

**Universidade de São Paulo**  
**Instituto de Química**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica)**

André Luiz Gomes Vieira

**Expressão gênica diferencial durante a esporulação de**  
***Blastocladiella emersonii* e estudo da sinalização por**  
**GMP cíclico**

São Paulo  
03/03/2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

André Luiz Gomes Vieira

**Expressão gênica diferencial durante a esporulação de  
*Blastocladiella emersonii* e estudo da sinalização por  
GMP cíclico**

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

São Paulo  
2009

André Luiz Gomes Vieira

Expressão gênica diferencial durante a esporulação de *Blastocladiella emersonii* e estudo da sinalização por GMP cíclico

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

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimentos**

A Deus, pela vida e saúde.

À Prof. Dra. Suely Lopes Gomes, pela orientação, confiança e pela liberdade que me deu para desenvolver este trabalho.

Aos meus pais, José Célio e Elza Gomes, pelo carinho, dedicação e apoio.

À minha esposa Lis, por estarmos caminhando juntos e compartilhando momentos felizes e difíceis.

Aos meus irmãos, Helen, Jackeline, Neemias e Tiago pelo companheirismo, apoio e momentos divertidos.

Aos colegas de trabalho César Camilo, Rogério Lourenço, Tie Koide, Sílvia Salem-Izacc, Raphaela Georg, Humberto Tambor, Karina Ribichich, Cristina Alvarez-Martinez, Michelle Susin, Christian Kohler e Anne Krause pelo convívio sempre agradável.

À Prof. Dra Regina Baldini e seus alunos (Ana Laura, Ana Paula, Gianluca, Gilberto, Eliezer, Diogo e Patrícia), pela convivência harmoniosa no laboratório.

À Sandra Mara e Luci Navarro, pela amizade e competência com que realizam seus trabalhos.

À Ivone Pereira, pelo bom humor e carinho.

À Denize Yamamoto e Adriana Matsukuma, pelo apoio técnico durante a realização dos experimentos de microarranjo e microscopia confocal.

À Dra. Edlaine Linares e Prof. Dra Ohara Augusto, pela colaboração e pela ajuda na discussão de alguns resultados.

Aos órgãos de financiamento à pesquisa FAPESP e CNPq, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, José Célio e Elza Gomes.

À minha esposa, Lisvane Paes.

## Resumo

Vieira, A.L.G. Expressão gênica diferencial durante a esporulação de *Blastocladiella emersonii* e estudo da sinalização por GMP cíclico. 2009. 160 pg. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Neste trabalho realizamos a análise das variações na expressão gênica global durante a fase de esporulação do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* utilizando a tecnologia dos microarranjos de cDNA em lâminas contendo 3.773 genes distintos. Ao todo 615 genes foram classificados como induzidos enquanto 645 foram classificados como reprimidos ao longo da esporulação. As categorias funcionais mais representadas entre os genes induzidos foram: microtúbulo e citoesqueleto, transmissão de sinal, atividade de ligação ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , proteólise (apenas no início da esporulação) e biogênese e organização do cromossomo (apenas no final da esporulação). Dentre os genes reprimidos, as categorias funcionais mais representadas foram: biossíntese de proteína, transporte de carboidratos e metabolismo energético. A comparação dos dados de expressão gênica da esporulação com aqueles obtidos recentemente em nosso laboratório para a germinação mostrou um grande número de genes regulados inversamente ao longo das duas fases de diferenciação do ciclo de vida de *B. emersonii*. Muitos genes induzidos na esporulação são reprimidos na germinação e vice versa. Analisamos também o efeito de glicose e triptofano sobre a expressão gênica durante a formação dos zoósporos, tendo em vista que tais nutrientes são capazes de inibir a esporulação de *B. emersonii*. Nossos resultados mostraram que na presença de glicose (1%) genes envolvidos na composição e atividade do citoesqueleto foram superexpressos, enquanto na presença do aminoácido triptofano houve um aumento na expressão de genes envolvidos no processo de enovelamento de proteínas e proteólise, e na resposta ao estresse oxidativo. Além disso, genes envolvidos no processo de esporulação propriamente dito foram reprimidos durante o tratamento com triptofano. Investigamos também a via de sinalização por GMP cíclico (cGMP), cujos níveis aumentam consideravelmente durante a esporulação de *B. emersonii*. Iniciamos o estudo com uma busca no banco de ESTs de *B. emersonii* (<http://blasto.iq.usp.br>) por seqüências que codificassem enzimas envolvidas na síntese e degradação de cGMP. Foram encontradas três ESTs que codificam domínios catalíticos que parecem pertencer a três diferentes guanilato ciclases e uma EST codificando uma fosfodiesterase com alta similaridade com fosfodiesterases que possuem alta afinidade por cGMP. Experimentos de microarranjos de cDNA validados por RT-PCR quantitativo em tempo real mostraram que os quatro transcritos são expressos durante esporulação, com picos de indução durante a fase tardia da esporulação, momento em que ocorre a biogênese dos zoósporos. Além disso, dados obtidos a partir de experimentos *in vivo* e *in vitro* utilizando inibidores das enzimas guanilato ciclase e óxido nítrico sintase, sugeriram a participação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e do radical livre óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) na atividade de guanilato ciclase, em uma via do tipo  $\text{Ca}^{2+}$ - $\cdot\text{NO}$ -cGMP.

Palavras-chave: fungo, esporulação, microarranjos de DNA, transmissão de sinal

## Abstract

Vieira, A.L.G. Differential gene expression during *Blastocladiella emersonii* sporulation and analysis of the cyclic GMP signaling pathway. 2009. 160 pg. PhD Thesis – Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In the present work, we analyzed global gene expression changes during the sporulation phase of the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* using cDNA microarray technology with chips containing 3773 distinct genes. A total of 615 genes were up-regulated and 645 were down-regulated along the sporulation of the fungus. The over-represented functional categories among the induced genes were: microtubule and cytoskeleton, signal transduction, Ca<sup>2+</sup> binding activity, proteolysis (only at the beginning of sporulation), and chromosome biogenesis and organization (only at the end of sporulation). Among the down-regulated genes, the over-represented functional categories were: protein biosynthesis, carbohydrate transport, and energetic metabolism. Sporulation gene expression data were compared with those obtained recently in our laboratory for the germination phase, showing that a great number of genes are inversely regulated along the two differentiation stages of *B. emersonii* life cycle. We also analyzed the effects of glucose and tryptophan on gene expression during biogenesis of the zoospores, as such nutrients are able to inhibit *B. emersonii* sporulation. Our results showed that in the presence of glucose (1%) genes related to activity and composition of cytoskeleton were over-expressed, while in the presence of tryptophan genes involved in protein folding, proteolysis and oxidative stress were induced. In addition, genes involved in the sporulation process per se were down-regulated by tryptophan treatment. We also investigated the cyclic GMP signaling pathway, as the levels of this cyclic nucleotide increase considerably during *B. emersonii* sporulation. Firstly, we searched for sequences encoding enzymes involved in cGMP synthesis and degradation using the *B. emersonii* EST databank (<http://blasto.iq.usp.br>). Three sequences were found encoding distinct guanylate cyclase catalytic domains, and one showed high similarity with phosphodiesterases that exhibit high affinity for cGMP. Microarray experiments, validated by real time quantitative RT-PCR, showed that the four transcripts are induced during sporulation, reaching maximum levels at the late stages of sporulation, when zoospore biogenesis occurs. In addition, data obtained from *in vivo* and *in vitro* experiments using inhibitors for the enzymes guanylate cyclase and nitric oxide synthase indicated the involvement of the ion Ca<sup>2+</sup> and the free radical nitric oxide (\*NO) in guanylate cyclase activity, suggesting the existence of a Ca<sup>2+</sup>-\*NO-cGMP signaling pathway.

Keywords: fungus, sporulation, DNA microarray, signal transduction

## Lista de abreviaturas e siglas

AC – Adenilato ciclase  
ATP – Adenosina trifosfato  
BSA – Albumina acetilada de soro bovino  
Ca<sup>2+</sup> - Cálcio  
CaM – Calmodulina  
cAMP – Adenosina monofosfato cíclico  
cDNA – DNA complementar  
cGMP – Guanosina monofosfato cíclico  
DAF-2 DA – Diaminofluoroceína diacetato  
DEPC – Dietilpirocarbonato  
DM4 – Meio definido  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DO – Densidade ótica  
E – Esporulação  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
EGTA – Ácido etilenoglicol-bis-aminoetiletertetracético  
EST – Expressed sequence tag  
G – Germinação  
g – Unidades de gravidade  
GC – Guanilato ciclase  
GO – Gene Ontology  
GTP – Guanosina trifosfato  
IBMX – Isobutylmethylxanthine  
ID – Identidade  
kDa – Kilodaltons  
L-NAME – N-Nitro-L-Arginine Methyl Ester  
M – Molar  
MOPS – Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico  
µg – Micrograma  
µl – Microlitro  
µm – Micrômetro

nm – Nanômetro  
nM – Nanomolar  
•NO – Óxido nítrico  
NOS – Óxido nítrico sintase  
ODQ – 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one  
Pb – Pares de base  
PDE – Fosfodiesterase  
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfona  
PYG – Peptona – extrato de levedura - glicose  
rpm – Rotações por minuto  
RT-PCR – Reação de polimerização em cadeia em tempo real  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SE – Solução de esporulação  
TBE – Tampão Tris-Borato EDTA  
TBS – Tampão tris-borato SDS  
TCA – Ácido tricloroacético  
Tris – Tris-(hidroxometil)-aminometano

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. O modelo de estudo: <i>Blastocladiella emersonii</i> .....	1
1.2. Regulação da expressão gênica diferencial em <i>Blastocladiella emersonii</i> .....	4
1.3. Particularidades da esporulação de <i>Blastocladiella emersonii</i> .....	10
1.4. Ciclases, fosfodiesterases e nucleotídeos cíclicos.....	13
1.5. Óxido nítrico.....	18
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo geral.....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>23</b>
3.1. Meios de cultura.....	23
3.2. Cultivo de células de <i>B. emersonii</i> .....	23
3.3. Extração de RNA total de células de <i>B. emersonii</i> .....	24
3.4. Síntese dos cDNAs e marcação com fluoróforos para hibridização nos microarranjos.....	25
3.5. Hibridização e leitura das lâminas de microarranjos.....	27
3.6. Extração e normalização dos dados de microarranjos.....	29
3.7. Determinação dos genes diferencialmente expressos.....	31
3.8. Agrupamento, dos genes diferencialmente expressos, pelo perfil transcricional.....	33
3.9. Determinação das categorias funcionais altamente representadas.....	34
3.10. RT-PCR quantitativo em tempo real.....	35
3.11. Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e Northern blot.....	37
3.12. Preparação de sonda radioativa.....	38
3.13. Extração de DNA de <i>B. emersonii</i> .....	38
3.14. Determinação da seqüência nucleotídica dos genes de guanilato ciclase por extensão de DNA genômico.....	40
3.15. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação.....	43
3.16. Transformação de <i>E. coli</i> .....	43
3.17. Seqüenciamento de DNA.....	44
3.18. Preparação de extrato bruto de células de <i>B. emersonii</i> para quantificação de compostos derivados do óxido nítrico.....	44
3.19. Quantificação, por quimioluminescência, de compostos derivados do $\bullet$ NO (nitrito, nitrato, S-nitrosotióis, nitrosaminas e nitrosoheme).....	45

3.20. Microscopia confocal de varredura a laser.....	46
3.21. Ensaio de GMP cíclico.....	47
3.22. Ensaio de atividade óxido nítrico sintase.....	48
3.23. Microscopia de imunofluorescência confocal.....	48
<b>4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>50</b>
4.1. Perfil de expressão dos genes diferencialmente expressos ao longo da esporulação de <i>B. emersonii</i> .....	52
4.2. Validação dos perfis de expressão por RT-PCR quantitativo.....	55
4.3. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos.....	56
4.3.1. Genes envolvidos na biossíntese de proteína.....	56
4.3.2. Metabolismo central do carbono.....	57
4.3.3. Degradação de proteína.....	60
4.3.4. Enovelamento de proteína e resposta a estresse.....	61
4.3.5. Microtúbulo e citoesqueleto.....	62
4.3.6. Transdução de sinal.....	63
4.3.7. Outros genes.....	65
4.3.8. Análise comparativa do perfil transcricional dos genes diferencialmente expressos na esporulação e na germinação de <i>B. emersonii</i> .....	67
4.4. Efeito de nutrientes sobre a expressão gênica durante a esporulação de <i>Blastocladiella emersonii</i> .....	84
4.4.1. Efeito da glicose.....	84
4.4.2. Efeito do triptofano.....	90
4.5. Estudo da via de sinalização por cGMP durante a esporulação de <i>B. emersonii</i> .....	97
4.5.1. Identificação e análise de seqüências de guanilato ciclase e fosfodiesterase de cGMP.....	97
4.5.2. A produção de cGMP em <i>B. emersonii</i> é dependente de óxido nítrico.....	110
4.5.3. Produção de <sup>•</sup> NO durante a esporulação de <i>B. emersonii</i> .....	114
<b>5. Conclusões.....</b>	<b>123</b>
<b>6. Referências bibliográficas.....</b>	<b>127</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>140</b>

## 1. Introdução

### 1.1. O modelo de estudo: *Blastocladiella emersonii*

Isolado em 1951 por Cantino, *Blastocladiella emersonii* é um fungo aquático não filamentosos pertencente à classe dos Quitridiomycetes, ordem Blastocladales (Powell, 1993), cujo ciclo de vida sofre drásticas mudanças morfológicas e bioquímicas durante os dois estágios de diferenciação celular: a germinação e a esporulação. Ao longo do desenvolvimento do fungo, é possível acompanhar quatro morfologias celulares que se alternam de maneira cíclica (zoósporo, gérmen, célula vegetativa e zoosporângio), tornando-o um modelo bastante interessante no tocante ao estudo da expressão gênica diferencial em diferentes tipos celulares.

O ciclo de vida inicia-se com o zoósporo, uma célula uninucleada, móvel e sem parede celular que germina rapidamente quando exposta na presença de meio nutriente ou solução inorgânica contendo certos cátions monovalentes ( $K^+$  e  $Na^{2+}$ ), AMP cíclico (cAMP), GMPcíclico (cGMP) ou inibidores da fosfodiesterase de cAMP (Gomes *et al.*, 1980; Gottschalk and Sonneborn, 1982; Soll and Sonneborn, 1972). Durante os primeiros 15 minutos de germinação em meio nutriente (DM4) a 27°C, o zoósporo retrai o seu flagelo e forma uma fina parede celular de quitina, transformando-se em uma célula denominada esferócito. Aproximadamente 45 minutos após a indução da germinação, um tubo germinal (rizóide primário) se desenvolve dando origem ao gérmen que é capaz de crescer. O tubo germinal dará origem por ramificação a um sistema de rizóides através dos quais os nutrientes são absorvidos (Lovett, 1975). Aos 120 minutos ocorre a primeira divisão nuclear, marcando o fim da germinação e o início do crescimento vegetativo, período caracterizado por intensas divisões nucleares que não são acompanhadas por divisão celular, produzindo um cenócito.

A carência de nutrientes durante o crescimento vegetativo induz o processo de esporulação. Durante essa fase do desenvolvimento, cada cenócito vegetativo pode diferenciar-se em um de dois fenótipos dependendo das condições de crescimento. Em condições adversas, uma célula de parede espessa e pigmentada, denominada esporângio de resistência, é formada, podendo levar vários dias para amadurecer. Por outro lado, em condições normais de crescimento, produz-se uma célula de parede delgada e não pigmentada, capaz de amadurecer em poucas horas, denominada zoosporângio. Aproximadamente 60 minutos após a indução da esporulação, que em laboratório se dá por meio da lavagem e incubação das células vegetativas em uma solução tamponada contendo  $\text{Ca}^{2+}$ , observa-se o surgimento de um septo basal que separa os rizóides do citoplasma. Uma hora após a formação do septo ocorre a formação de uma papila de descarga no ápice do zoosporângio através da qual os zoósporos são liberados. Em uma fase mais tardia da esporulação, observa-se a clivagem do citoplasma em torno de cada núcleo culminando com a formação dos zoósporos que são liberados no final do processo, completando assim o ciclo de vida do fungo (Figura 1).

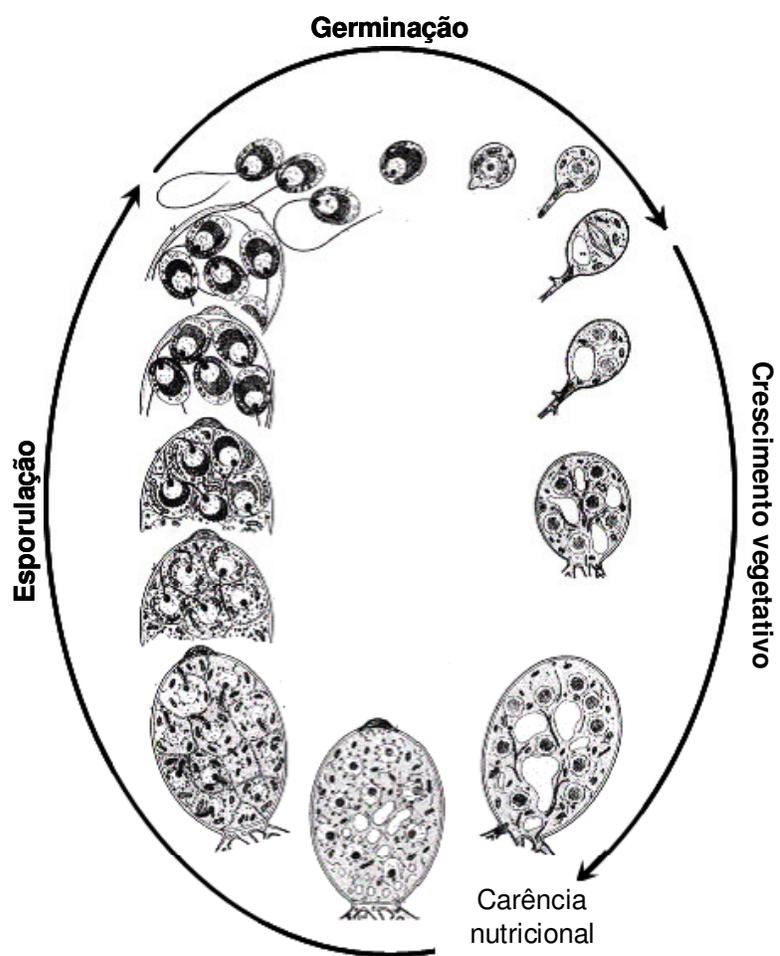


Figura 1: Ciclo de vida do fungo *Blastocladiella emersonii* (Adaptado de Lovett, 1975).

## 1.2. Regulação da expressão gênica diferencial em *Blastocladiella emersonii*

Em função das diversas mudanças bioquímicas e morfológicas que ocorrem ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*, bem como da facilidade de se obter grandes quantidades de culturas com alta sincronia, este fungo torna-se um interessante modelo de estudo de expressão gênica entre os fungos primitivos.

Diversas estratégias de análise da expressão gênica têm sido utilizadas ao longo dos anos para abordar o assunto em *B. emersonii*, tais como eletroforeses bidimensionais, sequenciamento de ESTs (Expressed Sequence Tags) e microarranjos de cDNA (da Silva and Juliani, 1988; Georg and Gomes, 2007; Ribichich *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 1987). Esses estudos têm mostrado que *B. emersonii* possui mecanismos de regulação da expressão gênica acurados, envolvendo controles transcricionais, traducionais e pós-traducionais.

Dentre as duas fases de diferenciação celular do ciclo de vida do fungo (germinação e esporulação), a germinação tem sido estudada com maiores detalhes. A maior parte das mudanças estruturais que ocorrem no início da germinação parecem não requerer a síntese de proteínas nem mesmo a transcrição de RNA (Lovett, 1968; Silva *et al.*, 1987; Soll and Sonneborn, 1971a, b). Durante a fase precoce da germinação, a síntese de proteínas parece dever-se, em sua maior parte, a mRNAs previamente sintetizados durante a esporulação e armazenados no zoósporo (Silva *et al.*, 1987). Em uma etapa mais tardia, a maioria das proteínas é traduzida a partir de novos mRNAs. As evidências também sugerem a existência de uma população de mRNAs preferencialmente traduzidos (Jaworski and Stumhofer, 1981). A ocorrência de um controle pós-traducional também se verifica pela degradação de proteínas específicas (Silva *et al.*, 1987; Jaworsky & Stunhofer, 1984).

A indução da fase de esporulação também gera uma mudança drástica no programa de expressão gênica, envolvendo alterações nas espécies de mRNAs traduzíveis bem como na síntese de proteínas. De fato, durante essa fase do desenvolvimento ocorre uma intensa degradação de proteínas e RNAs, seguida pela síntese concomitante de novas moléculas protéicas e RNAs (Murphy and Lovett, 1966).

O estudo da síntese de proteínas durante a esporulação de *B. emersonii* utilizando marcação radioativa ( $[^{35}\text{S}]$ -metionina) e eletroforese bidimensional revelou que a taxa relativa de síntese de várias proteínas diminui durante a esporulação inicial enquanto a síntese de outras proteínas aumenta. O estudo mostrou também a existência de proteínas que estão presentes ao longo de todo o processo de esporulação, e que provavelmente são indispensáveis à manutenção celular. Outras proteínas tiveram sua expressão aumentada apenas entre os 60-90 minutos da esporulação, coincidindo com a formação do septo, enquanto outras apresentaram aumento na taxa de expressão aos 120 minutos, coincidindo com a formação da papila. Mudanças mais dramáticas no padrão de síntese protéica ocorreram entre 120-150 minutos de esporulação, momento em que ocorrem modificações profundas associadas com a diferenciação dos zoósporos (da Silva *et al.*, 1986).

