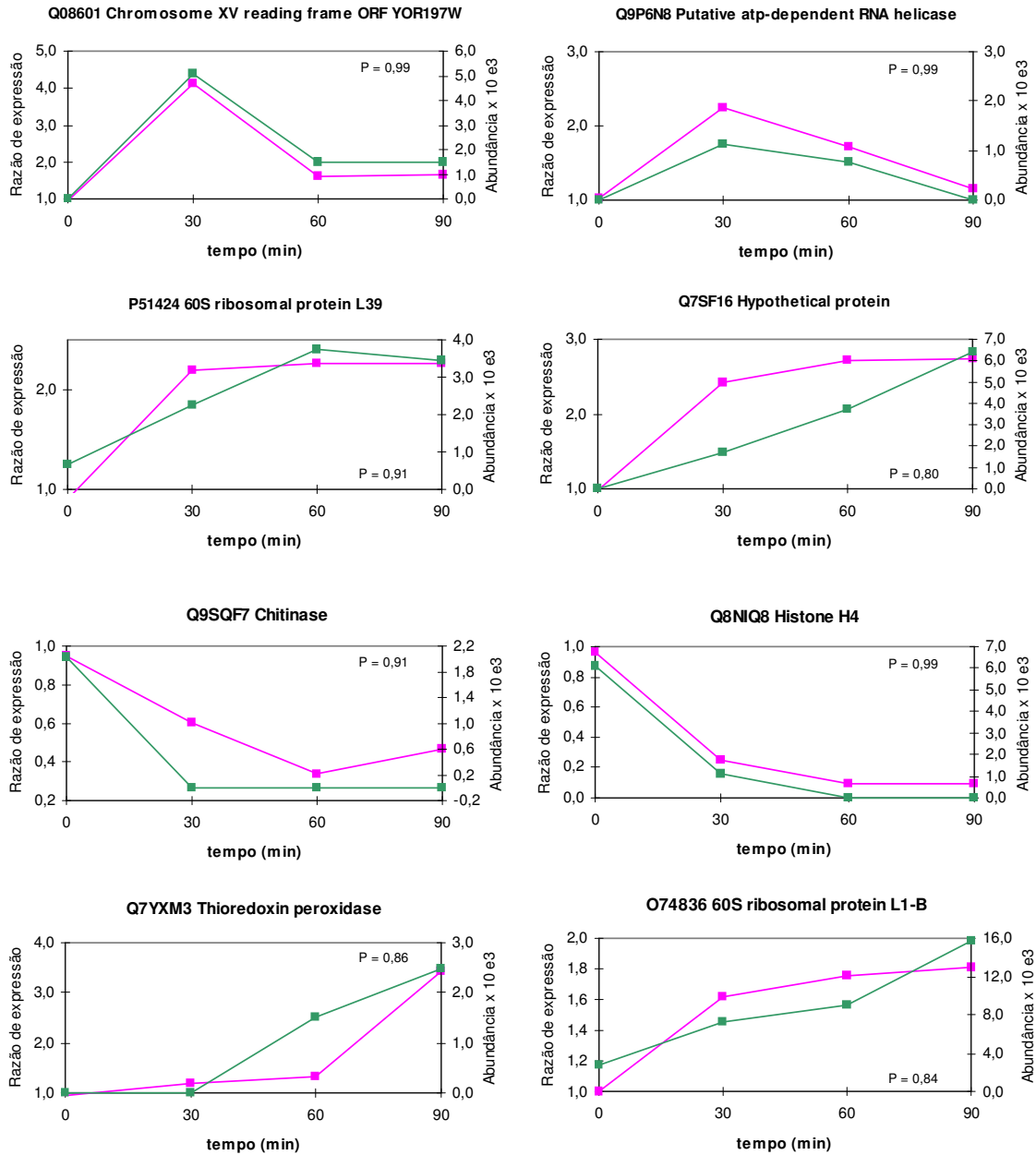


Figura 18: Comparação entre os perfis de expressão obtidos por *Northern* digital e micro-arranjos de DNA em diferentes tempos da germinação. As linhas rosas representam os micro-arranjos de DNA e as linhas verdes o *Northern* digital.