Embora a degradação protéica seja especialmente alta durante esse período (Lodi and Sonneborn, 1974), a regulação da expressão gênica durante a esporulação parece ocorrer principalmente em nível transcricional (da Silva *et al.*, 1986). Os mRNAs transcritos durante a esporulação precoce são preferencialmente degradados, em contraste com aqueles sintetizados durante a esporulação tardia, que são conservados no zoósporo (Jaworski and Thomson, 1980). De fato, a taxa de acúmulo de RNA total cai drasticamente após a indução da esporulação, mas ocorre a síntese de

RNAs novos, que provavelmente são necessários aos eventos subseqüentes (Murphy and Lovett, 1966).

Até bem recentemente, o conhecimento sobre os genes expressos em *B. emersonii* limitava-se aos genes dos RNAs ribossômicos e a oito seqüências codificadoras de proteínas (de Oliveira *et al.*, 1994; de Souza and Gomes, 1998; Fietto *et al.*, 2002; Marques Mdo and Gomes, 1992; Rocha and Gomes, 1999; Simao and Gomes, 2001; Stefani and Gomes, 1995; Van der Auwera and De Wachter, 1996).

Com o objetivo de contribuir com o entendimento da complexidade do genoma de *B. emersonii*, procedeu-se o sequenciamento de um grande número de clones de cDNA (*Expressed Sequence Tags* ou *ESTs*) obtidos a partir de mRNAs de vários estágios do desenvolvimento do fungo e em diferentes condições de estresse (Georg and Gomes, 2007; Ribichich *et al.*, 2005).

Aproximadamente 20.000 clones de cDNA provenientes de 10 diferentes bibliotecas foram parcialmente seqüenciados a partir de suas extremidades 5', produzindo 16.984 ESTs de alta qualidade. Essas seqüências foram reunidas em 4.873 transcritos putativos, dos quais 48% não apresentaram similaridade com seqüências depositadas em bases públicas de dados. Outras 1.680 ESTs (35%) foram classificadas em pelo menos um dos três termos do projeto de anotação Gene Ontology (GO): processo biológico, função molecular e componente celular, cujos processos mais relevantes foram: transcrição e processamento de RNA, biossíntese de proteína e transporte (Ribichich *et al.*, 2005). A comparação da diversidade de ESTs seqüenciadas nas bibliotecas dos dois estágios de diferenciação indicou que células em esporulação expressam uma diversidade maior de ESTs do que as células em germinação.

A análise também permitiu o agrupamento dos ESTs de acordo com seus perfis de expressão ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*. Contigs relacionados com

proteólise ou peptidólise bem como dobramento de proteínas foram mais abundantes no início da esporulação ao passo que transcritos relacionados com a estrutura do cromossomo apresentaram níveis mais elevados em zoósporos (Ribichich *et al.*, 2005).

A resposta transcricional de *B. emersonii* sob condições de estresses ambientais foi investigada através do sequenciamento de um grande número de ESTs provenientes de três bibliotecas construídas com mRNAs de células expostas a choque térmico e diferentes concentrações de cloreto de cádmio. Ao todo 6.350 ESTs de alta qualidade foram obtidos e agrupados em 2.326 unigenes putativos, sendo que 51% deles ainda não haviam sido descritos em *B. emersonii*. Aproximadamente 59% dos unigenes apresentaram similaridade com seqüências já conhecidas em outros organismos, ao passo que 41% dos ESTs permaneceram sem uma identificação putativa (Georg and Gomes, 2007). Um total de 3.773 ESTs distintas provenientes das bibliotecas de estresse (804 ESTs) e do ciclo de vida (2.969 ESTs) foram utilizados para a confecção de lâminas de microarranjos de cDNA, sobre as quais foram depositadas (pelo menos em duplicata). A classificação, segundo o consórcio Gene Ontology, das 3.773 ESTs presentes nas lâminas de microarranjo de *B. emersonii* é mostrada na figura 2 em termos de percentagem de genes anotados em cada processo biológico.

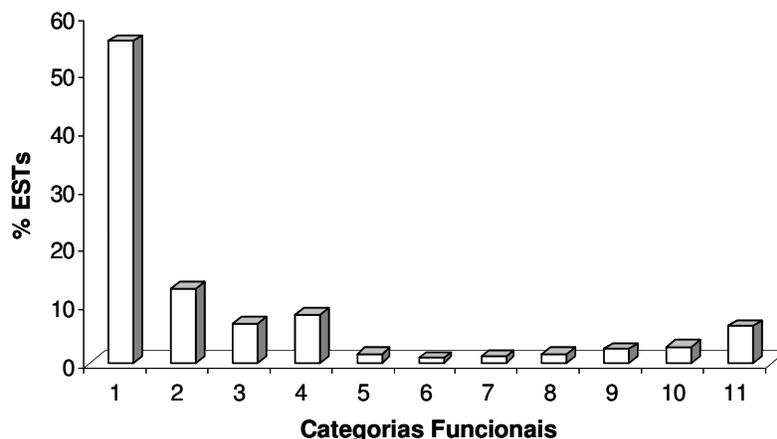


Figura 2: Porcentagem de genes anotados em cada processo biológico para os 3.773 genes presentes nas lâminas de microarranjos de cDNA de *B. emersonii*. As 11 categorias funcionais são (1) *no match* (55,6%), (2) *protein metabolism* (12,9%), (3) *nucleic acid metabolism* (6,8%), (4) *metabolism* (8,3%), (5) *biological process* (1,6%), (6) *development* (0,8%), (7) *response to stimulus* (1,1%), (8) *cell proliferation* (1,5%), (9) *cell communication* (2,3%), (10) *cell organization and biogenesis* (2,8%) e (11) *transport* (6,3%), respectivamente.

Um grande número de genes de *B. emersonii* foi induzido pelo menos duas vezes em resposta a ambos os estresses (122 genes durante o choque térmico e 189 na presença de cádmio), alguns dos quais foram induzidos em ambas as condições enquanto outros tiveram sua expressão aumentada somente no estágio de germinação ou esporulação. Estes dados sugerem que a resposta ao estresse, em nível de expressão gênica, é controlada nas diferentes fases do desenvolvimento do fungo de forma independente (Georg and Gomes, 2007). As principais categorias funcionais representadas entre os genes induzidos foram: enovelamento de proteína e proteólise, proteínas com propriedades antioxidantes e transporte celular. Na resposta ao estresse por cádmio, genes codificando seis glutathione-S-transferases e seis metacaspases, bem como genes codificando várias proteínas envolvidas no metabolismo de aminoácidos sulfurosos, foram induzidos, provavelmente para proteger a célula do estresse oxidativo, que pode ser gerado em função da exposição a cádmio (Georg and Gomes, 2007).

A análise do transcriptoma de *B. emersonii* também foi realizada durante a germinação induzida em diferentes condições ambientais (Salem-Izacc *et al.*, 2009). Ao longo da germinação induzida em meio nutriente, mais de 500 genes tiveram sua expressão aumentada em pelo menos um dos pontos analisados. A maioria deles está envolvida com o crescimento celular, incluindo transcritos relacionados com a biossíntese de proteínas, transcrição, metabolismo energético, transporte de carboidratos e oligopeptídeos, e controle do ciclo celular (Salem-Izacc *et al.*, 2009). Os autores também observaram que vários transcritos estocados nos zoósporos tiveram sua expressão diminuída ao longo da germinação em meio nutriente, tais como aqueles envolvidos na transdução de sinal, transporte de aminoácidos e organização do cromossomo.

Os dados de expressão transcricional obtidos na germinação induzida em meio nutriente foram comparados com aqueles obtidos na germinação induzida por adenina ou potássio. Vários genes envolvidos com o crescimento celular, induzidos durante a germinação em meio nutriente, não apresentaram aumento na expressão ao longo da germinação induzida por solução inorgânica, sugerindo que os nutrientes exercem um controle positivo sobre a transcrição gênica, ao passo que a maioria dos transcritos relacionados com transdução de sinal apresentou o mesmo padrão de expressão independentemente do estímulo inicial dado para a germinação dos zoósporos (Salem-Izacc *et al.*, 2009).

### 1.3. Particularidades da 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. Os zoósporos são células altamente diferenciadas e, portanto, as transformações que se produzem durante o processo de esporulação são numerosas e implicam na necessidade de materiais novos (fenótipos): flagelo, fusão mitocondrial, formação do capacete nuclear onde ficam armazenados os ribossomos, partículas gamma (estruturas onde ficam armazenadas enzimas envolvidas com a síntese da parede celular de quitina), microtúbulos e vesículas que determinam os planos de divisão celular.

A complexidade do processo de diferenciação celular durante esta fase do desenvolvimento do fungo é acompanhada pelo aparecimento de um grande número de atividades enzimáticas tais como: proteases (Correa *et al.*, 1979), esterase (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 (de Oliveira *et al.*, 1994; Juliani *et al.*, 1979; Marques Mdo *et al.*, 1992; Marques Mdo and Gomes, 1992).

Coutinho & Corrêa (1999) mostraram que a indução da esporulação em *B. emersonii* é dependente de cálcio extracelular. De acordo com os autores, reservas intracelulares de  $Ca^{2+}$ , acumuladas durante o crescimento, não são mobilizadas ou são insuficientes para induzir e/ou manter os eventos de indução do processo de esporulação. Uma pequena exposição inicial ao  $Ca^{+2}$  (10 minutos) é suficiente para que as células respondam e esporulem, sugerindo a existência de eventos dependentes desse íon durante a indução da esporulação bem como o envolvimento de funções do tipo

calmodulina (Coutinho and Correa, 1999). O  $\text{Ca}^{2+}$  age como segundo mensageiro em uma série de vias de sinalização e é essencial para o crescimento e desenvolvimento de organismos eucarióticos bem como microrganismos, no entanto, seu mecanismo de ação ainda não é completamente entendido em *B. emersonii* (Coutinho and Correa, 1999).

Simão & Gomes (2001) isolaram e caracterizaram o gene que codifica a proteína calmodulina em *B. emersonii*. Análises por Northern blot mostraram que os níveis do mRNA de calmodulina são regulados ao longo do desenvolvimento de *B. emersonii*, permanecendo baixo nas células vegetativas e aumentando durante a esporulação (Simao and Gomes, 2001). Com a obtenção de anticorpos policlonais foi possível mostrar que os níveis da proteína calmodulina (CaM) seguem o mesmo padrão do seu mRNA (Simao and Gomes, 2001). Através do uso de inibidores específicos foi possível concluir que o  $\text{Ca}^{2+}$  externo é necessário somente durante a esporulação de *B. emersonii*, enquanto CaM e a quinase dependente de calmodulina CaMKII são essenciais para o crescimento e a esporulação do fungo (Simao and Gomes, 2001).

Em 1986, Correa & Lodi mostraram que a presença de diferentes moléculas nutrientes na solução de esporulação é capaz de retardar ou mesmo inibir a diferenciação dos zoósporos. Em qualquer momento antes da formação do septo basal, as células retornam ao crescimento vegetativo quando incubadas na presença de casaminoácidos (2%). No entanto, após a formação do septo, as células não mais retornam ao crescimento. Certos aminoácidos presentes no meio definido (DM4) tanto impedem (tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina e treonina) quanto atrasam a formação do septo (valina, serina, arginina e metionina) quando adicionados à cultura juntamente com a solução de esporulação. Já os açúcares, não impedem a formação do septo, embora eles possam interromper eventos tardios da esporulação. Glicosamina e

acetilglicosamina podem impedir a formação da papila de descarga ao passo que a presença de glicose pode bloquear completamente a formação dos zoósporos. Glutamina, adenosina e guanosina também causam grandes atrasos na formação do septo. Esses dados corroboram a hipótese de que a carência de aminoácidos é um dos requisitos mais importantes no que diz respeito à indução da esporulação (Correa and Lodi, 1986).

Em 1975, resultados publicados por Silverman & Epstein sugeriram que GMP cíclico (cGMP) possui 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. Segundo os autores, os níveis de cGMP não aumentam imediatamente após a indução da esporulação, que se dá por meio da carência nutricional à qual as células em crescimento vegetativo são submetidas. Em um período de aproximadamente 60 minutos após a indução da esporulação, nenhum aumento significativo nos níveis de cGMP pôde ser detectado, o que se caracteriza um fenômeno incomum haja vista que, de uma maneira geral, os níveis de cGMP respondem imediatamente após um estímulo externo (Goldberg *et al.*, 1983). Esses dados sugeriram que o aumento nos níveis de cGMP durante a esporulação de *B. emersonii* requer mudanças celulares prévias (Silverman and Epstein, 1975). De fato, a síntese de cGMP durante a esporulação requer a síntese *de novo* de RNAs e proteínas, uma vez que tanto cicloheximida ou actinomicina D bloquearam o aumento dos níveis de cGMP quando adicionados no início desta fase. Embora o bloqueio observado possa ter sido um efeito indireto dessas drogas, as quais nesses e em outros experimentos bloqueiam uma variedade de eventos relacionados com a esporulação (Murphy and Lovett, 1966), as mesmas não provocaram alterações significativas nos níveis de cAMP,

permitindo aos autores sugerirem que as células vegetativas não possuem o componente necessário para a síntese de cGMP, o qual deve ser sintetizado *de novo* durante a esporulação (Silverman and Epstein, 1975).

#### **1.4. Ciclases, fosfodiesterases e nucleotídeos cíclicos**

AMP e GMP cíclicos são reguladores intracelulares de várias funções biológicas. Esses mensageiros são sintetizados por enzimas denominadas ciclases, as quais apresentam grande especificidade por seus substratos, ATP ou GTP. O cAMP é sintetizado pela adenilato ciclase a partir do ATP, e o cGMP é produzido pela guanilato ciclase a partir do GTP. Em procariotos, cAMP está envolvido na regulação da expressão gênica. Embora seja encontrado em bactérias e cianobactéria, o papel do cGMP nesses microrganismos ainda não está bem compreendido (Ochoa *et al.*, 2000).

Em eucariotos, cAMP e cGMP regulam atividades enzimáticas, atividade de canais iônicos e expressão gênica, principalmente via proteínas quinases dependentes de cAMP ou cGMP (Lohman *et al.*, 1997; Houslay *et al.*, 1997). AMP cíclico está envolvido também na diferenciação de muitas espécies de fungos (Gomes *et al.*, 1980a e b; Matsuo *et al.*, 2008; Santangelo, 2006; García-Pedrajas *et al.*, 2008). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a via de sinalização do cAMP tem um papel essencial em processos de detecção de nutrientes, crescimento, metabolismo, resistência a estresse e mudanças na morfologia celular (Kubler *et al.*, 1997; Matsumoto *et al.*, 1982).

Em dictiostelídeos, cAMP e cGMP estão envolvidos com o fenômeno de agregação celular para formar uma estrutura multicelular em resposta à carência nutricional. Durante esse processo, o cAMP extracelular é essencial para atrair as células, mantendo-as juntas. O cAMP é responsável também pelo aumento nos níveis

citosólicos de cGMP, o qual também parece agir como regulador da resposta à quimiotaxia (Bosgraaf *et al.*, 2002; Kuwayama *et al.*, 1993; Ross *et al.*, 1991).

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).

Existem várias famílias de adenilato e guanilato ciclases. Em mamíferos, o cerne da adenilato ciclase é formado por dois domínios ciclases associados de maneira antiparalela. Em metazoários, quatro subgrupos de ciclases foram descritos: (i) uma adenilato ciclase contendo 12 regiões transmembranares e dois domínios ciclases diferentes, a qual é regulada por proteínas G; (ii) uma guanilato ciclase com uma única região transmembranar e um único domínio ciclase, a qual funciona como um homodímero e cuja atividade é estimulada por peptídeos extracelulares; (iii) uma guanilato ciclase solúvel sensível a óxido nítrico, a qual funciona como um heterodímero, cada qual com um domínio catalítico; (iv) e uma adenilato ciclase solúvel descrita em ratos e humanos, a qual possui dois domínios ciclase com alto grau de identidade com adenilato ciclases bacterianas (Buck *et al.*, 1999).

Em mamíferos, existem duas guanilato ciclases (GC) topologicamente distintas: a GC receptora, a qual apresenta uma única região transmembranar; e a GC solúvel. Nenhuma delas é ativada por proteínas G. A enzima receptora possui 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). A maioria das GC receptoras forma dímeros ainda no estado inativo por meio da interação de seus domínios coiled-coil (CC) e KHD (um domínio homólogo de proteína quinase). A interação do domínio extracelular com o ligante

causa uma mudança conformacional que reorienta o domínio intracelular KHD, permitindo sua interação com ATP, a qual por sua vez induz uma segunda mudança conformacional que resulta na ativação do domínio ciclase (Potter and Hunter, 2001).

As guanilato ciclases retiniais (RetGCs) reguladas por  $\text{Ca}^{2+}$  não são ativadas por ligantes; ao invés disso, sua dimerização, e conseqüente ativação, depende da interação com uma proteína ativadora de guanilato ciclase (GCAP), a qual dimeriza na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  (Subbaraya *et al.*, 2003).

As guanilato ciclases solúveis (SolGCs) formam heterodímeros de duas isoformas,  $\alpha$  e  $\beta$ , cada qual com um domínio ciclase na região C-terminal, e uma região N-terminal que coordena um único grupo heme por dímero (Friebe and Koesling, 2003; Koesling *et al.*, 1990). SolGCs podem ser ativadas em aproximadamente 200 vezes através da interação do  $\text{Fe}^{2+}$  (grupo heme) com óxido nítrico ( $\bullet\text{NO}$ ) (Arnold *et al.*, 1977; Zhao *et al.*, 1999). Essa ativação pode ser bloqueada por um inibidor específico, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), o qual compete com o  $\bullet\text{NO}$  e oxida o  $\text{Fe}^{2+}$  (Garthwaite *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2000).

Guanilato ciclases receptoras foram descritas também em invertebrados de diferentes filos, tais como, equinodermata (Singh *et al.*, 1988), nematoda (*C. elegans*) (Yu *et al.*, 1997) e em *Drosophila* (Morton, 2004). Uma RetGC inibida por  $\text{Ca}^{2+}$  foi identificada no artrópode *Manduca sexta* (Morton and Nighorn, 2003). SolGCs estimuladas por  $\bullet\text{NO}$  também estão conservadas em artrópodes (Shah and Hyde, 1995; Zayas *et al.*, 2000). No entanto, todas as SolGCs encontradas em *M. sexta* e *C. elegans*, não possuem os dois resíduos de cisteína essenciais para a ligação do grupo heme, não sendo portanto, estimuladas por  $\bullet\text{NO}$ .

Em *Dictyostelium*, as enzimas adenilato e guanilato ciclases apresentam grandes similaridades com as ciclases de vertebrados. Duas GCs foram identificadas em

*Dictyostelium*, ambas sendo ativadas indiretamente por ácido fólico, um agente de quimiotaxia. O domínio catalítico da guanilato ciclase solúvel (sGC) de *Dictyostelium* apresenta elevada similaridade com aqueles de ACs de cianobactéria, além de ser evolutivamente muito próximo de um pequeno grupo de ACs (que possuem dois domínios catalíticos) que inclui ACs de mamíferos. Os aminoácidos presentes nos dois motivos de ligação a purina do domínio catalítico C2 da sGC de *Dictyostelium* também são atípicos. Análises de alinhamento dos resíduos catalíticos de diversas ciclases solúveis permitiram identificar os resíduos responsáveis pela interação com o substrato na enzima de *Dictyostelium*. Um resíduo de glutamina substitui um outro de glutamato, normalmente encontrado em sGC, e um resíduo de alanina substitui outro de cisteína, o qual é invariável em sGC de eucariotos superiores (Baker and Kelly, 2004).

Uma segunda GC de *Dictyostelium* (GCA) apresenta uma topologia similar àquela de ACs dependentes de proteína G, uma configuração também encontrada em GCs do parasita da malária *Plasmodium falciparum* e dos ciliados *Paramecium* e *Tetrahymena* (Linder *et al.*, 1999). Na alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii*, pelo menos 20 parálogos de GC foram encontrados no genoma, os quais são surpreendentemente similares àqueles de eucariotos superiores (Baker and Kelly, 2004).

Os níveis de nucleotídeos cíclicos nas células são estritamente regulados por meio de sua síntese, através das ciclases, e degradação, a qual se dá pelas fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos. Nove famílias de fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos foram caracterizadas de acordo com suas características cinéticas, especificidade por substrato (cAMP e ou cGMP), perfis de inibição, inibidores e ativadores alostéricos, seqüência de aminoácidos, e mudanças no padrão de expressão gênica em diferentes células e tecidos. Fosfodiesterases da família 1 são ativadas por  $Ca^{2+}$ -calmodulina e são capazes de hidrolisar tanto cAMP quanto cGMP. A família 2 é

composta por enzimas estimuladas por cGMP e também capazes de degradar ambos os nucleotídeos cíclicos. Fosfodiesterases da família 3 têm como substrato apenas o cAMP e são inibidas por cGMP. A família 4 tem como característica fosfodiesterases que apresentam especificidade por cAMP, ao passo que enzimas da família 5 ligam especificamente cGMP em um sítio não catalítico e o hidrolisa. Fosfodiesterases da família 6 são encontradas em células retiniais e são específicas para cGMP. A família 7 é composta por fosfodiesterases com baixo  $K_m$  e são específicas para cAMP. Em 1996, Shaulsky e colaboradores caracterizaram uma nova fosfodiesterase em *Dictyostelium discoideum*, denominada RegA, a qual apresenta alta especificidade para cGMP (Shaulsky *et al.*, 1996). Posteriormente, (Soderling *et al.*, 1998) descreveram uma fosfodiesterase em rato também com alta especificidade por cGMP, porém com menos de 50% de identidade na seqüência de aminoácidos do domínio catalítico quando comparado com membros das outras famílias, incluindo RegA (família 8).

Embora se conheça muito a respeito dos papéis do cAMP em várias espécies de fungos, até o presente momento não há trabalhos descrevendo a existência de genes de guanilato ciclase e fosfodiesterase de cGMP nesses microrganismos. Entretanto, a presença de cGMP e de uma atividade de guanilato ciclase foi descrita em *B. emersonii* na década dos anos 70 (Silverman and Epstein, 1975; Silverman, 1976) e uma busca recente no banco de ESTs do fungo (<http://blasto.iq.usp.br>) por genes envolvidos na síntese e degradação de cGMP revelou a existência de pelo menos três transcritos distintos codificando guanilato ciclases putativas e um codificando uma provável fosfodiesterase de cGMP, os quais serão objetos de estudo neste trabalho.

## 1.5. Óxido nítrico

O óxido nítrico é um radical livre inorgânico gasoso de fórmula  $\bullet\text{N}=\text{O}$  com múltiplas funções fisiológicas. Ele age como um mensageiro molecular em muitos processos de sinalização celular, através da via que envolve cGMP e também por meio de eventos de nitrosilação de grupos moduladores da atividade enzimática tais como, tióis e heme. O primeiro papel fisiológico atribuído ao  $\bullet\text{NO}$  foi aquele relacionado à vasodilatação (William *et al.*, 2006). Esse fenômeno fisiológico deve-se à capacidade do  $\bullet\text{NO}$  em aumentar os níveis intracelulares de cGMP no tecido muscular liso (William *et al.*, 2006). Além disso, em mamíferos, o  $\bullet\text{NO}$  está envolvido em diversos processos fisiológicos tais como, agregação plaquetária, relaxamento muscular e transmissão sináptica (Moncada and Higgs, 1991).

A síntese de  $\bullet\text{NO}$  bem como seu papel em eventos de diferenciação celular têm sido demonstrados também em microrganismos. No mixomiceto *Physarum polycephalum*, uma enzima óxido nítrico sintase (NOS), cuja atividade é independente de  $\text{Ca}^{2+}$ , é induzida durante a esporulação (Golderer *et al.*, 2001). Nesse microrganismo, o  $\bullet\text{NO}$  age como primeiro mensageiro na síntese de cGMP, o qual está envolvido na expressão do gene *lig1*, essencial para a esporulação do microrganismo em questão.

No fungo *Colletotrichum coccodes*, o  $\bullet\text{NO}$  foi detectado em conídios em germinação e em todos os estágios do desenvolvimento (Wang and Higgins, 2005). De fato, células tratadas com doadores de  $\bullet\text{NO}$  ( $\bullet\text{NO}$  exógeno) tiveram um atraso na germinação, enquanto o tratamento com inibidores da síntese de  $\bullet\text{NO}$  acelerou o processo de germinação, sugerindo que esse radical tem um efeito regulador sobre a germinação (Wang and Higgins, 2005). Além disso, Wang & Higgins (2005) obtiveram dados, a partir de ensaios com diferentes inibidores, que sugerem a existência de uma

isoforma de óxido nítrico sintase em *Colletotrichum coccodes* bioquimicamente similar à enzima NOS constitutiva de mamíferos.

Mais recentemente, (Gong *et al.*, 2007) mostraram que L-arginina é essencial para a formação dos conídios no fungo filamentosso *Coniothyrium minitans*. Células mutantes no gene que codifica a enzima carbamoil-fosfato sintase específica para L-arginina apresentaram deficiência na formação dos conídios e esse fenótipo pôde ser revertido incubando-se as células com L-arginina ou nitroprussiato de sódio, um doador de  $\bullet\text{NO}$ . Os autores mostraram também que a formação de conídios na cepa selvagem pode ser inibida por L-NAME, um inibidor da enzima NOS.

Em 2001, Maier e colaboradores mostraram que o  $\bullet\text{NO}$  está envolvido no desenvolvimento dos esporangióforos no zigomiceto *Phycomyces blakesleeanus* (Maier *et al.*, 2001). Nesse fungo, o desenvolvimento dos esporangióforos é controlado pela luz (azul), a qual reprime a produção de microsporangióforos e induz a formação de macrosporangióforos. Os autores mostraram que a luz induz a produção de  $\bullet\text{NO}$  em células em desenvolvimento, e que nitroprussiato de sódio (doador de  $\bullet\text{NO}$ ) é capaz de substituir o efeito da luz sobre o desenvolvimento dos macrosporangióforos.

A partir do extrato celular de *Saccharomyces cerevisiae* foi também possível purificar uma proteína de 60 kDa, a qual foi detectada por western blot usando anticorpo monoclonal anti-óxido nítrico sintase neuronal (Kanadia *et al.*, 1998). A atividade da NOS de levedura foi ensaiada na presença de calmodulina e L-arginina, e mostrou ser inibida por L-NAME, um inibidor de NOS. Em *Saccharomyces cerevisiae*,  $\bullet\text{NO}$  parece estar envolvido na sinalização que leva à apoptose (Almeida *et al.*, 2007). Os autores mostraram que, a produção de  $\bullet\text{NO}$  em células tratadas com  $\text{H}_2\text{O}_2$  é dependente de L-arginina intracelular e contribui para a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Durante a indução de apoptose por estresse oxidativo ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ),

gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), cujos níveis aumentam no extrato celular total, torna-se fragmentada e S-nitrosilada, o que provavelmente age como um sinal para apoptose. De fato, células velhas apresentam aumento nos níveis de  $\bullet\text{NO}$  e GAPDH S-nitrosilada, bem como uma correlação entre níveis intracelulares de ânio superóxido e produção de  $\bullet\text{NO}$ , sugerindo um papel fisiológico do  $\bullet\text{NO}$  na sinalização de apoptose em levedura (Almeida *et al.*, 2007).

As enzimas responsáveis pela síntese de  $\bullet\text{NO}$  a partir de L-arginina são conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). As primeiras descrições de NOS mostraram que tais enzimas requerem L-arginina,  $\text{O}_2$  e NADPH, e resultam na formação de L-citrulina. No entanto, a síntese de  $\bullet\text{NO}$  catalisada por NOS requer outros cofatores/coenzimas, tais como calmodulina e tetrahydrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ).

Em mamíferos, as  $\bullet\text{NO}$  sintases podem ser divididas em três classes de acordo com a célula ou tecido em que são expressas, bem como as diferenças na especificidade por co-fatores/inibidores.

A óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina e é expressa constitutivamente no cérebro, sendo também conhecida como NOS do tipo I. Também conhecida como NOS do tipo III, a óxido nítrico sintase endotelial é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina e também é expressa constitutivamente nas células do endotélio vascular, contudo, o gene que a codifica não é o mesmo que codifica a nNOS. Óxido nítrico sintases do tipo II foram identificadas originalmente em macrófagos e hepatócitos. Tais enzimas são ditas induzíveis (iNOS), uma vez que sua expressão é induzida por citocinas ou produtos de origem bacteriana. Além disso, a atividade da iNOS não é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  e/ou calmodulina (Knowles and Moncada, 1994).

Além de sua produção enzimática via NOS, o  $\bullet\text{NO}$  pode ser sintetizado a partir do nitrito por meio de sua redução enzimática, a qual pode ser catalisada pela enzima

nitrito redutase, ou mesmo não-enzimática, devido a condições celulares fortemente redutoras (Modolo *et al.*, 2005; Zweier *et al.*, 1995). Além disso, os níveis intracelulares de  $\bullet\text{NO}$  podem elevar-se por meio da denitrosilação do  $\bullet\text{NO}$  ligado a grupos aminas, tióis e heme de proteínas citoplasmáticas (Belenghi *et al.*, 2007). Em 2006, Chvanov e colaboradores descreveram um novo mecanismo celular para a rápida mobilização de  $\bullet\text{NO}$  a partir de S-nitrosotióis em células pancreáticas (Chvanov *et al.*, 2006). De acordo com os autores, o aumento da concentração citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  promove uma rápida elevação na concentração de  $\bullet\text{NO}$  em células pancreáticas, a partir da mobilização do  $\bullet\text{NO}$  ligado a grupos tióis de proteínas. Dessa maneira, a ligação reversível de  $\bullet\text{NO}$  em resíduos de cisteína, além de fornecer um mecanismo de modulação da atividade enzimática, permite que  $\bullet\text{NO}$  seja rapidamente mobilizado ao invés de sua síntese *de novo* pela NOS.

Embora haja evidências de que a enzima óxido nítrico sintase não esteja restrita a células animais, haja vista que NOS ou atividade do tipo NOS já foram descritas em diversos microrganismos tais como *Dictyostelium discoideum* (Tao *et al.*, 1997), *Physarum polycephalum* (Werner-Felmayer *et al.*, 1994), *Neurospora crassa* (Ninnemann and Maier, 1996) e *Saccharomyces cerevisiae* (Kanadia *et al.*, 1998), o papel do  $\bullet\text{NO}$  em microrganismos ainda é pouco conhecido, necessitando de estudos mais aprofundados.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo central do presente trabalho foi gerar dados de expressão gênica global durante a esporulação de *B. emersonii* utilizando microarranjos de cDNA a fim de avaliar o envolvimento dos genes diferencialmente expressos nessa fase do desenvolvimento com os eventos de diferenciação celular que levam à formação dos zoósporos.

### **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Analisar o efeito de nutrientes (glicose e triptofano) sobre a expressão gênica durante a esporulação, buscando correlacionar mudanças que ocorrerem em nível transcricional com o efeito inibidor da glicose e do triptofano sobre a formação dos zoósporos;

2.2.2. Investigar a via de sinalização que leva à produção de cGMP durante a esporulação de *B. emersonii*.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Meios de cultura**

As linhagens de *E. coli* utilizadas nesse trabalho foram crescidas a 37°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, foi adicionado ampicilina (100µg/mL). Os meios sólidos continham ágar 1,5%.

Para o crescimento diário de *B. emersonii* foi utilizado o meio PYG-ágar. Em experimentos que necessitaram de uma maior quantidade de células foi utilizado o meio PYG-P (peptona 0,125%; extrato de levedura 0,125%; glicose 0,15%; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,5 mM; pH 6,8).

Para o crescimento sincronizado das células de *B. emersonii* foi utilizado o meio definido DM4 (Maia and Camargo, 1974), composto por CaCl<sub>2</sub> 1mM; MgSO<sub>4</sub> 10 mM; FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,6 µg/mL; CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O 0,1 µg/mL; ZnSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0,2 µg/mL; MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O 0,2 µg/mL; glicose 0,33%; tiamina 0,04 µg/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 µg/mL; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 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<sup>+</sup> foi ajustada para 50 mM com KCl 1M.

#### **3.2. Cultivo de células de *B. emersonii***

Para a obtenção de culturas sincronizadas durante a fase de esporulação, 2 x 10<sup>5</sup> zoósporos, provenientes de crescimento em placas de meio complexo PYG 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. A contagem dos zoósporos foi feita em câmara de Neubauer após a fixação em solução de formaldeído 3,5% saturada com CaCO<sub>3</sub>. 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 contendo CaCl<sub>2</sub> 1mM) e ressuspensas em 500 mL da mesma solução a uma densidade de 3,2 x 10<sup>5</sup> 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 (0, 60, 120 e 150 minutos e zoósporos).

O progresso e a sincronia dos cultivos foram acompanhados tomando-se amostras de células e examinando-as ao microscópio ótico para a observação das transições fenotípicas descritas para a fase de esporulação: de célula vegetativa a célula septada (~60 minutos); de célula septada a célula papilada (~120 minutos); de célula papilada a zoosporângio clivado (~150 minutos); de zoosporângio clivado a esporângio vazio (~210 minutos) (Peralta and Lodi, 1988).

### **3.3. Extração de RNA total de células de *B. emersonii***

Aproximadamente 3,2 x 10<sup>7</sup> 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 g 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 g 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 g 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 (DO: 260 nm/280 nm). Alíquotas de 5 µg de todas as amostras foram aplicadas em gel de agarose 1,5% com o objetivo de verificar a qualidade do RNA. A figura 3 mostra a qualidade dos RNAs utilizados em experimentos de microarranjos e northern blot.

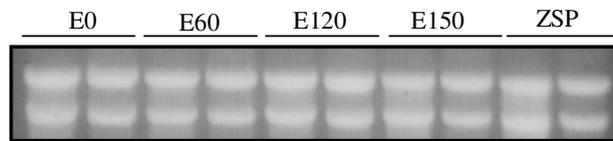


Figura 3: Alíquotas de RNA total de *B. emersonii* extraído de células em diferentes tempos ao longo da esporulação. A foto mostra os RNAs ribossômicos 18S e 28S.

#### **3.4. Síntese dos cDNAs e marcação com fluoróforos para hibridização dos microarranjos**

Para a síntese e marcação de cDNAs a partir de RNAs das amostras de condições controle (zero minuto de esporulação) e teste (60, 120, 150 minutos de esporulação e zoósporo) foi utilizado o kit SuperScript<sup>TM</sup> Plus Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen<sup>TM</sup> Life Technologies) com fluoróforos Alexa Fluor<sup>®</sup>.

Para a reação de síntese de cDNA foram utilizados 10 µg de RNA total, 6 µL de oligo(dT) ancorado, 1 µL de solução de RNA Spike de controle para hibridização e água DEPC q.s.p 18 µL. Como se partiu de RNA total não foram adicionados à reação os

hexâmeros aleatórios. Os tubos foram incubados por 5 minutos a 70°C e então transferidos para o gelo por pelo menos 1 minuto. Em seguida, adicionou-se a cada tubo 6 µL de 5X First-Strand buffer, 1.5 µL de 0,1 M DTT, 1.5 µL de dNTP mix, 1 µL de RNaseOUT™ (40 U/µL) e 2 µL de SuperScript™ III RT (400 U/µL). A reação foi realizada por 3 horas a 46°C em bloco termostaticado ThermoBlock II (Eppendorff). Após a hidrólise alcalina do RNA (15µL de 1N NaOH por 10 minutos a 70°C) a solução foi neutralizada pela adição e mistura de 15 µL de 1N HCl. A purificação foi feita em placas de filtração Multiscreen Millipore. Adicionou-se a cada tubo 120 µL de tampão de purificação e procedeu-se a centrifugação a 1.000 g, 1 minuto e 25°C. Após o descarte do filtrado, cada poço foi lavado 5 vezes com 200 µL de etanol 80% (as lavagens foram intercaladas por centrifugações a 1.000 g, por 1 minuto e 25°C, sendo a última centrifugação realizada a 3.500 rpm por 5 minutos). O cDNA foi obtido a partir de duas eluições com 45 µL de 10 mM Tris pH 8.0 a cada poço e centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. Obtidas as soluções purificadas dos cDNAs, essas foram transferidas para tubos *ependorff* e evaporadas em SpeedVac.

Na etapa de marcação, os cDNAs secos foram primeiramente dissolvidos em 5 µL de tampão de acoplamento. Sem incidência de luz direta, os fluoróforos foram então ressuspensos em mistura de 2 µL de DMSO e 3 µL de água DEPC por agitação em vórtex e imediatamente adicionados ao tubo *ependorff* contendo os cDNAs correspondentes àquela marcação. Os tubos com as reações de marcação foram mantidos por 1,5 h à temperatura ambiente em recipiente protegido da luz. As amostras controle (E0) foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 555 (fluoróforo Cy3; excitação a 555 nm), enquanto as amostras das condições de estudo (E60, E120, E150 e ZSP) foram marcadas com o fluoróforo Alexa Fluor® 647 (fluoróforo Cy5; excitação a 647 nm).

A etapa de purificação, seguinte à marcação, foi realizada segundo o mesmo protocolo usado na purificação dos cDNAs para marcação e ao final dessa, realizou-se as medidas espectrofotométricas para quantificação e determinação do rendimento de síntese e marcação de cada amostra.

### **3.5. Hibridização e leitura das lâminas de microarranjos**

Para a hibridização das lâminas de microarranjos com os cDNAs marcados, as amostras foram evaporadas no SpeedVac sob abrigo da luz e posteriormente cada par de amostras (controle e teste) foi dissolvida em 13,5 µL de água DEPC. A essa solução foram adicionados outros 13,5 µL de tampão de hibridização e 27 µL de formamida deionizada, perfazendo um total de 54 µL. Essa solução de hibridização foi aquecida a 92°C por 3 minutos em bloco termostaticado, rapidamente resfriada em gelo e centrifugada para aglutinação. Foi então dispensada sobre a lâmina de microarranjos (Figura 4) em forma de uma linha próxima a uma das colunas de sondas. Cuidadosamente uma lamínula foi colocada sobre a lâmina de forma a espalhar homogeneamente a solução por sobre todas as sondas do microarranjos. As lâminas de todas as condições de estudo sendo hibridizadas foram colocadas conjuntamente em uma câmara de hibridização de vidro (máximo de 5 lâminas por câmara), contendo um algodão umedecido com água deionizada, e essa, por sua vez, foi incubada por um período de no mínimo 16 horas a 42°C em forno de hibridização.

Passado o período de hibridização, as lâminas foram submetidas à lavagem manual com intervalos de agitação de 10 minutos em agitador orbital entre uma solução de lavagem e outra, utilizando sequencialmente as seguintes soluções: 1x SSC, 0,2% SDS a 55°C; 0,1x SSC, 0,2% SDS a 55°C e novamente 0,1x SSC, 0,2% SDS a 55°C. Após cada lavagem, as lâminas foram giradas em 180° para uma lavagem mais

homogênea das mesmas. Por fim, foi feita a uma última lavagem com solução 0,1x SSC, à temperatura ambiente com agitação por 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas quatro vezes em água deionizada, e secas sob jato de nitrogênio ultrapuro.

A leitura das fluorescências das sondas foi realizada em scanner Generation III DNA Scanner (GE Healthcare) dedicado à leitura de lâminas de microarranjos segundo o protocolo padrão para obtenção de imagens das lâminas. Foi feita, para cada lâmina, uma leitura com ganho de sinal da CCD de 700 V. Os arquivos referentes às imagens das lâminas foram então submetidos à extração dos dados de fluorescência para cada sonda dos microarranjos.

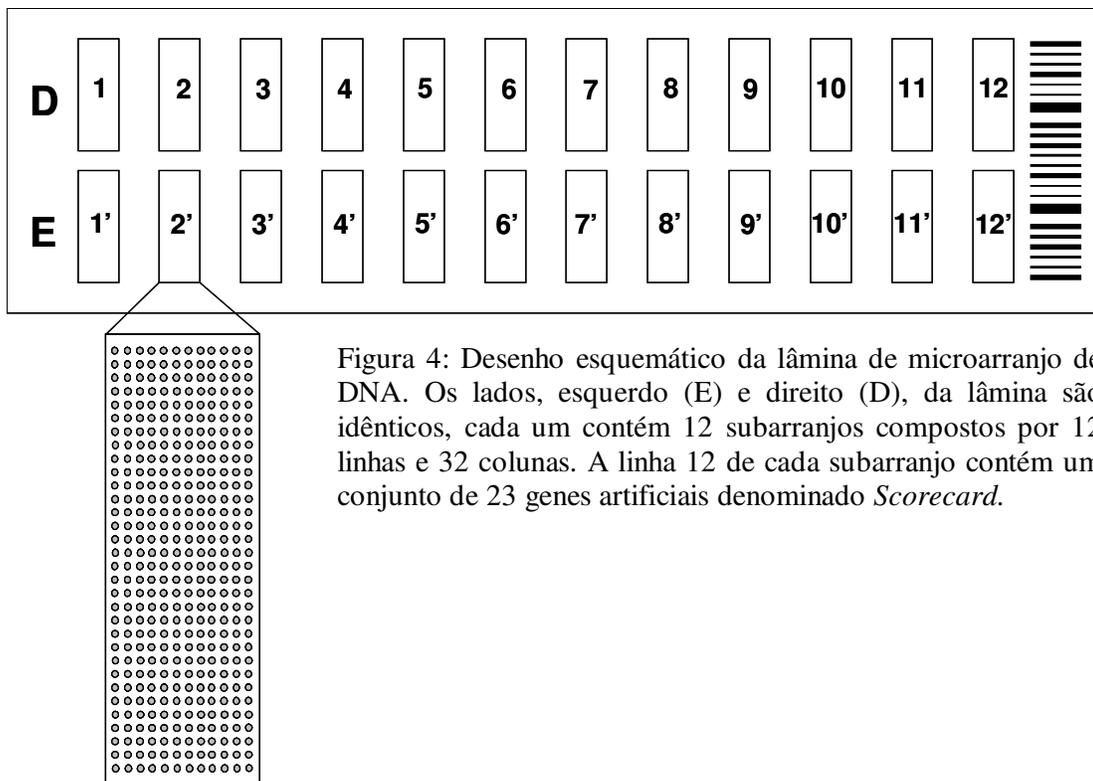


Figura 4: Desenho esquemático da lâmina de microarranjo de DNA. Os lados, esquerdo (E) e direito (D), da lâmina são idênticos, cada um contém 12 subarranjos compostos por 12 linhas e 32 colunas. A linha 12 de cada subarranjo contém um conjunto de 23 genes artificiais denominado *Scorecard*.

### 3.6. Extração e normalização dos dados de microarranjos

Os arquivos de imagens das lâminas dos microarranjos obtidos pelo processo de leitura no scanner (Figura 5) foram analisados através do programa ArrayVision™ 8.0 (Imaging Research, Inc.). Para a identificação das sondas depositadas nas lâminas, foi fornecido ao programa um arquivo contendo o mapa de posicionamento de cada sonda na lâmina.

As opções de medidas extraídas pelo programa foram: principal medida, densidade com remoção de artefatos (ARMDens); valor de background calculado pela mediana, desvio padrão com remoção de artefatos; porcentagem de “pixels” removidos, “pixels” excluídos, “flags”, e densidade com remoção de artefatos normalizada pelos fluoróforos (cnARMDens). No cálculo do background foi selecionada a subtração por “spots” vizinhos em modo individual e para a normalização por fluoróforos foi

escolhido o método LOWESS com parâmetro de LOWESS robusto com 3 interações e 30% de cobertura.

Foram realizados os alinhamentos das grades de impressão das sondas conjuntamente em ambos os canais de fluorescência através do método clássico, com parâmetro de sensibilidade 8 e raio 7, e com as opções de busca estendida e de estimativas de rotação e posicionamento de elementos.

Como opção de controle de qualidade, definimos através do programa que “flags” fossem automaticamente colocadas tanto para sondas quanto para o fundo em que 20% ou mais dos “pixels” ultrapassassem os limites inferiores ou superiores de detecção.