O RT-PCR em tempo real foi realizado para avaliar 7 genes selecionados, nos tempos 30, 60 e 90 minutos da germinação em meio nutriente, e também aos 30 e 60 minutos da germinação induzida por adenina. Utilizamos para normalizar os dados o gene que corresponde a uma RNA helicase mitocondrial putativa, cujo transcrito não se altera nos experimentos de micro-arranjos de DNA. Nestes ensaios, o RNA de zoósporos (t = 0 min) foi utilizado como referência. Os experimentos foram realizados em duplicata, a partir de duas amostras de RNA independentes.

Na tabela 17 estão listados os genes selecionados para validação e seus respectivos valores de razão de expressão nos diferentes tempos da germinação em meio nutriente.

Tabela 17: Genes selecionados para RT-PCR quantitativo em tempo real. Os valores correspondem à mediana do \log_2 da razão de expressão (M) de todas as réplicas.

Clone	Melhor alinhamento (Swiss-Prot)	Log ₂ da razão de expressão			
		t=0	t=30	t=60	t=90
BeE30N05E04	Q7Z940 Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	0,02	0,39	0,85	0,95
BeG30N15D01	Q8K1A0 Similar to HSPC133 protein	0,22	1,54	1,12	0,88
BeE30N15A04	P79083 Eukaryotic translation initiation factor 3	0,01	1,84	2,31	1,38
BeE30N10C03	Q9W2N0 F-actin capping protein alpha subunit	0,03	0,58	0,75	0,75
BeE60H28B01	P10989 actin	-0,05	-2,13	-3,21	-1,72
BeG60N08H03	Q8J0B8 G protein alpha subunit	0,03	-0,50	-1,29	-1,42
BeE60H06B09	Q07135 Histone H2A, orphon	-0,01	-1,29	-2,90	-3,59
BeE60H30D04*	Q9FLF1 Mitochondrial RNA helicase-like protein	0,09	0,07	0,03	0,06

* - Este gene foi utilizado para normalizar os dados.

Todos os genes avaliados nos experimentos realizados em diferentes tempos da germinação confirmaram o perfil de expressão e os resultados estão na figura 19.

Na germinação induzida por adenina (30 e 60 min) utilizamos como referência RNA de células de 30 e 60 minutos de germinação em meio nutriente, respectivamente. A comparação entre as metodologias de micro-arranjos de DNA e RT-PCR em tempo real foi feita considerando a direção da modulação da expressão gênica para cada gene, nos intervalos de tempo analisados. Como mostra a tabela 18, dos 14 pontos avaliados 13 mostraram a mesma direção de modulação da expressão gênica, indicando uma coincidência de 92,9% entre as duas metodologias.