Após o alinhamento e a extração das medidas foi realizada uma verificação visual das imagens em ambos os canais para as lâminas. Sondas suspeitas de terem o sinal influenciado por manchas ou riscos receberam também flags manuais. Os dados foram extraídos e gravados em arquivos texto de planilhas do MS Excel (Microsoft®).

A normalização dos dados foi realizada para corrigir artefatos na incorporação dos fluoróforos e diferenças na intensidade de fluorescência entre os fluoróforos (Quackenbush, 2001; Yang *et al.*, 2002). Para isso, utilizamos o LOWESS – LOcally WEighted regreSSsion para ajustar os dados de expressão gênica, assumindo como hipótese que a maioria dos genes não deve apresentar diferença entre as duas condições. A função LOWESS está implementada no pacote estatístico R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)) e consiste em uma série de regressões lineares locais que se juntam para formar um ajuste global não-linear. A normalização foi feita no espaço  $M \times S$  onde  $M$  é a razão da intensidade de fluorescência das duas medidas para cada spot [ $M = \log_2(I_{\text{teste}}/I_{\text{referência}})$ ] e  $S$  representa a média da intensidade total do spot [ $S = \log_2(I_{\text{teste}}/2 + I_{\text{referência}}/2)$ ].

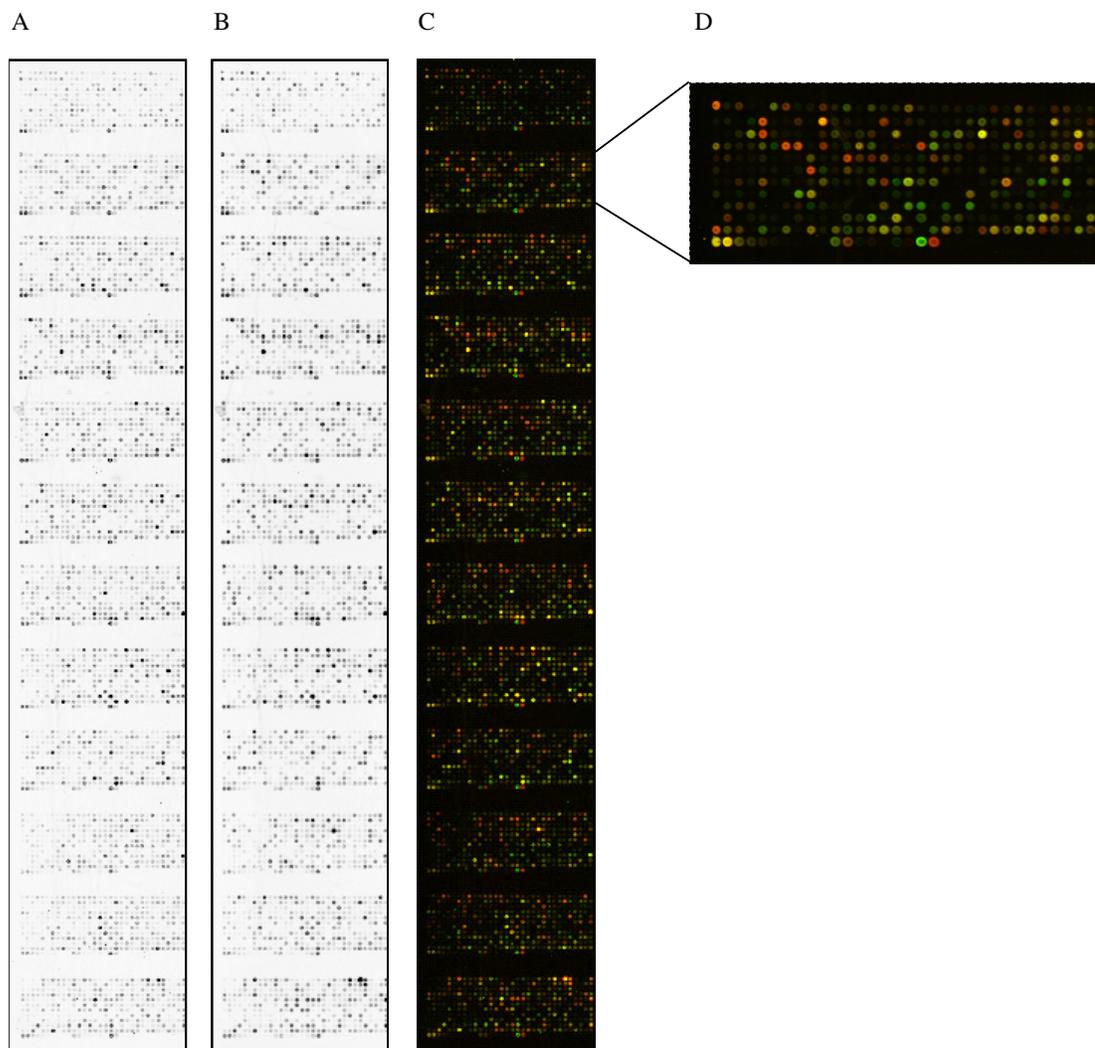


Figura 5: Imagens de uma hibridização competitiva (E0 x E60) captadas pelo scanner, mostrando o lado esquerdo da lâmina. A- canal 1 (Cy3); B- canal 2 (Cy5); C- sobreposição das imagens dos canais 1 e 2; D- imagem ampliada de um subarranjo .

### 3.7. Determinação dos genes diferencialmente expressos

Para a identificação de quais genes haviam sido diferencialmente expressos foram utilizadas ferramentas baseadas no teste estatístico HTself (<http://blasto.iq.usp.br/~rvencio/HTself>) (Vencio and Koide, 2005), que se vale da determinação de limites de corte dependentes da razão de intensidades de fluorescência em hibridizações homotípicas (isto é, uma amostra hibridizada contra ela mesma) e do

uso de métodos não paramétricos. A função de probabilidade de densidade (*pdf*) nula foi definida localmente para M em um intervalo de S, no espaço M x S, através do método de Estimador de Densidade Kernel do tipo gaussiano. Para tanto, utilizou-se como dados para análise a medida de densidade de fluorescência normalizada obtida na hibridização homotípica realizada com a amostra controle (RNA total do tempo zero de esporulação – E0). Após estimar a *pdf* nula, os limites de corte locais foram definidos como aqueles onde se encontravam 99% dos valores de M num determinado intervalo de S. O gráfico a seguir (Figura 6), do espaço M x S, apresenta os limites de corte definidos com os dados da hibridização homotípica realizada.

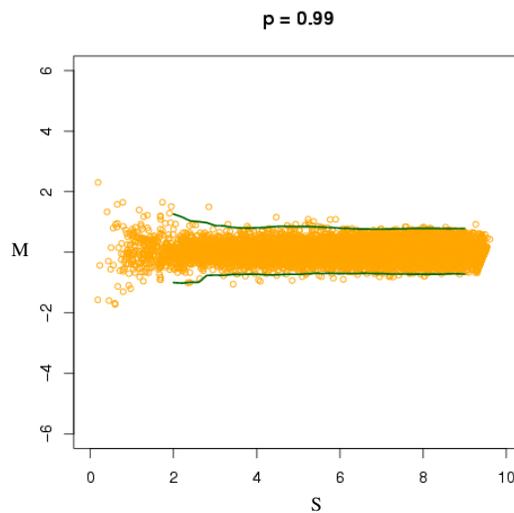


Figura 6: Gráfico do espaço M x A onde foram colocados os valores da medida de densidade de fluorescência normalizada obtida na hibridização homotípica. A linha contínua determina os limites de corte locais com a presença de 99% (p) dos pontos.  $M = \log_2(E0/E0)$  e  $S = \log_2(E0/2 + E0/2)$ .

Definidos os limites de corte para a razão de fluorescência, foram analisados os dados das demais hibridizações para todas as réplicas (três réplicas biológicas independentes). Para cada sonda foi então calculada a mediana do valor de M e a percentagem das réplicas que se encontrava em um de três grupos de expressão: Induzido, quando M se encontrava acima do limite de corte positivo naquele ponto de S; Reprimido, quando M se encontrava abaixo do limite de corte negativo naquele ponto de S; e Invariante, quando M se encontrava entre os limites positivo e negativo naquele ponto de S.

Foram considerados diferencialmente expressos aqueles genes nos quais pelo menos 66,6% dos sinais estivessem nos grupos Induzido ou Reprimido, sendo que a maioria dos genes nesses grupos apresentou 100% de percentagem de réplicas concordantes.

### **3.8. Agrupamento pelo perfil transcricional dos genes diferencialmente expressos**

Para realizar o agrupamento dos genes, de acordo com o perfil de expressão nos diferentes tempos de esporulação, usando a medida de distância euclidiana, utilizou-se o algoritmo *K means*, disponível como uma das ferramentas de análise de dados de microarranjos do programa SpotWhatR (<http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/SpotWhat>) (Koide *et al.*, 2006).

K means é um algoritmo iterativo de agrupamento, onde o número de grupos é uma das entradas do algoritmo. O usuário pode definir o número de grupos. Estes são representados por centróides, o centro do grupo. O algoritmo minimiza a somatória das distâncias de cada objeto ao centróide correspondente. Em cada interação, cada gene é designado para o centróide mais próximo e os novos centróides são computados com base na distribuição dos genes. Estes passos são repetidos até que não haja mais mobilidade dos genes entre os diferentes grupos.

Para realizar as análises de agrupamento, o programa foi alimentado com um arquivo contendo uma coluna de identificação dos clones (rotulada como ID) e as colunas contendo o logaritmo da razão de expressão (mediana do valor de M) correspondente à série temporal (rotuladas como t=0, t=60, t=120, t=150 e t=zsp) e outro arquivo no mesmo formato com as mediadas de erro. O perfil de expressão dos genes distribuídos em oito agrupamentos foi apresentado em resultados e discussão.

### **3.9. Determinação das categorias funcionais altamente representadas**

A forma mais comum de análise de terminologia é a classificação de genes em categorias, das quais o esquema utilizado neste trabalho é o proposto pelo “*The Gene Ontology Consortium*” (GO). Os três princípios organizacionais do GO são: Função molecular (M), Processo biológico (B) e Componente celular (C). Um produto gênico tem uma ou mais funções moleculares e é usado em um ou mais processos biológicos e pode estar associado com um ou mais componentes celulares. Por exemplo, o produto gênico citocromo c pode ser descrito pelos seguintes termos: atividade transportadora de elétrons (M); fosforilação oxidativa e indução da morte celular (B); matriz mitocondrial e membrana mitocondrial interna (C).

Para a identificação de quais categorias do GO estão mais representadas nos diferentes agrupamentos e também nos diferentes tempos de esporulação estudados, utilizou-se o teste estatístico BayGO (<http://blasto.iq.usp.br/~tkoide/BayGO>) (Vencio *et al.*, 2006).

O aplicativo BayGO foi desenvolvido com o objetivo de encontrar categorias funcionais (de acordo com a terminologia do Gene Ontology) altamente representados em uma lista de genes diferencialmente expressos. Este programa recebe como dados de entrada uma tabela gene-para-GO e retorna uma tabela GO-para-gene. A tabela gene-para-GO foi montada após o BlastX das seqüências depositadas nos microarranjos contra uma

base de dados local. O programa resume os dados apresentando o número de genes em cada categoria funcional do GO e calcula a medida de associação entre ser diferencialmente expresso e pertencer a uma dada categoria do GO. Esta medida de associação, denominada G, é calculada como descrito por Goodman & Kruskal (1954). Valores próximos a 1,0 indicam uma forte associação. Para determinar a significância estatística de uma dada associação, ela é comparada com a associação G\*, obtida a partir de listas de genes simuladas ao acaso. Considerou-se que uma categoria é altamente representada se o valor da probabilidade  $P = \Pr(G^* > G)$  for menor ou igual a 0,05.

### **3.10. RT-PCR quantitativo em tempo real**

Os oligonucleotídeos específicos para os genes selecionados foram desenhados utilizando-se o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems). As seqüências correspondentes estão listadas na tabela 1. Este programa otimizou o desenho dos oligonucleotídeos para a reação de RT-PCR quantitativo em tempo real, considerando-se que o produto de PCR deveria ter entre 50 e 150 pb e sua temperatura de dissociação deveria ser em torno de 80°C. 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 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.

Tabela 1: Oligonucleotídeos utilizados nos experimentos de RT-PCR quantitativo.

ID do clone	Identificação Putativa	Oligo direto (5'-3')	Oligo reverso (5'-3')
BeG60N08H03	Proteína G subunidade alfa	GTATCAAGACCACGGGCATCA	CACGTCGAACATGTGGATCTG
BeE60H28B01	Actina	GCACGGCGTCGTCAACA	CGCGGAGCTCGTTGTAGAAG
BeE30N05E04	Succinil-CoA sintetase	AAGCCCTGCAACACCGTCTA	CATGAGGATGGCAAAGTAGTATTCG
BeE90D07E02	Flavina oxidoredutase	TCCACTACCTCGACCAGTACATGT	GAGTTTATTAAGCGCGAGGAGCTA
BeE120N26B11	Cistinosina	GCGTCTCGACATTATGAACCTC	ATCTGCGGGGATGTACTTGATGA
BeE60H26A05	Fosfatidilserina decarboxilase	GTTCCCGCTGACCAACAAGA	AGACGAGGCGCAGGATGA
BeE60N07E05	Miosina	ACCAGGACGGGTTTCATCGA	TACTCGTCCGTCGGGTTCTG
BeE90N15E03	Dineína	CGACATGGTGGTCACGTACCT	CATGACCTCCTTGATGCTCTTG
BeCSAS11	Guanilato ciclase 1	AGAGCGTGACCGTCTTCTTCTC	TCGCCATCATGTCCCTTGTT
BeE90D04C07	Cofilina	CGCTACGCCGCTTTCGA	CCCAGGACACGAAGATGATCTT
BeCSAS682	Tubulina subunidade beta	TCTCAACATGCGTGAGATCGT	TCGGAGATGACCTCCCAGAA
BeE60H30D04	RNA helicase mitocondrial	ACTCGGGATACGACGTGCTT	GATGCGGTTGATGGAGAGGTT
BeCSAS885	Dinactina 6	TTGGGCTCAATCACGTTGTG	CGACGACAACCTGTTGGAAGT
BeCSAS295	Profilina	GCAGACCTACGTCGACTCCAA	GACTTGTGCGTGCCGAAGAT
BeCSAS474	Sedlina	CGCATCGTCGACAAGTTCAA	CAACAGCATGAACCGGACAT
BeCSAS659	Dinamina GTPase vacuolar VpsA	CGAGATGCTGCTCAAGTTCATC	GAGTTGGCGAGATCCGTGTT
BeCSAS615	GTPase SAR	GCAACGTATCGCCGAAAGAG	AGCACGTCCCAGAACCAGTT
BeCSAS688	GTPase RAB	CACCATCACACGCGCTACT	GCTCAATGTTACGGATCCAGTTG
BeCSAS2024	GTPase ypt5	CTGCAGGGCAACTCCAACAT	ACTCCCTCACCTCGGACTT
BeG30N18H01	GTPase ARF	TGTCGTTTGTGCGCTCCAT	GAGCTTGGCGCGGTACAC
BeE120N37B06	Guanilato ciclase 2	CAGATCGTCAGCCTGCTCAA	CCGATCGTCTCCATCTTGACA
BeE90N24F09	Guanilato ciclase 3	ACGGCGCTCGACATGGT	CACGTTGTAGCCGAGGATGA
BeE60H18E08	GTP cd42	ACGTGTTCTCGTGTGCTTCT	CCTCCGGGTACCACCTTTCC
BeE90N03D08	Kinesina	GGACGCGGTGCTTTTCG	ATCCCCTGCATGCTGAAACT
BeCSAS2066	GTPase RHO	CGATCGTCGCTGCTTTCATT	AGCACAAAACGACAGGGTAGGT
BeCSAS164	Fosfodiesterase de cGMP	CCTCGTTGCCTGCATCATC	TCACCTGGTACGCGTTGTTG

### 3.11. Eletroforese de RNA em gel de agarose-formaldeído e Northern blot

Aproximadamente 12 µg de RNA total extraído de células de *B. emersonii* em diferentes tempos ao longo da fase de esporulação (0, 60, 120, 150 minutos e zoósporos) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em tampão MOPS 1x contendo 2,2 M de formaldeído. As amostras de RNA misturadas ao tampão de amostra para RNAs foram aquecidas por 10 minutos a 65°C e aplicadas no gel. Após aproximadamente 3 horas de eletroforese a 100 V, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

Antes da transferência do RNA para a membrana de nylon, o gel foi tratado com uma solução 0,05 M de NaOH durante 30 minutos sob agitação lenta e depois transferido para uma solução de Tris-HCl 100 mM pH 7,5 e NaCl 150 mM, na qual ficou por mais 30 minutos sob leve agitação. Os RNAs do gel foram transferidos por pressão com SSC 10x utilizando o sistema de transferência da Posiblot (Stratagene) para uma membrana de nylon (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham), durante 2 horas sob 75 mmHg de pressão. As membranas foram secas por 10 minutos a 80°C e os RNAs transferidos para a membrana foram fixados por exposição à luz ultravioleta.

Após a fixação dos RNAs, as membranas foram incubadas em solução de pré-hibridização (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 120 mM pH 7,2; NaCl 250 mM; EDTA 1 mM; formamida 40%; SDS 7%) por no mínimo 1 hora a 42°C sob agitação em forno de hibridização (Hybaid). Ao final desse tempo, a sonda radioativa, previamente desnaturada por 5 minutos a 94°C, foi adicionada à solução de pré-hibridização e incubada por 16 horas a 42°C sob agitação.

Após esse período, a solução de hibridização contendo a sonda foi retirada e as membranas foram lavadas em três etapas de 30 minutos cada a 42°C utilizando-se soluções de lavagem (SSC 2x, SDS 0,1%; SSC 0,5x, SDS 0,1%; SSC 0,1x, SDS 0,1%).

Após a lavagem, as membranas foram expostas a filme de raio-X Hyperfilm (Amersham) em cassete com tela intensificadora, por no mínimo 1 dia a -80°C.

### **3.12. Preparação de sonda radioativa**

A marcação de sondas radioativas foi feita pela técnica de síntese por oligonucleotídeos de seqüências aleatórias (*random primed synthesis*) (Feinberg and Vogelstein, 1984) e, para isso, foi utilizado o *kit* Redi-prime II (Amersham Pharmacia) conforme as especificações do fabricante. A reação foi incubada por, no mínimo, 1 hora a 37°C e para retirar os nucleotídeos radioativos não incorporados, a sonda foi purificada em uma coluna com 0,9 mL de Sephadex G-50 (Pharmacia) equilibrada com tampão STE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM e NaCl 100 mM) ou utilizou-se o *kit* QIAquick nucleotide removal (Qiagen).

### **3.13. Extração de DNA de *B. emersonii***

Para a obtenção de zoósporos em grandes quantidades, cerca de  $7 \times 10^7$  zoósporos obtidos de placas de PYG-ágar foram inoculados por litro de PYG-P. A contagem das células foi feita em câmara de Neubauer, diluindo-se os zoósporos 1:10 em solução de formaldeído 3,7% saturada com CaCO<sub>3</sub>. A cultura foi mantida por 16 horas a 22°C sob agitação de 150 rpm, quando, então, as células vegetativas foram coletadas por filtração em rede de nylon (30 µm de poro) e lavadas com 1,4 L de solução de esporulação.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 600 mL da mesma solução e incubadas a 27°C, sob agitação de 150 rpm até a liberação dos zoósporos (cerca e 3,5-4 h). Os zoósporos foram então separados dos zoosporângios por filtração em rede de nylon, sendo os zoósporos concentrados por centrifugação a 4.000 rpm por 5 minutos.

Os zoósporos assim obtidos (aproximadamente  $2,3 \times 10^9$ ) foram ressuspensos em 5 mL de solução de esporulação, adicionando-se, em seguida, 5 mL de tampão A (Tris HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 1 M; SDS 2%) e 10 mL de fenol equilibrado em tampão A (3:1). A mistura foi agitada por 30 minutos a temperatura ambiente e centrifugada a 4.500 rpm por 20 minutos. À fase aquosa coletada, foram adicionados 40 mL de etanol 100% gelado, incubando-se por 30 minutos em gelo seco. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado final foi ressuspensão em 4 mL de uma solução 1x SSC e dialisado contra 0,1x SSC a 4°C por 16 horas. E seguida adicionou-se ao próprio conteúdo da membrana de diálise 0,2 mL de 20x SSC (NaCl 3M; citrato de sódio 0,3 M) e as enzimas  $\alpha$ -amilase IIA 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , RNase A 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e RNase T1, 280 U. O tratamento com as enzimas foi realizado a 37°C dialisando-se a amostra contra 1x SSC. Após 3 horas de incubação, mediu-se a absorvância em  $\lambda=260$  nm do tampão de diálise para verificar a saída dos nucleotídeos livres gerados pela digestão com as RNases. O tampão de diálise foi trocado até que se obtivesse um valor de absorvância em  $\lambda=260$  nm próximo a zero. A seguir foram adicionados 350  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pronase e incubou-se por 2 horas a 37°C.

A solução foi então misturada com fenol saturado em tampão B (Tris-HCl 0,5 M pH8,0; EDTA 10 mM; NaCl 10 mM; SDS 0,5%) e agitada por 15 minutos à temperatura ambiente. Centrifugou-se a 4.500 rpm por 20 minutos. À fase aquosa foram adicionados 40 mL de etanol gelado, e incubou-se por 30 minutos em gelo seco. A suspensão foi centrifugada a 8.000 rpm por 15 minutos a 4°C e o precipitado foi lavado com etanol 70% gelado. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de 0,1x SSC e dialisado contra 0,1x SSC a 4°C por 16 horas. A solução contendo o DNA foi estimada medindo-se a

absorbância em  $\lambda=260$  nm, assumindo-se que quando a absorbância é igual a 1, a concentração de DNA é 50  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.14. Determinação da seqüência nucleotídica dos genes de guanilato ciclases por extensão de DNA genômico**

Com o objetivo de determinar a seqüência completa correspondente ao domínio catalítico das guanilato ciclases de *B. emersonii*, foi realizada a extensão das seqüências em ambos os sentidos (5' e 3') a partir do DNA genômico utilizando-se o *kit* GenomeWalker<sup>TM</sup> Universal Kit (Clontech). A figura 7 ilustra o processo de construção das bibliotecas. Para tanto, DNA genômico de zoósporos de *B. emersonii* foram extraídos como descrito no item 3.13 e digeridos com diferentes endonucleases de restrição, as quais digerem o DNA produzindo extremidades não-coesivas. Os fragmentos de DNA genômico gerados foram subsequentemente ligados a adaptadores, cujas seqüências permitem o anelamento de oligonucleotídeos específicos (AP1 e AP2). Alíquotas das quatro bibliotecas foram usadas como molde de uma PCR primária, usando oligonucleotídeos mais externos (AP1 e GSP). O produto da primeira PCR foi então diluído e uma alíquota foi usada como molde de uma segunda PCR (nested PCR), utilizando oligonucleotídeos mais internos (AP2 e NGSP). O produto da segunda PCR foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e as bandas de interesse foram purificadas, clonadas no vetor pGEM<sup>®</sup>-T easy (Promega) e seqüenciadas.

As seqüências correspondentes aos oligonucleotídeos específicos (GSP e NGSP) utilizados na extensão em direção às extremidades 5' e 3' dos três genes de guanilato ciclase são mostrados nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

Tabela 2: Oligonucleotídeos para extensão no sentido 5'

Gene alvo	Oligo GSP (5'-3')	Oligo NGSP (5'-3')
Guanilato ciclase 1	GAGCACGCCCTCGGGCATCATCTTCTGC	CCAATGTCGATCATCGAGAACCCGGCCT
Guanilato ciclase 2	GTTGGGCTGCGACTTCTGCTCCATCTGG	GCGAAGCGGGGCATGACGAT
Guanilato ciclase 3	TCGAGCAGGTCGACCATGTCGAGCGCCG	GCCCTCGATCTCGGTGAACA

Tabela 3: Oligonucleotídeos para extensão no sentido 3'

Gene alvo	Oligo GSP (5'-3')	Oligo NGSP (5'-3')
Guanilato ciclase 2	CGTCACGCTCGAGGGCGGCAGCAACATG	TATGGGCOGCACCACGTCCT
Guanilato ciclase 3	CAAGCTCAAGGTCGGGATCCACTCGGGC	GCAAGAAGTGCTCGCGGTAC

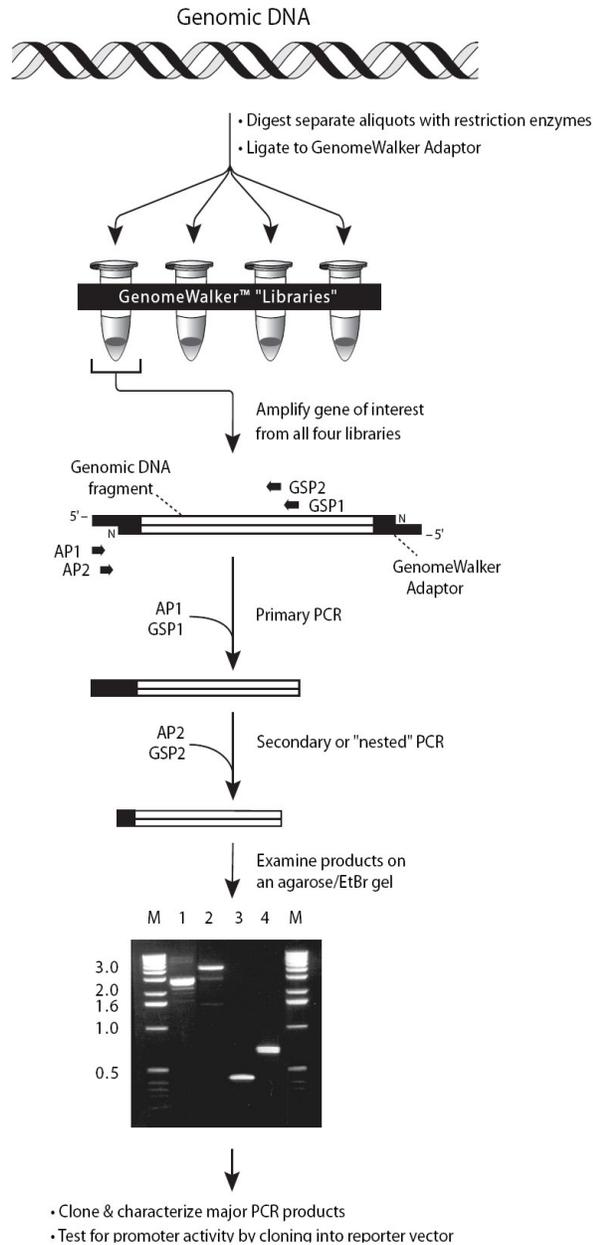


Figura 7: Desenho esquemático da construção das bibliotecas de GenomeWalker. O gel mostra um resultado típico obtido a partir de amplificações usando DNA humano de diferentes bibliotecas de GenomeWalker e oligonucleotídeos específicos. As canaletas 1, 2, 3 e 4 contêm amplificações obtidas utilizando-se DNA das bibliotecas sintetizadas a partir da digestão com as enzimas *EcoR V*, *Dra I*, *Pvu II* e *Ssp I*, respectivamente. N: grupo amino que bloqueia a extensão da extremidade 3' do adaptador ligado aos fragmentos de DNA genômico; AP: oligonucleotídeos que hibridizam na sequência do adaptador; GSP: oligonucleotídeos usados para a amplificação do gene de interesse (gene específico).

### **3.15. Preparo de células competentes para transformação por eletroporação**

Uma colônia isolada de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) 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 densidade ótica (DO) 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 e transferidas para tubos falcon. Procedeu-se nova centrifugação por 10 minutos a 3.000 x g a 4°C e em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10%. Alíquotas foram feitas com 30  $\mu$ L de células e congeladas a -80°C.

### **3.16. Transformação de *E. coli***

As células preparadas para eletroporação foram descongeladas em gelo. Após a amplificação por PCR e clonagem dos fragmentos de interesse no vetor de clonagem pGEM-T easy (Promega) seguindo as recomendações do fabricante, 5  $\mu$ L do produto de ligação dialisado foram acrescentados às células competentes. A mistura foi colocada em uma cubeta de 0,1 cm de espessura e largura e em seguida submetida à eletroporação no aparelho *Gene pulser* (Bio-Rad), usando-se como condições 1,85 kV, 25  $\mu$ F e 200  $\Omega$ . Em seguida, as células foram recuperadas em 1 mL de SOC por 1 hora a 37°C sob agitação de 150 rpm e espalhadas em placas de LB contendo ampicilina, IPTG e X-gal.

### **3.17. Seqüenciamento 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 seqüenciamento, realizada com o kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) e o seqüenciador ABI 3100 (Applied Biosystems). As reações de seqüenciamento foram realizadas 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. Os oligonucleotídeos utilizados nas reações foram T7 (5'-TATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3').

### **3.18. Preparação de extrato bruto de células de *B. emersonii* para quantificação de compostos derivados do óxido nítrico**

Aproximadamente  $6,4 \times 10^7$  células em esporulação foram coletadas, para cada tempo a ser analisado, por filtração a vácuo e maceradas na presença de nitrogênio líquido. O macerado foi transferido para um tubo de 2 mL contendo 1,5 mL de tampão de lise (RIPA) (50 mM tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% nonidet P-40, 0.5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS, 10 mM N-etilmaleimida, 1 mM DTPA (ácido dietileno-tetramino-pentacético) e coquetel de inibidores de proteases Complete™ Roche), rapidamente agitado com o auxílio de um vortex e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação por inversão. Alíquotas do extrato bruto de células foram retiradas com o objetivo de estimar a concentração de proteínas presente nos extratos. As amostras foram em seguida congeladas em gelo seco e mantidas a -80°C até o momento das análises. Todos os tubos foram envolvidos em papel alumínio para evitar a decomposição dos compostos derivados de  $\bullet\text{NO}$ .

### 3.19. Quantificação por quimioluminescência de compostos derivados do $\bullet$ NO (nitrito, nitrato, S-nitrosotióis, nitrosaminas e nitrosoheme)

A produção de  $\bullet$ NO, em células de *B. emersonii* em fase de esporulação, foi estimada pelo método de quimioluminescência de ozônio usando um Nitric Oxide Analyzer (NOA 280i, Sievers Instruments, Boulder, CO, USA). As estimativas da quantidade de  $\bullet$ NO intra e extracelular podem ser obtidas através dos níveis de nitrito/nitrato uma vez que, ao ser produzido, o  $\bullet$ NO é rapidamente oxidado aos seus produtos finais mais estáveis, nitrito e nitrato. Já a detecção de compostos derivados de  $\bullet$ NO é baseada em uma decomposição redutiva de nitroso-compostos, os quais reagem com uma mistura de iodo/iodeto liberando  $\bullet$ NO, o qual é subsequentemente medido por quimioluminescência de fase gasosa em uma reação com ozônio. Para dosar a quantidade de  $\bullet$ NO (nitrito/nitrato), bem como de seus compostos derivados, alíquotas do extrato bruto de células foram injetadas na câmara do nitric oxide analyzer (NOA) contendo solução de iodo/iodeto a uma temperatura de 60°C. Nessas condições, nitrito, S-nitrosotióis, nitrosil hemes e nitrosaminas são reduzidos. O  $\bullet$ NO liberado reage com o ozônio do NOA e a luz emitida a partir da reação quimioluminescente entre o  $\bullet$ NO e o ozônio é detectada por um tubo fotomultiplicador. Uma segunda alíquota do extrato bruto de células foi tratada com sulfanilamida 10 mM por 30 minutos à temperatura ambiente para a eliminação do nitrito. Uma terceira alíquota foi tratada com sulfanilamida 10 mM e HgCl<sub>2</sub> 7.3 mM por 30 minutos à temperatura ambiente para eliminar nitrito e S-nitrosotióis, respectivamente. S-nitrosotióis são sensíveis à decomposição induzida por mercúrio, ao contrário de outros compostos derivados de  $\bullet$ NO, incluindo nitrosaminas e nitrosil hemes. A concentração de nitrito (nmol/mg de proteína) foi calculada subtraindo-se os valores normalizados da primeira alíquota pelos valores normalizados da segunda alíquota. A produção de nitrosil heme e nitrosaminas

em (pmoles/mg de proteína) foi obtida subtraindo-se os valores normalizados da primeira alíquota pelos valores normalizados da terceira alíquota. A subtração dos valores normalizados das concentrações de nitrito e nitrosamina/nitrosil heme pelos valores normalizados da primeira alíquota fornece a concentração de S-nitrosotióis.

Para dosar a concentração de nitrato, alíquotas do extrato bruto de células foram injetadas na câmara do nitric oxide analyzer (NOA) contendo 5 mL de tricloreto de vanádio ( $VCl_3$ ) 50 mM em HCl 1 M à temperatura de 90°C sob uma atmosfera de nitrogênio ( $N_2$ ). Nessas condições, nitrito/nitrato derivado do  $\bullet NO$  presente nas amostras de extrato bruto de células são reduzidos a  $\bullet NO$  o qual se mistura ao ozônio gerado pelo NOA. A luz emitida a partir da reação quimioluminescente entre o  $\bullet NO$  e o ozônio é detectada por um tubo fotomultiplicador. Como a concentração de nitrito já é conhecida, a concentração de nitrato é facilmente obtida por meio de uma simples subtração.

### **3.20. Microscopia confocal de varredura a laser**

Com o objetivo de detectar a produção de  $\bullet NO$  em células de *B. emersonii* em fase de esporulação, aproximadamente  $4 \times 10^4$  células (zoósporos) foram inoculadas em lâmina de microscopia e encubadas a 27°C por 4.5 horas em meio definido (DM4) a fim de que as células germinassem e crescessem. Após o tempo de germinação e crescimento (4.5 horas) adicionou-se diaminofluorosceína-2-diacetato (DAF-2 DA) na concentração final de 10  $\mu M$  e as células permaneceram em crescimento por mais 30 minutos a 27°C ao abrigo da luz. Após o tempo necessário para a captação do fluoróforo, as células foram lavadas por imersão em solução de esporulação, incubadas nessa mesma solução e visualizadas ao microscópio. As imagens fluorescentes foram obtidas utilizando-se um microscópio Zeiss LSM 510 ConfoCor3. As células foram excitadas a 492 nm e a luz emitida foi captada em 515 nm.

Para a visualização da captação de  $\text{Ca}^{2+}$  nos primeiros minutos da esporulação, as células foram incubadas com 10  $\mu\text{M}$  de Fluo3 por 15 minutos antes da indução da esporulação. Após a incubação, os esporângios foram lavados 3 vezes com tris-maleato 1 mM e incubados em solução de esporulação para a aquisição das imagens. Para Fluo3, os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 490 nm e 530 nm, respectivamente.

### **3.21. Ensaio de GMP cíclico**

Um total de  $2 \times 10^4$  zoósporos foi inoculado em meio DM4 a fim de que germinassem e crescessem. Após 16 horas de crescimento a 19°C, as células foram filtradas e lavadas com solução de esporulação. Os esporângios foram ressuspensos em 200 mL da mesma solução e divididos em duas alíquotas de mesmo volume (100 mL). A uma das alíquotas foram adicionados 250  $\mu\text{M}$  de 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ) (Sigma), um inibidor de guanilato ciclase solúvel sensível a  $\text{NO}$ . Após 150 minutos a 27°C sob agitação de 150 rpm, os zoosporângios foram coletados por centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos) e ressuspensos em tampão Tris-EDTA contendo 100  $\mu\text{M}$  de 3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) e 0.15 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). As células foram lisadas por sonicação (três pulsos de 20 segundos com intervalos de um minuto no gelo).

A quantidade de cGMP produzida na ausência e na presença de 250  $\mu\text{M}$  de ODQ foi estimada usando o kit Cyclic GMP [ $^3\text{H}$ ]assay system (Amersham). O kit baseia-se em um ensaio de competição, onde o cGMP intracelular (não marcado) e uma quantidade conhecida de cGMP tritiado competem pela ligação a um anticorpo, o qual tem alta afinidade e especificidade por cGMP. A quantidade de cGMP tritiado ligado ao anticorpo é inversamente proporcional à quantidade de cGMP não marcado presente na

amostra adicionada ao ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica seguindo as recomendações do fabricante (Amersham) e os valores foram normalizados de acordo com a concentração de proteína presente em cada amostra.

### **3.22. Ensaio de atividade óxido nítrico sintase**

Um total de  $2 \times 10^5$  zoósporos foi inoculado em meio DM4 a fim de que germinassem entrando em crescimento vegetativo. Após 16 horas de crescimento a 19°C, as células foram filtradas e lavadas com solução de esporulação. Os esporângios foram ressuspensos em 500 mL da mesma solução e incubados a 27°C sob agitação de 150 rpm. Em diferentes tempos da esporulação, alíquotas de 100 mL foram tomadas e coletadas por centrifugação (3.000 rpm por 5 minutos) e ressuspensos em tampão de homogeneização (250 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, pH 7.4) contendo 0.15 mg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). As células foram lisadas por sonicação (três pulsos de 20 segundos com intervalos de um minuto no gelo).

Os ensaios de atividade NOS foram realizados utilizando-se o kit Calbiochem<sup>®</sup> Nitric Oxide Synthase Assay Kit, o qual se baseia na converção da L-arginine em L-citruline pela enzima <sup>•</sup>NO sintase. Todos os ensaios foram realizados em triplicata biológica usando <sup>3</sup>H-arginine monohydrochloride (PerkinElmer) como substrato da <sup>•</sup>NO sintase seguindo as recomendações do fabricante (Calbiochem<sup>®</sup>). Os dados foram normalizados usando os valores de cpm obtidos no controle negativo, os quais foram realizados usando tampão ao invés de extrato celular.

### **3.23. Microscopia de imunofluorescência confocal**

Zoósporos obtidos de placas PYG-ágar foram coletados e lavados em água estéril. Em seguida, as células foram fixadas com para-formaldeído 4% durante 2 horas

à temperatura ambiente. Para tanto, 0,5 grama de para-formaldeído foi ressuspenso em 6,25 mL de água (concentração final de 8%) e colocado em banho Maria a 65°C, para a dissolução foram adicionadas gotas de NaOH 5 M seguido de agitação até a completa dissolução do para-formaldeído. O para-formaldeído 8% foi diluído em TBS para 4% e então usado para a fixação das células. Em seguida as células foram lavadas duas vezes com TBS e incubadas por 30 minutos em TBS contendo Triton 0,1%. As células foram lavadas novamente com TBS e colocadas sobre lâminas novas previamente tratadas com poli-lisina. Para tanto, as lâminas novas e limpas foram cobertas no local da observação com solução de 0,1% de poli-lisina e incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente seguido de incubação por 1 hora a 60°C. As lâminas foram lavadas com água destilada e deixadas à temperatura ambiente até secarem completamente. Após as células estarem sobre as lâminas, elas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. As células foram lavadas com TBS contendo BSA 1% e Azida 0,05% e bloqueadas na mesma solução por 30 minutos seguindo-se da incubação com o soro policlonal anti- $\beta$ -tubulina numa diluição de 1:200 (em TBS/BSA/Azida) durante a noite na câmara fria. Na manhã seguinte as lâminas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos com TBS/BSA/Azida e incubadas durante 2 horas com o anticorpo anti-IgG de coelho conjugado com Cy3 numa diluição de 1:50 em TBS/BSA/Azida. Após a incubação as lâminas foram lavadas 5 vezes por 5 minutos com TBS e secas à temperatura ambiente. Por fim, foram colocadas sobre as lâminas algumas gotas de solução de montagem (0,9 mL de glicerol e 0,1 mL de uma solução composta de 10 mg de p-fenilenediamina diluída em 1 mL de Tris-HCl 0,1 M pH 7,5) e em seguida as lâminas foram cobertas com lamínulas. As lamínulas foram pressionadas levemente sobre a solução de montagem para a retirada do excesso e de bolhas, e em seguida as lâminas foram coladas com esmalte de unha.

#### 4. Resultados e Discussão

Com o objetivo de estudar as mudanças na expressão gênica ao longo da fase de esporulação do quitridiomiceto *Blastocladiella emersonii*, experimentos de microarranjos de cDNA foram realizados utilizando RNAs extraídos de células coletadas em diferentes pontos da esporulação. Para que um dado gene fosse classificado como diferencialmente expresso, era necessário que pelo menos 66,6% das réplicas estivessem fora dos limites de credibilidade definidos pelos experimentos de hibridização homotípica, descritos em materiais e métodos (item 3.7).

Aproximadamente 32% das 3.773 ESTs distintas provenientes do transcriptoma de *B. emersonii* e depositadas nas lâminas de microarranjos (Georg and Gomes, 2007) apresentaram-se diferencialmente expressas em pelo menos um dos quatro pontos analisados durante a esporulação. Um total de 615 genes distintos foi induzido ao passo que 645 foram reprimidos ao longo da esporulação.

O número de genes diferencialmente expressos em cada um dos quatro pontos analisados ao longo da esporulação (60 min, 120 min, 150 min e zoósporo) foi de: 48, 163, 210 e 392, respectivamente para os genes induzidos e 102, 327, 346, 416 respectivamente para os genes reprimidos, em relação ao tempo zero deste estágio.

O aumento no número de transcritos diferencialmente expressos ao longo da esporulação (ilustrados nos gráficos da figura 8) reflete não apenas a regulação em nível transcricional que ocorre durante a esporulação, mas também a necessidade de diferentes funções moleculares à diferenciação dos zoósporos produzidos no final dessa fase do desenvolvimento do fungo.

A classificação funcional dos genes diferencialmente expressos em cada ponto analisado da esporulação é mostrada na figura 8. Muitos genes sem identificação putativa (no matches) apresentaram níveis de expressão alterados. Dentre os 1207 genes

diferencialmente expressos em pelo menos um dos quatro pontos analisados, 564 seqüências não apresentam similaridade com genes em outros organismos. Embora esse número corresponda a aproximadamente 46,7% dos genes diferencialmente expressos, ele não é maior que aquele observado no transcriptoma determinado em *B. emersonii*, onde 48% dos ESTs não apresentaram identificação putativa (Ribichich *et al.*, 2005).