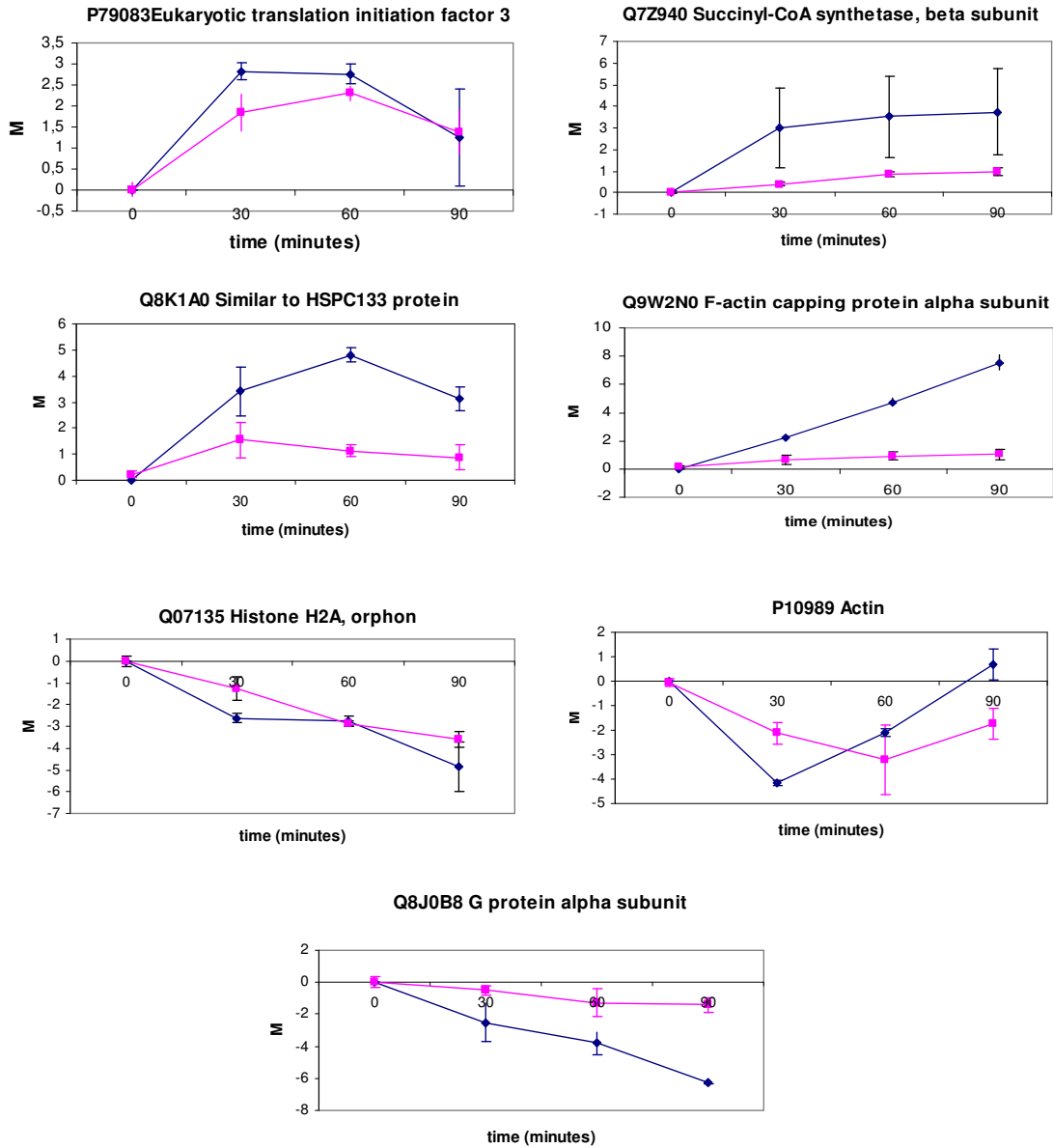


Fig.19: Validação por RT-PCR quantitativo em tempo real dos perfis de expressão obtidos nos micro-arranjos de DNA. As linhas rosas representam os dados de micro-arranjos de DNA e as linhas azuis os dados de RT-PCR quantitativo em tempo real.

Tabela 18: Comparação dos valores de razão da expressão gênica obtidos por micro-arranjos de DNA e RT-PCR em tempo real na germinação induzida por adenina.

Gene putativo	RNA	RT-PCR em tempo real	Micro-arranjos
Eukaryotic translation initiation factor 3	A30	-1,74 (0,57)	-0,74 (0,37)
	A60	-1,39 (0,62)	-1,59 (0,19)
Succinyl-CoA synthetase, beta subunit	A30	-2,16 (0,21)	-0,45 (0,15)
	A60	-0,52 (0,14)	-0,73 (0,20)
Similar to HSPC133 protein	A30	-2,32 (0,63)	-0,69 (0,59)
	A60	-2,13 (0,35)	-0,86 (0,40)
F-actin capping protein alpha subunit	A30	0,40 (0,53)	-0,23 (0,14)
	A60	-0,77 (0,53)	-0,80 (0,34)
G protein alpha subunit	A30	0,31 (0,49)	0,71 (0,49)
	A60	0,55 (0,90)	0,45 (0,12)
Actin	A30	-0,05 (0,10)	0,16 (0,70)
	A60	0,83 (0,47)	1,46 (0,77)
Histone H2A, orphon	A30	1,58 (0,65)	1,83 (0,20)
	A60	0,98 (0,63)	0,88 (0,29)

^a Os valores representam a mediana do \log_2 da razão de expressão de todas as réplicas utilizadas nos experimentos. O desvio padrão está mostrado entre parênteses.

De modo geral, os ensaios de RT-PCR em tempo real apresentam valores de razão de expressão maiores do que os observados nos micro-arranjos de DNA. A correlação de *Spearman* calculada com todos os pontos experimentais foi de 0,86 mostrando uma forte correlação entre os resultados obtidos com os micro-arranjos e o RT-PCR em tempo real.