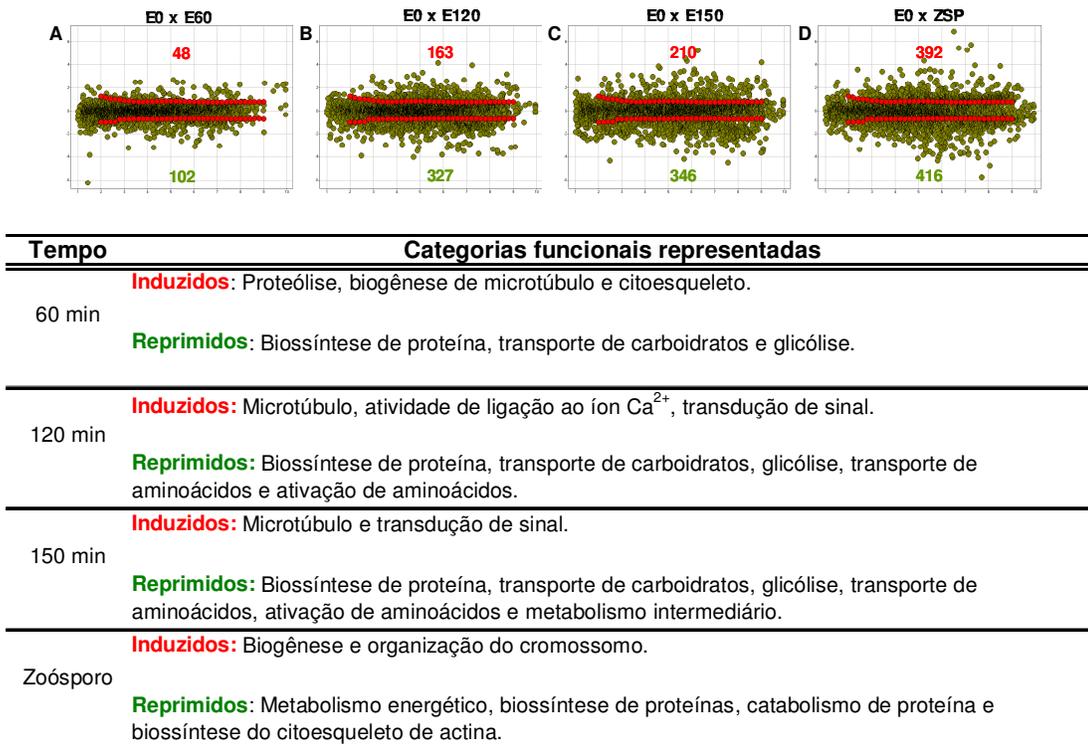
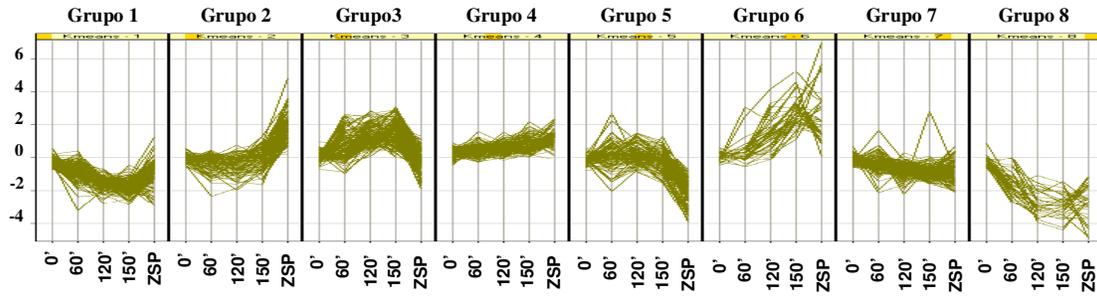


Figura 8: Análise das hibridizações (mediana de três réplicas biológicas) para os diferentes tempos de esporulação em *B. emersonii*. Os gráficos A, B, C e D mostram a dispersão dos genes no espaço M x S para os tempos de 60, 120, 150 minutos e zoósporos, respectivamente. O número de genes induzidos e reprimidos em cada tempo analisado é mostrado em vermelho e verde, respectivamente. Os genes diferencialmente expressos estão localizados fora dos limites definidos pelas curvas de hibridizações homotípicas (mostradas em vermelho). A tabela descreve as categorias funcionais enriquecidas em cada ponto da esporulação analisada ao longo do tempo.

#### **4.1. Perfil de variação dos genes diferencialmente expressos ao longo da esporulação de *B. emersonii***

A fim de obter uma visão do perfil de variação dos genes diferencialmente expressos durante a esporulação de *B. emersonii*, procedeu-se uma análise de agrupamento dos perfis de expressão utilizando-se o algoritmo *K-means* com oito grupos distintos. A figura 9 mostra os agrupamentos *K-means* bem como as categorias funcionais mais representadas para cada conjunto de genes. Foram observados quatro padrões de indução e outros quatro de repressão durante a fase de esporulação. Os agrupamentos 2, 3, 4 e 6 possuem transcritos induzidos em zoósporos; induzidos transitoriamente na esporulação; ligeiramente induzidos e fortemente induzidos, respectivamente. Genes transitoriamente reprimidos na esporulação; reprimidos em zoósporos; ligeiramente reprimidos e fortemente reprimidos estão reunidos nos agrupamentos 1, 5, 7 e 8, respectivamente.



Grupo	Categorias funcionais representadas
1	Biossíntese de proteína, degradação de proteína, dobramento de proteína e resposta a estresse, metabolismo de aminoácido e transporte.
2	Biogênese e organização do cromossomo, transcrição e síntese de proteínas, microtúbulo/citoesqueleto e transporte.
3	Microtúbulo/citoesqueleto e transporte.
4	Transdução de sinal, transcrição e processamento de RNA e microtúbulo/citoesqueleto.
5	Metabolismo energético, dobramento de proteína e resposta a estresse, degradação de proteína, tráfego intracelular de proteína e metabolismo de carboidratos.
6	Biossíntese de quitina, transdução de sinal, transporte e degradação de proteína.
7	Biossíntese de proteína, degradação de proteína, dobramento de proteína e resposta a estresse, metabolismo de aminoácido e transporte.
8	Biossíntese de proteína, degradação de proteína, metabolismo energético e transporte de carboidratos.

Figura 9: Agrupamentos dos genes diferencialmente expressos ao longo da esporulação de *B. emersonii* utilizando o algoritmo *K-means*. Os eixos X e Y referem-se à razão de expressão  $M [M = \log_2(I_{\text{teste}}/I_{\text{referência}})]$  e aos pontos de esporulação analisados ao longo do tempo (em minutos), respectivamente. A tabela descreve as categorias funcionais enriquecidas em cada agrupamento.

O grupo 1 possui genes que codificam proteínas ribossômicas, cujos níveis dos transcritos diminuíram até os 150 minutos de esporulação, seguidos por um aumento nos zoósporos. No grupo 2, agrupam-se genes envolvidos com a biogênese e organização do cromossomo bem como transcritos relacionados com os processos de transcrição, síntese de proteína e microtúbulo/citoesqueleto. O grupo 3, composto por genes transitoriamente induzidos, contém transcritos relacionados com microtúbulo/citoesqueleto e transdução de sinal. O grupo 4 apresenta genes com as menores razões de indução e estão envolvidos em transdução de sinal, transcrição, processamento de RNA e citoesqueleto. O grupo 5, composto por genes com expressão fortemente reprimida em zoósporos, possui transcritos envolvidos com o metabolismo energético, degradação de proteínas e tráfego intracelular de proteína. No grupo 6, estão agrupados genes com as maiores razões de indução e estão relacionados com a transdução de sinal, biossíntese de quitina e degradação de proteína. O grupo 7 possui genes com as menores razões de repressão e estão envolvidos com metabolismo de proteína, metabolismo de aminoácidos, degradação de proteína e transporte. O grupo 8 apresenta transcritos com as maiores razões de repressão e estão relacionados com a biossíntese de proteínas, metabolismo energético, degradação de proteína e transporte de carboidratos.

A maioria das seqüências sem identificação putativa (no matches) foi reunida nos grupos 4 (73% dos transcritos do grupo) e 6 (72% dos transcritos do grupo). A alta percentagem de transcritos diferencialmente expressos sem identificação putativa sugere que muitas dessas seqüências podem estar envolvidas em importantes funções durante o processo de diferenciação dos zoósporos, sendo, portanto, importantes candidatas para análises futuras.

## 4.2. Validação dos perfis de expressão por RT-PCR quantitativo

Para verificar o nível de credibilidade dos perfis de expressão observados nos experimentos de microarranjos, oito genes diferencialmente expressos ao longo da esporulação, segundo os dados de microarranjo, foram selecionados e tiveram seus perfis de expressão determinados por RT-PCR quantitativo em tempo real. Os genes escolhidos para a validação representam diferentes processos celulares, tais como: transdução de sinal, microtúbulo, citoesqueleto e metabolismo energético. Como pode ser observado na figura 10, os dados dos experimentos de RT-PCR quantitativo corroboram os perfis de expressão gênica obtidos nos experimentos de microarranjos de cDNA.

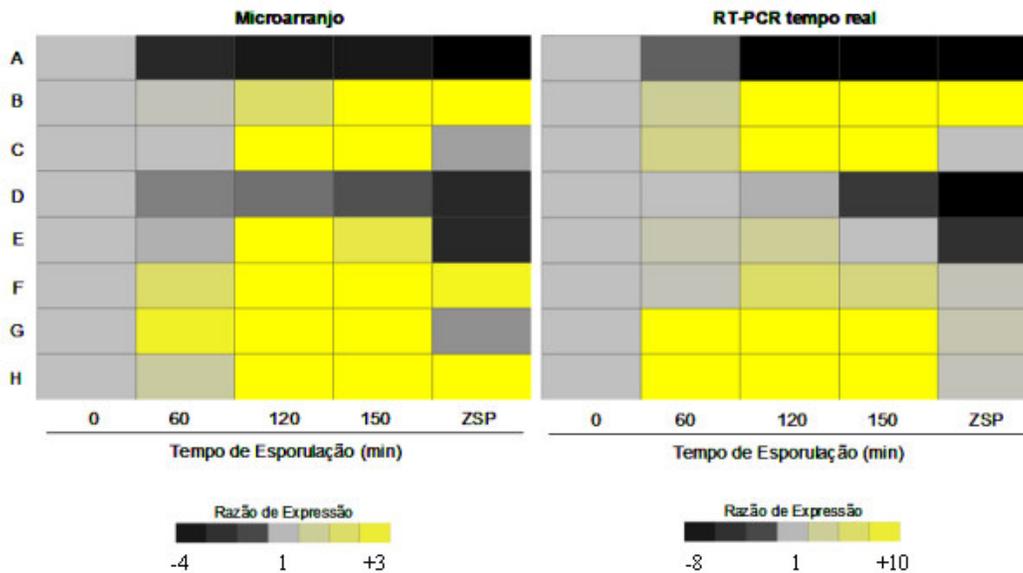


Figura 10: Perfis de expressão de oito genes obtidos a partir de microarranjos de cDNA e RT-PCR quantitativo. As linhas A, B, C, D, E, F, G e H correspondem a proteína G (subunidade  $\alpha$ ), actina, succinil-CoA sintase, flavina oxidoredutase dependente de NADH, cistinosina, fosfatidilserina decarboxilase, miosina e dineína, respectivamente.

### **4.3. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos**

#### **4.3.1. Genes envolvidos na biossíntese de proteína**

Genes envolvidos na biossíntese de proteína tais como, aminoacil- tRNA sintetases (arginil-, seril, treonil-, triptofanil-, aspartil-, valil- e outras tRNA sintetases), fatores de iniciação da tradução, fatores de elongação da tradução bem como dezenas de proteínas ribossômicas, apresentaram redução em seus níveis transcricionais ao longo da fase de esporulação. A maior parte desses genes está reunida no grupo 1, ao passo que outros poucos estão presentes nos grupos 7 e 8 (Figura 9). Como sugerido pelo perfil de expressão gênica do grupo 1, a maioria dos genes envolvidos na biossíntese de proteína tem seus níveis transcricionais reduzidos até os 150 minutos da esporulação. No entanto, os níveis de expressão desses transcritos aumentam nos zoósporos, indicando que ocorre uma mudança no padrão de expressão de tais genes durante a esporulação tardia. Esses resultados sugerem que ao longo da fase de esporulação, os zoosporângios reduzem a síntese de transcritos envolvidos na biossíntese de proteínas em decorrência, provavelmente, da condição de baixa disponibilidade energética à qual as células são submetidas durante essa fase do desenvolvimento. Contudo, durante a esporulação tardia, as células parecem aumentar a atividade transcricional de genes necessários à biossíntese de proteínas provavelmente para estocar esses transcritos em estruturas típicas dos zoósporos denominadas capacete nuclear. Essa estrutura contém ribossomos, mRNAs e tRNAs que serão utilizados durante os eventos iniciais da germinação do zoósporo, os quais são inteiramente pré-programados por meio de RNAs e proteínas estocados (Lovett, 1968; Silva *et al.*, 1987; Soll and Sonneborn, 1971a, b). Genes envolvidos na captação de aminoácidos também apresentaram o mesmo perfil transcricional. De fato, transporte e ativação de aminoácidos aparecem entre as categorias funcionais super-representadas dentre os genes reprimidos aos 120 e 150

minutos da esporulação (Figura 8). Mais uma vez, transporte e ativação de aminoácidos são processos energeticamente dispendiosos, além disso, o meio no qual ocorre o processo de esporulação é desprovido de aminoácidos (solução de esporulação), o que pode explicar a redução na expressão dos genes envolvidos com o transporte de aminoácidos.

#### **4.3.2. Metabolismo central do carbono**

Muitos genes envolvidos com o metabolismo central do carbono tiveram a expressão reduzida durante a esporulação de *B. emersonii*. Por exemplo, genes que codificam enzimas das vias glicolítica e gliconeogênica, tais como fosfoglicose isomerase (PGI), frutose-1,6-bifosfato aldolase (FBA), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TDH), enolase (ENO), piruvato desidrogenase (PDA) e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PCK); enzimas dos ciclos do ácido cítrico e glioxalato, dentre as quais estão citrato sintase (CIT), aconitato hidratase (ACO), isocitrato desidrogenase (IDH), succinil-CoA sintase (SUC), succinato desidrogenase (SDH), malato desidrogenase (MDH), e malato sintase (MLS); assim como genes que codificam enzimas envolvidas com o sistema de transporte de elétrons da mitocôndria tais como, NADH-ubiquinona oxidoreductase (NHD), succinato desidrogenase (SDH-UQ), ubiquinol-citocromo c redutase (QCR), citocromo c oxidase (COX). A figura 11 apresenta uma visão geral dos genes do metabolismo central do carbono que tiveram redução em seus níveis de expressão ao longo da esporulação de *B. emersonii*.

É importante salientar que os resultados aqui mostrados referem-se a níveis transcricionais e, portanto, não significa que tais vias do metabolismo energético estejam completamente reprimidas durante a fase de esporulação. A queda da expressão dos genes relacionados com o metabolismo central do carbono poderia ser resultado da

carência nutricional à qual as células são submetidas durante a esporulação. A completa ausência de carboidratos, aminoácidos e outras moléculas orgânicas na solução de esporulação, que poderiam ser usadas como fontes de carbono e energia durante a diferenciação dos zoósporos, é percebida pela célula, que de fato forma um septo na região basal do zoosporângio impedindo a comunicação com o meio externo, a qual por sua vez reduz o nível de transcrição de genes do metabolismo energético em função da carência de substratos que possam ser oxidados por essas vias. Como mencionado anteriormente, a célula continua produzindo energia para manter as funções celulares necessárias aos eventos que levam à diferenciação dos zoósporos. Entretanto, a transcrição de genes cujos produtos não são necessários em um dado momento pode ser um processo energeticamente dispendioso para a célula, mesmo que esses transcritos codifiquem produtos envolvidos com a produção de energia via glicólise, ciclo do ácido cítrico e cadeia respiratória.

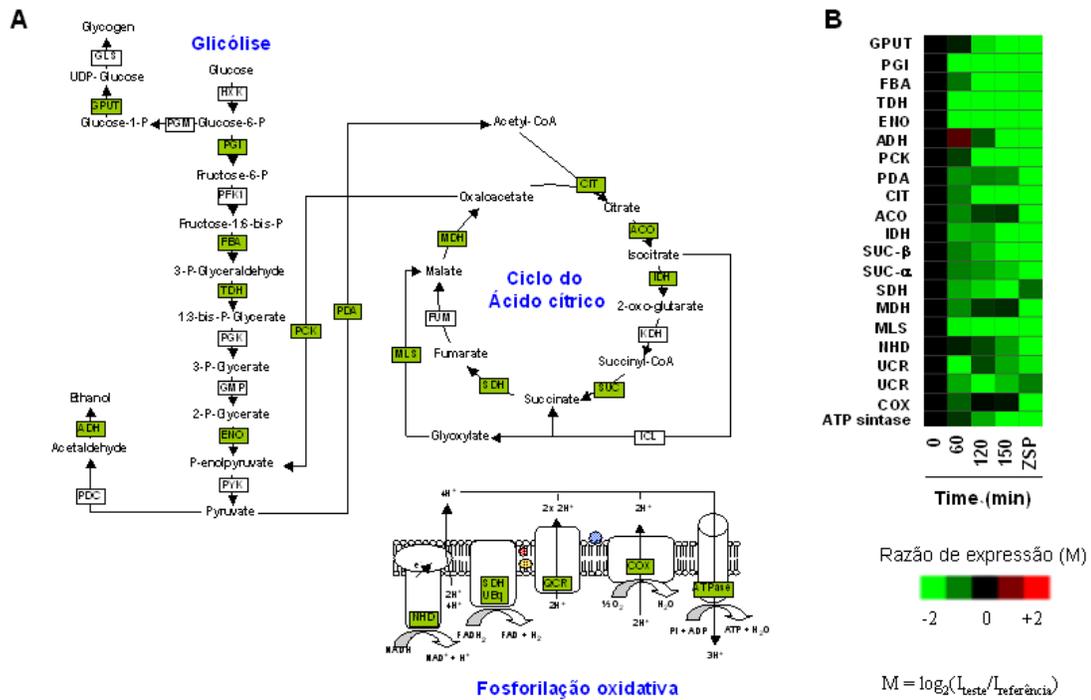


Figura 11: Visão geral das enzimas que participam das vias do metabolismo central do carbono. A- As caixas verdes indicam genes que apresentaram expressão diferencial ao longo da esporulação e as brancas, aqueles que ainda não foram isolados de *B. emersonii* ou não tiveram suas seqüências depositadas nas lâminas de microarranjo. B- Perfil transcricional dos genes do metabolismo central do carbono ao longo da esporulação.

### 4.3.3. Degradação de proteína

A análise de microarranjos também revelou mudanças no padrão de expressão gênica de transcritos envolvidos com a degradação de proteínas durante a esporulação de *B. emersonii*. Genes que codificam diferentes classes de proteases, tais como, carboxipeptidases, aminopeptidases, metaloproteases, iminopeptidases, bem como subunidades do proteassoma e proteínas envolvidas no ciclo de degradação por ubiquitina, foram reunidos nos grupos 1, 5 e 7 (Figura 9).

O controle da estabilidade das proteínas celulares é uma das formas através das quais as células regulam funções como crescimento, diferenciação, sobrevivência e desenvolvimento. A variedade de genes, relacionados com proteólise e peptidólise, com diferentes perfis transcricionais indica que durante a esporulação, a degradação de proteínas parece exercer um importante papel na regulação da expressão gênica em nível pós-traducional. Embora a maioria dos transcritos envolvidos na degradação de proteínas registre queda em seus níveis durante a esporulação (Figura 9, grupos 1, 5 e 7), as análises das categorias funcionais enriquecidas nos diferentes tempos analisados durante a esporulação mostraram que durante a primeira hora da esporulação, a categoria de proteólise aparece como super-representada entre os genes induzidos (Figura 8). De fato, a degradação de proteínas é maior na fase inicial da esporulação (12%/h) do que durante a germinação (5%/h), como mostrado por (Lodi and Sonneborn, 1974). Segundo os autores, a atividade proteolítica no início da esporulação é necessária, provavelmente, para (i) fornecer aminoácidos para a síntese de novas proteínas, (ii) remover proteínas que, de outra maneira, poderiam impedir o processo de diferenciação dos zoósporos e (iii) promover a clivagem em peptídeos precursores, tornando-os ativos ou inativos.

Muitos genes envolvidos no catabolismo de proteínas tiveram redução nos níveis de seus transcritos apenas nos zoósporos (Figura 9, grupo 5). Esse resultado está de acordo com aqueles obtidos por Lodi & Sonneborn, mostrando que a taxa de degradação protéica nos zoósporos (< 1%/h) é consideravelmente menor do que na germinação (5%/h) e na esporulação (12%/h) (Lodi and Sonneborn, 1974). Em posse desses dados, a rápida degradação de proteína que se dá no início do processo de esporulação parece ser essencial para a mudança no programa de citodiferenciação que leva à formação dos zoósporos de *B. emersonii*.

#### **4.3.4. Enovelamento de proteína e resposta a estresse**

A esporulação é uma importante resposta celular à carência nutricional não apenas em *B. emersonii*, mas também em outros microrganismos. No entanto, de uma maneira geral, genes envolvidos com enovelamento de proteínas e resposta a estresse apresentaram redução na expressão durante a fase de esporulação (Figura 9, grupos 1, 5 e 7). Interessantemente, quatro transcritos que codificam proteínas de choque térmico (HSP60, HSP70, HSP88, HSP90) foram reunidos nos grupos 1 e 7 enquanto genes cujos transcritos codificam glutathione S-transferase, tiorredoxina peroxidase e peroxirredoxina são encontrados no grupo 5. Os resultados parecem indicar que a carência nutricional à qual as células são submetidas não representa uma situação de estresse que justifique a expressão dos genes de choque térmico mencionados acima. De fato, a síntese de proteínas de choque térmico é regulada segundo o estágio do desenvolvimento em que o fungo se encontra dentro do ciclo de vida (Bonato *et al.*, 1987). Conjuntos distintos de proteínas de choque térmico são induzidos durante as diferentes fases do desenvolvimento sob condição de choque térmico, enquanto outras proteínas relacionadas a este estresse são expressas durante a esporulação mesmo na ausência do estresse (Bonato *et al.*, 1987; Georg and Gomes, 2007; Stefani and Gomes,

1995). Por outro lado, os níveis dos transcritos de genes que codificam proteínas com propriedades antioxidantes, tais como aqueles citados acima, são mantidos até os 150 minutos da esporulação, apresentando-se reduzidos apenas em zoósporos (Figura 9, grupo 5). Em leveduras e fungos filamentosos, glutathione (GSH) está presente em altas concentrações (até 10 mM) e está envolvida com funções celulares básicas tais como, manutenção da estrutura mitocondrial, integridade da membrana, diferenciação celular e desenvolvimento (Pocsi *et al.*, 2004). Além disso, glutathione é muito importante em diversas situações de estresse em fungos, assegurando a manutenção celular em situações de carência de nitrogênio e enxofre. A adaptação à carência de carbono resulta no aumento da tolerância ao estresse oxidativo, envolvendo a indução de elementos dependentes de GSH próprios do sistema de defesa antioxidante (Pocsi *et al.*, 2004). É possível que a situação de estresse gerada no momento da indução da esporulação desencadeie o aumento da expressão de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo, os quais se mantêm induzidos até os 150 minutos da esporulação, afim de proteger as células de um eventual estresse oxidativo resultante da carência nutricional.

#### **4.3.5. Microtúbulo e citoesqueleto**

Aproximadamente 60 minutos após a indução da esporulação, genes envolvidos na composição e função do citoesqueleto apresentam seus níveis de expressão aumentados, permanecendo assim até os 150 minutos da esporulação, diminuindo apenas em zoósporos (Figura 9, grupo 3). Dentre eles pode-se citar transcritos que codificam diferentes cadeias de actina, tubulina, miosina, dineína, proteínas envolvidas com o tráfego intracelular de vesículas e outras proteínas, como também uma enzima denominada catanina, a qual se encontra localizada nos pólos dos fusos mitótico e meiótico de células animais (McNally *et al.*, 2006).

Como se sabe, tais proteínas estão entre os componentes mais importantes do citoesqueleto. Elas estão envolvidas em vários processos biológicos tais como, mudanças de forma, crescimento, mobilidade, secreção, divisão e diferenciação (Cleveland and Sullivan, 1985; Farmer *et al.*, 1986). De fato, muitas das transformações que ocorrem ao longo da formação dos zoósporos são dependentes da atividade do citoesqueleto. Durante os primeiros estágios da esporulação, uma célula vegetativa multinucleada converte-se em um zoosporângio através da formação de um septo basal, o qual separa o talo do sistema de rizóides, e de uma papila de descarga que surge na extremidade apical do zoosporângio. Em um estágio mais tardio, a diferenciação dos zoósporos é marcada: 1) pela formação do flagelo, que é caracterizada pela transformação de um dos dois centríolos (o maior deles) no corpo basal a partir do qual o axonema flagelar se alonga; 2) pela clivagem citoplasmática ao redor de cada núcleo, delimitando uma região conhecida como pré-esporo, onde o sistema de membrana começa a ser formado. Assim sendo, as mudanças dramáticas que ocorrem na arquitetura celular durante a esporulação explicam a indução de genes envolvidos com a formação e atividade do citoesqueleto observada nos experimentos de microarranjos.

#### **4.3.6. Transdução de sinal**

As mudanças morfológicas e bioquímicas que ocorrem de maneira sincronizada durante o ciclo de vida de *B. emersonii* e que levam à diferenciação dos zoósporos durante a esporulação são controladas por mecanismos acurados de transdução de sinal, os quais envolvem diferentes atividades enzimáticas tais como, quinase dependente de cAMP, fosfatase, adenilato e guanilato ciclases, fosfodiesterases de cAMP e cGMP, bem como proteínas cuja atividade é dependente do complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (Gomes and Da Costa Maia, 1979; Juliani *et al.*, 1979; Maia *et al.*, 1979; Silverman and Epstein, 1975; Simao and Gomes, 2001; Terenzi and Maia, 1993; Vale *et al.*, 1975;

Vale and Maia, 1976). De uma maneira geral, os transcritos cujos produtos estão envolvidos na transdução de sinal estão reunidos nos grupos 3, 4 e 6 (Figura 9). Dentre eles, pode-se citar, as subunidades catalítica e regulatória da proteína quinase dependente de cAMP, as subunidades da proteína G, serina/treonina quinase, proteína quinase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina, fosfodiesterases, proteína quinase dependente de ciclina, histona deacetilase, metiltransferases e outros.

A participação do  $\text{Ca}^{2+}$  na diferenciação celular tem sido demonstrada não apenas em *B. emersonii* mas também em outros microrganismos, onde a esporulação é induzida em meio desprovido de nutrientes mas contendo  $\text{Ca}^{2+}$  (Coutinho and Correa, 1999). De fato, as análises de microarranjos revelaram a indução de um transcrito que codifica uma proteína fosfatase ativada por  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina denominada calcineurina. O nível de expressão do gene da fosfatase calcineurina aumenta 60 minutos após a indução da esporulação, alcançando níveis máximos de indução aos 150 minutos e reduzindo-se consideravelmente em zoósporos. (Figura 9, grupo 3). O perfil de expressão da calcineurina provavelmente reflete sua importância para o processo de diferenciação dos zoósporos em *B. emersonii*. De fato, em *Aspergillus fumigatus*, um mutante na subunidade catalítica A da calcineurina comprometeu a esporulação bem como produziu conídios defeituosos e longos (Steinbach *et al.*, 2006), sugerindo um papel essencial dessa fosfatase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em eventos de diferenciação, tal como a esporulação em fungos.

Um achado interessante foi o perfil de expressão de três ESTs que parecem corresponder a diferentes genes codificando guanilato ciclases em *B. emersonii*. As três ESTs apresentaram o mesmo perfil transcricional, com níveis aumentados a partir dos 60 minutos da esporulação e atingindo um pico de expressão aos 150 minutos. Esses dados de expressão corroboram aqueles obtidos por Silverman and Epstein (1975) para

os níveis de cGMP. Segundo os autores, entre 60-150 minutos após a indução da esporulação, antes da citocinese e da liberação dos zoósporos, os níveis de cGMP aumentam cerca de 100 vezes, sugerindo que esse nucleotídeo cíclico tem um papel crucial na formação dos zoósporos de *B. emersonii*. Os resultados de microarranjos mostram que os três transcritos também têm seus níveis de expressão aumentados entre 60-150 minutos após a indução da esporulação, porém com intensidades de indução aparentemente diferentes. O perfil de expressão dos três genes putativos de guanilato ciclases obtidos por experimentos de microarranjos foram validados por RT-PCR quantitativo em tempo real, confirmando assim os perfis anteriormente obtidos (Figura 15).

A expressão de genes envolvidos em diferentes vias de transdução de sinal durante a esporulação reflete a complexidade bioquímica que assegura a formação sincronizada dos zoósporos de *B. emersonii*.

#### **4.3.7. Outros genes**

O perfil de expressão apresentado pelo gene que codifica a enzima quitina sintase, obtido nos experimentos de microarranjo, corrobora trabalhos anteriores que descreveram a biossíntese de quitina bem como a presença da enzima quitina sintase em diferentes estágios do ciclo de vida de *B. emersonii* (Camargo *et al.*, 1967; Hohn *et al.*, 1984). De acordo com os resultados do presente trabalho, os níveis do mRNA da quitina sintase aumentam a partir dos 60 minutos após a indução da esporulação, alcançando níveis máximos aos 150 minutos, enquanto que os níveis do transcrito da quitinase, enzima que degrada quitina, começam a diminuir após a indução da esporulação, alcançando níveis mínimos aos 150 minutos (Figura 9, grupos 6 e 1, respectivamente). De fato, a enzima quitina sintase está presente nos zoósporos como mostrado por

Camargo *et al.* (1967). A enzima fica armazenada em estruturas denominadas partículas  $\gamma$ , as quais se fundem com a membrana de célula e liberam a enzima nos estágios iniciais da germinação, permitindo assim a síntese de uma fina parede de quitina no estágio de esferócito. Dessa forma, a síntese da quitina sintase nos estágios finais da esporulação explica porque os níveis dos transcritos que codificam tal enzima aumentam durante a esporulação enquanto os níveis do mensageiro da quitinase diminuem ao longo da mesma fase.

Outra categoria funcional representada entre os genes induzidos em pelo menos um ponto estudado da esporulação foi a biossíntese e organização do cromossomo (Figura 9, grupo 2). Essa categoria funcional está representada basicamente por genes de histonas incluindo as histonas H3, H2A e H4, bem como o gene das enzimas histona acetiltransferase e histona deacetilase. Esses dados são corroborados por aqueles obtidos por Ribichich *et al.* (2005), através do sequenciamento de ESTs de diferentes fases do desenvolvimento de *B. emersonii*, que mostraram uma maior abundância de transcritos de histonas em zoósporos. Resultados recentes do nosso laboratório (Salem-Izacc *et al.* 2009) obtidos em experimentos de microarranjos revelaram que os níveis dos transcritos que codificam histonas, incluindo aquele que codifica uma histona deacetilase putativa, estão de fato elevados em zoósporos, mas diminuem consideravelmente ao longo da geminação. Histona acetiltransferase e histona deacetilase catalisam a adição e a remoção de grupos acetil nas histonas, resultando na ativação e inibição da transcrição gênica, respectivamente. A presença desses transcritos em zoósporos, bem como das proteínas e enzimas por eles codificadas (histonas, histonas acetiltransferase e deacetilase) contribui para explicar a inibição da transcrição e replicação observadas nos zoósporos. Vale ainda ressaltar que, as análises feitas por Salem-Izacc *et al.* (2009) mostraram que apenas os transcritos das histonas e da enzima histona deacetilase sofrem

redução em seus níveis ao longo da germinação, coincidindo com o desbloqueio da transcrição e replicação, não sendo possível observar redução nos níveis do mensageiro da enzima histona acetiltransferase. É possível que os transcritos dessa enzima, produzidos ao longo da esporulação, estejam armazenados nos zoósporos sob regulação pós-transcricional e, à mediada que os níveis de mRNA da histona desacetilase caem durante a germinação (Salem-Izacc *et al.*, 2009), os transcritos da histona acetiltransferase são traduzidos, o que resulta no desbloqueio da transcrição e da replicação observados na geminação.

#### **4.3.8. Análise comparativa do perfil transcricional dos genes diferencialmente expressos na esporulação e na germinação de *B. emersonii***

Com o objetivo de obter uma visualização global da expressão gênica ao longo das duas fases de desenvolvimento de *B. emersonii*, os perfis transcricionais dos genes diferencialmente expressos durante a esporulação obtidos neste trabalho foram comparados com aqueles descritos recentemente durante a fase de germinação do fungo (Salem-Izacc *et al.*, 2009). Um total de 530 genes classificados como diferencialmente expressos neste trabalho (de um total de 1207) foram também descritos como diferencialmente expressos durante a germinação (de um total de 924). A análise mostrou, entretanto, que o padrão de expressão gênica da maioria dos genes altera-se profundamente entre as duas fases de desenvolvimento do fungo, o que indica não apenas a existência de uma forte regulação transcricional ao longo do ciclo de vida do fungo, mas também a necessidade de diferentes funções moleculares nas fases de esporulação e germinação. A tabela a seguir mostra as categorias funcionais mais representadas na análise, e informa também o padrão de expressão dos genes pertencentes a tais categorias.

Tabela 4: Categorias funcionais mais representadas entre os genes diferencialmente regulados na esporulação e germinação de *B. emersonii*.

<b>Categoria funcional</b>	<b>Esporulação</b>	<b>Germinação</b>
Biossíntese de proteína	Genes Reprimidos	Genes Induzidos
Metabolismo energético	Genes Reprimidos	Genes Induzidos
Organização do cromossomo	Genes Induzidos	Genes Reprimidos
Tráfego de vesículas	Genes Induzidos	Genes Reprimidos

### **Biossíntese de proteínas**

Vários genes envolvidos na biossíntese de proteínas (aproximadamente 50) são reprimidos ao longo da esporulação e induzidos durante a germinação. Dentre esses genes estão aqueles que codificam diferentes proteínas ribossomais, fatores de alongação da tradução, aminoacil-tRNA sintetases e fatores de iniciação da transcrição. Esses dados sugerem que a taxa de síntese de proteínas é maior durante a fase de germinação. Nessa fase do desenvolvimento, a qual ocorre em meio nutriente, o zoósporo retrai o flagelo, perde os microtúbulos citoplasmáticos, inicia a síntese da parede de quitina e aumenta consideravelmente o tamanho celular, o que de fato requer que a maquinaria de síntese protéica esteja ativa. Já durante a esporulação, a qual ocorre na ausência de nutrientes, a célula cessa o crescimento exponencial, dá origem a um septo basal, a uma papila de descarga e inicia a diferenciação dos zoósporos. Dado que a síntese protéica é um evento energeticamente dispendioso, nossos resultados indicam que a esporulação, embora não menos complexa do que a germinação, reduz a taxa de síntese protéica. Sendo assim, é possível que a regulação a nível transcricional da síntese de proteína observada nas diferentes fases do desenvolvimento de *B. emersonii* seja um reflexo das disponibilidades energéticas em que ocorrem a esporulação e germinação.

## **Metabolismo energético**

De fato, a expressão de genes envolvidos com o metabolismo energético (20 ESTs) é diferencialmente regulada ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*. Durante a germinação genes da glicólise (fosfoglicose isomerase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase, piruvato desidrogenase), ciclo do ácido cítrico (citrato sintase, isocitrato desidrogenase, succinil-CoA sintetase) e cadeia respiratória (NADH-ubiquinona oxidorreductase, subunidades da ATP sintase) e até mesmo um transportador de hexose (HTX14) são reprimidos na esporulação e induzidos na germinação. Também foi possível observar genes que codificam diferentes proteínas de membrana mitocondrial indiretamente envolvidas ou não com o metabolismo energético, tais como ADP/ATP translocases, proteína acídica mitocondrial, porina mitocondrial e uma translocase que auxilia no processo de importação e inserção de proteínas da membrana mitocondrial, funcionando como uma chaperone molecular.

## **Organização do cromossomo**

Genes que codificam proteínas envolvidas na organização da estrutura do cromossomo (8 ESTs), tais como as histonas, apresentam forte regulação ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*. Esses genes começam a ser induzidos durante a esporulação e alcançam níveis máximos de expressão nos zoósporos, onde provavelmente podem exercer um papel importante no bloqueio da replicação e da transcrição, as quais estão fortemente inibidas nessas células. Durante a germinação, a expressão desses genes reduz fortemente, o que provavelmente permite o aumento nas taxas de transcrição e replicação do DNA. Em *C. neoformans* e *P. brasiliensis*, os genes que codificam as histonas são reprimidos durante a transição dimórfica, resultando em alterações significativas no transcriptoma desses fungos (Nunes *et al.*, 2005; Steen *et*

al., 2002). É interessante notar também o perfil de expressão da enzima nucleosídeo difosfato quinase, o qual é reprimido na esporulação e fortemente induzido na germinação. Dado que essa enzima está envolvida na síntese de nucleosídeos trifosfatados, é provável que o perfil transcricional observado seja um reflexo das taxas de transcrição e tradução ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*.

### **Citoesqueleto e tráfico de vesículas**

A transcrição de genes envolvidos com o citoesqueleto de actina e o transporte de membranas e vesículas revestidas por clatrina (5 ESTs) foi diferencialmente regulada entre as duas fases do desenvolvimento de *B. emersonii*, sendo induzida na esporulação e reprimida na germinação. Dentre esses genes estão aqueles que codificam as proteínas actina, profilina, intersectina 1, proteínas de ligação a actina e proteínas de ligação a clatrina. De fato, durante a fase de esporulação há um intenso tráfico de vesículas que garantem a diferenciação e liberação dos zoósporos. Durante a formação da papila de descarga, várias vesículas secretoras, contendo possivelmente quitinases e glucanases, convergem para a região onde a mesma será formada, desaparecendo posteriormente (Lovett, 1975). Em eventos mais tardios da esporulação, os quais envolvem a diferenciação dos zoósporos, tais como a formação do flagelo e a clivagem citoplasmática, várias vesículas também são cruciais para a montagem do flagelo e para definir os planos de clivagem. Durante a formação do flagelo, vesículas denominadas “primary flagella vesicles” fundem-se com outras, denominadas “secondary vesicles”, formando uma vesícula tubular, a qual envolve o axonema flagelar em crescimento (Lovett, 1975). Fusões progressivas das vesículas de clivagem também formam uma rede tridimensional de planos de clivagem delimitando uma área ao redor de cada núcleo, denominada pré-esporo (Lovett, 1975). Em vista disso, o perfil de expressão

transcricional observado para os genes envolvidos com o citoesqueleto e o tráfego de vesículas parece refletir uma maior necessidade de tais funções durante a diferenciação dos zoósporos (fase de esporulação).

### **Outro genes**

É interessante notar o perfil de expressão de alguns genes que não foram agrupados em uma categoria funcional, mas que são diferencialmente regulados ao longo do desenvolvimento, como é o caso dos genes que codificam a fosfatase calcineurina, subunidades da proteína G e a enzima quitina sintase

A enzima calcineurina é uma serina/treonina fosfatase dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina. Em muitas espécies de fungos essa enzima está envolvida em processos de adaptação a estresses ambientais, crescimento, morfogênese e patogenicidade (Stie and Fox, 2008). Por exemplo, recentemente, Campos *et al.* (2008) apresentaram evidências da participação da calcineurina na morfogênese e homeostase de íons  $\text{Ca}^{2+}$  durante o dimorfismo (hifa-levedura) do fungo *Paracoccidioides brasiliensis*. Os níveis dos transcritos dessa enzima aumentam durante a esporulação e reduzem ao longo da germinação de *B. emersonii*. É interessante notar que o perfil obtido nos dados de microarranjo para a enzima calcineurina é o mesmo descrito por Simão & Gomes (2001) para a enzima calmodulina, utilizando experimentos de northern blot e western blot. Além disso, o perfil transcricional da calcineurina coincide com o fluxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  durante as duas fases do desenvolvimento de *B. emersonii*, onde na esporulação há um influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  (Coutinho & Correa, 1999; figura 25) e na germinação um efluxo desse íon (Gomes *et al.*, 1980). Sendo assim, esses dados sugerem que calcineurina desempenha um importante papel durante a diferenciação dos zoósporos de *B. emersonii*.

Dentre os genes que apresentaram regulação diferencial ao longo das duas fases de desenvolvimento de *B. emersonii* destacam-se aqueles que codificam a subunidade  $\alpha$  da proteína G heterotrimérica e a subunidade catalítica da proteína quinase dependente de cAMP, os quais foram induzidos na esporulação e reprimidos na germinação. Evidências sugerem a participação da proteína G (Terenzi and Maia, 1993) e das enzimas adenilato ciclase (AC), fosfodiesterase de cAMP e proteína quinase dependente de cAMP (PKA) no processo de indução da germinação de *B. emersonii*, uma vez que tais enzimas apresentam atividade máxima nos zoósporos (Juliani *et al.*, 1979; Marques Mdo *et al.*, 1989; Marques Mdo and Gomes, 1992). Sendo assim, nossos dados sugerem que essas proteínas são sintetizadas na esporulação e armazenadas nos zoósporos, onde parecem ter um papel fundamental na transmissão de sinais que culminam com a germinação dos zoósporos.

O perfil de expressão da enzima quitina sintase (Chs3), enzima necessária para a síntese da parede celular de *B. emersonii*, aumenta durante a esporulação e reduz ao longo da germinação. Por outro lado, a expressão do mensageiro que codifica a enzima quitinase, responsável pela degradação da quitina, diminui ao longo da esporulação e aumenta no final da germinação. Dado que a síntese da parede acontece nos primeiros 10-15 minutos da germinação na ausência de transcrição e tradução, o perfil transcricional da quitina sintase corrobora resultados anteriormente obtidos, os quais sugeriram que a enzima quitina sintase é produzida durante a esporulação e armazenada nos zoósporos sob controle pós-traducional (Maia, 1994).

## Seqüências sem identificação putativa

Vários genes sem identificação putativa mostraram-se fortemente regulados ao longo do ciclo de vida de *B. emersonii*. Muitos deles são reprimidos durante a esporulação e induzidos na germinação, outros são induzidos sobretudo na fase tardia da esporulação (120-150 minutos) apresentando altos níveis nos zoósporos e reprimidos ao longo da germinação. Esses dados não apenas reforçam a tese de que vários genes são induzidos em fases específicas do desenvolvimento de *B. emersonii* mas também indica que muitos genes ainda sem identificação putativa podem desempenhar um papel importante no desenvolvimento de *B. emersonii*.

A tabela 5 mostra as ESTs reveladas na análise comparativa entre as duas fases de diferenciação. As seqüências com identificação putativa (SwissProt) e aquelas sem identificação (no match) foram reunidas em seis agrupamentos cada, utilizando o algoritmo *K-means*. O perfil de expressão de cada gene pode ser visualizado no “heat map” à esquerda da tabela, onde as cores verde, vermelha e preta indicam diminuição, aumento e não variação nos níveis do transcrito, respectivamente. No mapa de expressão (“heat map”), E0, E60, E120 e E150 correspondem aos tempos de 0, 60, 120 e 150 minutos da fase de esporulação, respectivamente. ZSP corresponde a zoósporo e, G30, G60 e G90 correspondem aos tempos de 30, 60 e 90 minutos da fase de germinação, respectivamente. Na análise dos genes diferencialmente expressos na esporulação RNA de células em E0 foi usado como referência, enquanto na germinação foi utilizado RNA de zoósporos como referência.

Tabela 5: Perfil dos níveis dos transcritos de 530 genes ao longo da esporulação e da germinação.

	E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
										BeG120N12G05	short chain dehydrogenase [Schizosaccharomyces pom	1
										BeE60H30E04-1	RuvB-like 1 (Portin)	1
										BeG60N14G09	Q9XGL4 60S ribosomal protein L31 GO:0005622 GO:000	1
										BeE30N15E11	Q9UVH1 Putative 60S ribosomal protein L27A GO:0005	1
										BeE30N19G03	Q9UVB8 Ribosomal protein L41 GO:0005622 GO:0003735	1
										BeG120N06A04	Q9SIP7 40S ribosomal protein, contains C-terminal	1
										BeE60H29F06	Q9RZ26 GMC oxidoreductase GO:0006118 GO:0016491	1
										BeE90N06B10	Q9RUE8 Probable ABC transporter binding protein DR	1
										BeE60H29G11	Q9P6I2 Glutamate carboxypeptidase-like protein GO:	1
										BeG90N08B05	Q9P602 ATP synthase oligomycin sensitivity conferr	1
										BeG120N20E02	Q9NPE3 Nop10p GO:0005554 GO:0005732 GO:0001522	1
										BeE60H31F10	Q9HCT3 RP42 protein GO:0005554 GO:0000004 GO:00083	1
										BeG90N19A11	Q9D8Q1 3100001N19Rik protein GO:0005622 GO:0003735	1
										BeG90N03F03	Q9C5Z2 Eukaryotic translation initiation factor 3	1
										BeE30N18D06	Q9C474 RNA polymerase II subunit 7 GO:0003723 GO:0	1
										BeG60N12C05	Q9BQ67 Glutamate-rich WD-repeat protein 1 GO:00056	1
										BeG90N02H08	Q9BPV9 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1
										BeE120N28E09	Q9ATF4 Ribosomal protein L33 GO:0005622 GO:0003735	1
										BeE60H28B12	Q96VZ6 Acetolactate synthase Iiv2 GO:0003984 GO:00	1
										BeE60H30F05	Q96C51 Hypothetical protein (Fragment) GO:0006457	1
										BeG60N16E09	Q962R4 Ribosomal protein S15 GO:0005622 GO:0003735	1
										BeG120N08B11	Q94JQ7 At1g07830/F24B9_7 GO:0005622 GO:0003735 GO:	1
										BeG30N18C11	Q91YK6 Hypothetical protein (Fragment) GO:0005622	1
										BeE120N27D10	Q90YT9 Ribosomal protein L28 GO:0005622 GO:0003735	1
										BeG120N04D02	Q90YP9 40S ribosomal protein S25 GO:0003735	1
										BeE60N11F06	Q8X1D0 Isocitrate dehydrogenase (Fragment) GO:0008	1
										BeE30N20C09	Q8TDH2 CLL-associated antigen KW-12 (Fragment) GO:	1
										BeG120N16A06	Q8R0B2 Hypothetical protein (Fragment) GO:0004239	1
										BeZSPN09C01	Q8MUE5 Ribosomal protein S20 GO:0005622 GO:0003735	1
										BeG90N11F01	Q8ISP7 Ribosomal protein L9 GO:0006355 GO:0005622	1
										BeE60C08E01	Q8H727 ADP/ATP translocase GO:0006810 GO:0005743 G	1
										BeG120N24A07	Q8H727 ADP/ATP translocase GO:0006810 GO:0005743 G	1
										BeE30N13B01	Q8GUQ9 60S ribosomal protein L38 GO:0005622 GO:000	1
										BeG90N10D06	Q8C644 Phenylalanine-tRNA synthetase-like GO:00057	1
										BeG120N11G04	Q874N9 Ribosomal protein L37A GO:0005622 GO:000373	1
										BeG90N05A03	Q86QS0 Ribosomal protein L32 GO:0005622 GO:0003735	1
										BeE90N17C02-1	Q83PF0 Putative aldolase yihT GO:0016829	1
										BeE60N17B06	Q801I1 Ribosomal protein L7A (Fragment) GO:0005622	1
										BeE120N28H03	Q7XMJ1 OSJNBb0006N15.8 protein GO:0005622 GO:00037	1
										BeE60C06H06	Q7WWT9 Putative NagM-like protein GO:0005554 GO:00	1
										BeG120N13B09	Q7WDP3 Isovaleryl-CoA dehydrogenase GO:0008470 GO:	1
										BeG120N04E02	Q7SF16 Hypothetical protein GO:0003723 GO:0003743	1
										BeG120N01H09	Q7SEP1 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1
										BeE60H32C06	Q7SD62 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1
										BeE30N02E08	Q7S5S5 Hypothetical protein GO:0016020	1
										BeG60N01F09	Q7S4C6 Hypothetical protein GO:0006865 GO:0006810	1
										BeG30N01A06	Q7RZW8 Hypothetical protein GO:0008017	1
										BeE30N18E04	Q7RYQ5 Hypothetical protein GO:0006418 GO:0004812	1
										BeE30N17H11	Q7RWD9 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1
										BeG90N09F06	Q7RVY8 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1
										BeE30N09B07	Q7RV95 Malate synthase, glyoxysomal GO:0006097 GO:	1
										BeG90N13B05	Q7RV84 40S ribosomal protein S7 GO:0005622 GO:0003	1
										BeG30N12B10	Q7QC42 AqCP1729 (Fragment) GO:0005622 GO:0003735 G	1

Tabela 5: continuação

E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
									BeE60H31G05	Q7Q1H1 AgCP8372 GO:0004245 GO:0006508 GO:0008237 G	1
									BeG90N07B07	Q7Q192 AgCP8591 (Fragment) GO:0004179 GO:0006508	1
									BeG90N18G12	Q7PJE1 ENSANGP0000023979 (Fragment) GO:0005622 GO	1
									BeZSPN12F04	Q03532 Probable ATP-dependent RNA helicase HAS1 GO	1
									BeE60H30A11	Q00216 Putative disulfide isomerase TIGA precursor	1
									BeG90N21A12	putative P-protein: chorismate mutase, prephenate	1
									BeG30N12D10	putative 60s ribosomal protein l6, mitochondrial p	1
									BeNSVP04H08	POP4 (processing of precursor , S. cerevisiae) hom	1
									BeG120N16D10	P87216 Protein vip1 GO:0003723 GO:0003676	1
									BeG120N08C09	P52810 40S ribosomal protein S9 GO:0005622 GO:0003	1
									BeG120N20B09	P51424 60S ribosomal protein L39 GO:0005622 GO:000	1
									BeE60H22D05	P40513 Mitochondrial acidic protein MAM33, mitocho	1
									BeE30N02D11	P34091 60S ribosomal protein L6 GO:0005622 GO:0003	1
									BeE60H29G12	P32368 Recessive suppressor of secretory defect GO	1
									BeE30N13E04	P28748 GTP-binding nuclear protein spi1 GO:0015031	1
									BeG90N09B01	P25388 Guanine nucleotide-binding protein beta sub	1
									BeNSVP11B02	P17735 Tyrosine aminotransferase GO:0016740 GO:000	1
									BeZSPN12H11	P14249 40S ribosomal protein S24 GO:0016742 GO:000	1
									BeG120N03B09	P04643 40S ribosomal protein S11 GO:0005622 GO:000	1
									BeG60N09D05	O94083 Eukaryotic translation initiation factor 5A	1
									BeE30N07G12	O83041 Probable proline iminopeptidase GO:0006725	1
									BeG120N17C05	O74836 60S ribosomal protein L1-B GO:0005622 GO:00	1
									BeG90N21E07	O74491 Putative ATP-dependent RNA helicase C285.03	1
									BeG30N09B07	O74330 40S ribosomal protein S27 GO:0005622 GO:000	1
									BeG90N03H04	O74225 Heat shock protein Hsp88 GO:0003773 GO:0005	1
									BeNSVP10B09	O59905 Pyridoxine biosynthesis protein GO:0005554	1
									BeE30N08D06	O43660 Pleiotropic regulator 1 GO:0000398 GO:00037	1
									BeE60H23E04	O42952 40S ribosomal protein S30 GO:0003735	1
									BeG90N19F06	O42867 60S ribosomal protein L23 GO:0005622 GO:000	1
									BeG90N01C01	O14388 60S ribosomal protein L27-A GO:0005622 GO:0	1
									BeE30N22E01	O14339 60S ribosomal protein L17-A GO:0005622 GO:0	1
									BeG60N20C02	O13672 60S ribosomal protein L8 GO:0003735 GO:0005	1
									BeZSPN12B03	O13614 40S ribosomal protein S10-B GO:0003735	1
									BeE30N09G11	O13580 Manganese resistance 1 protein GO:0016021 G	1
									BeG90N09D02	Q9ZR56 Ribonucleotide reductase GO:0006260 GO:0005	2
									BeE60H31B10	Q9Y8H1 Pcl GO:0016740 GO:0006333 GO:0003964 GO:000	2
									BeG30N06C03	Q9P7N2 Putative clathrin-associated protein GO:000	2
									BeE30N20E04	Q9CPX9 Anaphase promoting complex subunit 11 GO:00	2
									BeE90N04E09	Q9BZE7 Hypothetical protein EVG1 GO:0005554 GO:000	2
									BeE30N06E01	Q9A910 Amino acid permease family protein GO:00068	2
									BeE60N18D07	Q96W50 Protein kinase Pbs2p GO:0016740 GO:0016301	2
									BeE120N04B04	Q95WR8 PXF isoform C GO:0007218 GO:0007242 GO:0005	2
									BeE60N11H03	Q92356 Probable synaptobrevin homolog C6G9.11 GO:0	2
									BeG90N18F10	Q8SZ87 RE13747p GO:0007067 GO:0006118 GO:0005489 G	2
									BeE120N01D10	Q8S9C7 Flavonoid 3'-hydroxylase GO:0006118 GO:0004	2
									BeE120N09C08	Q8P9N1 Cationic amino acid transporter GO:0006865	2
									BeG60N10A05	Q8MRC3 RE14858p GO:0009950	2
									BeE120N36E01	Q88LQ4 Sensor histidine kinase/response regulator	2
									BeE120N18F01	Q86WN6 Phosphodiesterase PDE9A13 GO:0007165 GO:000	2
									BeE120N24G04	Q7Z8T1 Ubiquitin-conjugating enzyme9 GO:0006464 GO	2
									BeE90N07F09	Q7W512 DNA repair protein GO:0006810 GO:0006281 GO	2
									BeE60C36G04	Q7VUM3 Putative integral membrane transport protei	2
									BeE60N07D05	Q7UHD8 Probable D-alanine-D-alanine ligase GO:0016	2
									BeE120N32B08	Q7SF59 Predicted protein GO:0005554 GO:0016020	2

Tabela 5: continuação

E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
									BeZSPN19E08	Q7RZP8 Hypothetical protein GO:0006810 GO:0005743	2
									BeZSPN10H02	Q7RW00 Hypothetical protein GO:0006118 GO:0016491	2
									BeE60N18D05	Q7RVR4 Hypothetical protein GO:0016301 GO:0006468	2
									BeE120N30H05	Q7RV08 Hypothetical protein GO:0006527 GO:0004053	2
									BeE120N08E05	Q7QGP3 AgCP10431 GO:0008757	2
									BeE60H26C05	Q7PY52 AgCP12010 (Fragment) GO:0016020	2
									BeZSPN12E10	Q7PRI8 ENSANGP00000016126 (Fragment) GO:0006857 GO	2
									BeZSPN10C02	Q62896 BET1 homolog GO:0015031 GO:0006886 GO:00068	2
									BeG90N17G03	Q27532 W05B10.1 protein GO:0007001 GO:0003677 GO:0	2
									BeG90N09B12	Q27124 Ribonucleotide reductase small subunit GO:00	2
									BeE30N03A06	Q16550 Transcription initiation protein SPT4 homol	2
									BeG60N08F12	Q12049 YPR045C protein GO:0005634	2
									BeZSPN18C06	proteophosphoglycan [Leishmania major]	2
									BeE30N06D01	P40206 Hypothetical 24.7 kDa protein in POM152-REC	2
									BeE120N38D09	P38263 Vacuolar import and degradation protein VID	2
									BeE60N03A06	P32561 Histone deacetylase RPD3 GO:0006355 GO:0006	2
									BeE30N10C10	P26354 TATA-box binding protein GO:0006355 GO:0003	2
									BeE60H30C05	P25349 Hypothetical 26.4 kDa protein in CDC10-CIT2	2
									BeE60N18G11	O94417 Cell cycle control protein cwf26 GO:000398	2
									BeZSPN14D10	O93787 Chs3 GO:0016758	2
									BeE60H30F11	O74341 T-complex protein 1, gamma subunit GO:00064	2
									BeE30N02B01	O04974 2-isopropylmalate synthase B GO:0016740 GO:	2
									BeG120N26D12	Q9Y8G5 NAD-specific glutamate dehydrogenase GO:000	3
									BeE30N02F10	Q9VDV2 CG6195 protein GO:0005525	3
									BeG90N18F12	Q9SA73 T5I8.3 protein GO:0005554 GO:0005525	3
									BeG120N13E04	Q9HGT6 Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic GO:00064	3
									BeG90N05A04	Q96TJ5 60S acidic ribosomal protein P0 GO:0005622	3
									BeG90N11A02	Q90WD9 Glyceraldhyde 3-phosphate dehydrogenase GO	3
									BeG90N18E08	Q8X097 Probable ATP-citrate synthase subunit 1 GO:	3
									BeG90N01D10	Q8WZW8 Probable YHM1 GO:0006810 GO:0005488 GO:0016	3
									BeG120N12G04	Q8TFN0 Nucleoside diphosphate kinase GO:0016740 GO	3
									BeG120N09C02	Q8NII8 Nuclease Le3 GO:0004519 GO:0003676 GO:00063	3
									BeZSPN01B08	Q8ISP4 Ribosomal protein S12 GO:0005622 GO:0003735	3
									BeG90N02H02	Q871M5 Probable nucleosome assembly protein I GO:0	3
									BeE30N06H12	Q86AU7 Similar to Gallus gallus GO:0006857 GO:0005	3
									BeG90N07C02	Q84KQ4 Elongation factor-1 alpha (Fragment) GO:0008	3
									BeNSVP07H09	Q84KQ4 Elongation factor-1 alpha (Fragment) GO:0008	3
									BeE60N10F07	Q7ZWR6 Similar to ATP synthase, H+ transporting mi	3
									BeG60N06H10	Q7ZVY5 Similar to citrate synthase GO:0004108 GO:0	3
									BeG120N22G10	Q7S5F0 Hypothetical protein GO:0006810 GO:0005215	3
									BeE60H21G01	Q7PMI7 ENSANGP000000021048 (Fragment) GO:0004411 GO	3
									BeG90N21A07	Q26481 60S ribosomal protein L5 GO:0008097 GO:0005	3
									BeE60H30F10	Q10481 Mitochondrial import inner membrane translo	3
									BeG30N02D12	Q08601 Chromosome XV reading frame ORF YOR197W GO:	3
									BeE30N10D02	Q06593 Similar to S. CEREVISIAE hypothetical prote	3
									BeG120N22D07	Q05506 Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic GO:000	3
									BeG90N13C04	phosphoglucose isomerase [Aspergillus niger]	3
									BeE60H15C05	P87144 Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic GO:00	3
									BeE30N15A04	P79083 Eukaryotic translation initiation factor 3	3
									BeG60N06G05	P79078 Delta-9 fatty acid desaturase GO:0005506 GO	3
									BeG90N16C06	P42833 Hexose transporter HXT 14 GO:0006810 GO:0016	3
									BeE30N17A03	P40897 Hypothetical 91.6 kDa protein in HXT8-CRT1	3
									BeZSPN17C11	P39958 Secretory pathway GDP dissociation inhibito	3
									BeG120N02B04	P32469 Diphthine synthase GO:0016740 GO:0008152 GO	3

Tabela 5: continuação

E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
									BeG120N17E03	P32324 Elongation factor 2 GO:0008547 GO:0006414 G	3
									BeG90N19F12	P29691 Elongation factor 2 GO:0008547 GO:0006414 G	3
									BeE60N13C09	P07144 Outer mitochondrial membrane protein porin	3
									BeG90N10B10	P02992 Elongation factor Tu, mitochondrial precurs	3
									BeE60H32E04	O42993 FK506-binding protein GO:0003755 GO:0016853	3
									BeG60N08E04	O42468 PP2A inhibitor GO:0003677 GO:0006334 GO:000	3
									BeG120N23E01	O13302 Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, m	3
									BeE60H31D07	Q9USR1 Thioredoxin-like protein GO:0006118 GO:0005	4
									BeG120N07E03	Q9P8H0 Rph1 GO:0005622 GO:0008565 GO:0006606 GO:00	4
									BeE30N08D02	Q9P7F8 Putative arsenite-translocating ATPase GO:0	4
									BeE60N03H02	Q9NAR5 Eukaryotic translation initiation factor 2	4
									BeE120N37H01	Q9MZG9 Polyprotein (Fragment) GO:0004252 GO:000650	4
									BeE30N09G01	Q9M4C4 Probable proforelin subunit 4 GO:0003754	4
									BeE120N25H03	Q9LKK9 14-3-3 protein GO:0019904	4
									BeG120N09D05	Q9LKK9 14-3-3 protein GO:0019904	4
									BeE30N07B02	Q9H FY6 Calmodulin GO:0005509	4
									BeG120N23E11	Q99L23 Similar to NADH dehydrogenase (Fragment) GO	4
									BeE60N03E07	Q99JZ6 Hypothetical protein GO:0007018 GO:0005874	4
									BeG120N23B05	Q99832 T-complex protein 1, eta subunit GO:0006457	4
									BeG30N15D05	Q8Y2Q8 Probable carbonic anhydrase protein GO:0008	4
									BeE60H04D06	Q8L9U0 Codaurine N-methyltransferase GO:0016740 G	4
									BeE30N22D03	Q86ZV7 Succinyl-CoA synthetase alpha subunit GO:00	4
									BeG60N01B06	Q84P58 Adenosine kinase-like protein (Fragment) GO	4
									BeE60N07C12	Q7ZWF5 Similar to glutamate oxaloacetate transamin	4
									BeE60C24C07	Q7ZA53 FK506-binding protein FKBP12 GO:0006457	4
									BeE30N05E04	Q7Z940 Succinyl-CoA synthetase, beta subunit GO:00	4
									BeE60H11C04	Q7YXM3 Thioredoxin peroxidase GO:0004601	4
									BeE60N02F01	Q7SEL5 Hypothetical protein GO:0008152 GO:0016779	4
									BeG90N10E12	Q7SEL5 Hypothetical protein GO:0008152 GO:0016779	4
									BeE60N03F03	Q7S0B7 Hypothetical protein GO:0016051 GO:0008152	4
									BeG60N05A06	Q7PSD1 ENSANGP00000016179 GO:0005525	4
									BeE60H29B11	Q7PM28 ENSANGP00000025012 GO:0005739 GO:0006754	4
									BeE60H26H05	Q09747 Putative ATP-dependent RNA helicase C12C2.0	4
									BeG90N05E08	Q09171 Pyruvate dehydrogenase E1 component beta su	4
									BeE30N02B11	Q03529 Inositolphosphorylceramide-B C-26 hydroxyla	4
									BeG90N16G12	Q01475 GTP-binding protein sar1 GO:0015031 GO:0006	4
									BeE60H29E07	Q01137 Superoxide dismutase [Cu-Zn] GO:0004785 GO:	4
									BeNSVP07B10	proton glutamate symport protein [Bradyrhizobium j	4
									BeE120N01E11	P58466 Carboxy-terminal domain RNA polymerase II p	4
									BeG120N16E05	P43098 Fatty acid synthase subunit alpha GO:001674	4
									BeE60H14B07	P41887 Heat shock protein 90 homolog GO:0006457 GO	4
									BeE60N10A01	P38264 Inorganic phosphate transporter PHO88 GO:00	4
									BeE30N03D10	P25007 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GO:0003	4
									BeE30N22B03	P21976 NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.8 kDa sub	4
									BeE30N16B09	O77622 T-complex protein 1, zeta subunit GO:000645	4
									BeE60H03F06	O74507 Hypothetical protein GO:0016021	4
									BeE60H30E02	O60953 Proteasome subunit GO:0016787 GO:0005839 GO	4
									BeE60C19C09	O14095 Hypothetical protein C2F3.12c in chromosome	4
									BeZSPN05A11	Q9QXA6 B(0,+)-type amino acid transporter 1 GO:000	5
									BeZSPN04C10	Q9P7L5 Probable ornithine aminotransferase GO:0016	5
									BeE30N02C10	Q9HDN1 Histone H3 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	5
									BeZSPN03D06	Q9HDN1 Histone H3 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	5
									BeG30N08E03	Q96VN6 Phosphate transporter (Fragment) GO:0006810	5
									BeG30N11C03	Q942T3 Putative receptor protein kinase GO:0016740	5

Tabela 5: continuação

	E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
										BeZSPN16H11	Q8W0J2 Hypothetical protein GO:0016020	5
										BeE60H21G09	Q8RBT1 Amino acid transporters GO:0006865 GO:00068	5
										BeZSPN11B02	Q8NIQ8 Histone H4 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	5
										BeZSPN15E12	Q8BNT3 Hypothetical protein GO:0030089	5
										BeG90N19E11	Q871N5 Probable uracil phosphoribosyltransferase F	5
										BeE30N14D03	Q7ZUY3 Hypothetical protein GO:0007001 GO:0003677	5
										BeG90N18H02	Q7Z8T1 Ubiquitin-conjugating enzyme9 GO:0006464 GO	5
										BeG30N04H11	Q7Z8B6 H(+)-ATPase GO:0015662 GO:0008553 GO:000815	5
										BeZSPN02C05	Q7SFI0 Hypothetical protein GO:0004176 GO:0005524	5
										BeG120N03B03	Q7S4N5 Hypothetical protein GO:0006508 GO:0030693	5
										BeG30N07G09	Q7N34 Gil2350 protein GO:0006865 GO:0006810 GO:00	5
										BeZSPN16F12	Q12317 Chromosome XV reading frame ORF YOL112W GO:	5
										BeE60H06B09	Q07135 Histone H2A, orphan GO:0007001 GO:0003677 G	5
										BeE90N19F09	PREDICTED: similar to MEGF11 protein [Gallus gallu	5
										BeG30N09H07	P52493 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa GO:0	5
										BeG30N07A07	P46378 Hypothetical 21.1 kDa protein in fasciation	5
										BeE60C17C02	P38356 Metal homeostatis protein BSD2 GO:0016021 G	5
										BeZSPN16H02	P10869 Aspartokinase GO:0016740 GO:0008152 GO:0004	5
										BeE60N03D06	O15819 Histone H3 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	5
										BeE30N06H07	O14224 Rho gdp dissociation inhibitor GO:0005094 G	5
										BeZSPN17H06	O06479 YFNA protein GO:0006865 GO:0006810 GO:00052	5
										BeE60N12E11	Q9NY68 CTL2 protein GO:0016021 GO:0015871 GO:00152	6
										BeE120N28E07	Q9HFN1 G protein alpha subunit (Fragment) GO:00071	6
										BeE60N03C06	Q9HDE1 Calcineurin B regulatory subunit GO:0005509	6
										BeE120N38E10	Q9D5P6 4930403C08Rik protein GO:0005509	6
										BeG30N03G06	Q9C0R0 (AF343071) TIM23 GO:0015031 GO:0005744 GO:0	6
										BeE120N28C07	Q8KU53 EF0108 GO:0016810 GO:0005975	6
										BeG60N08H03	Q8J0B8 G protein alpha subunit GO:0007186 GO:00048	6
										BeE120N36H09	Q8EXG1 Conserved hypothetical protein GO:0005975 G	6
										BeE120N01E04	Q80W96 HesB protein GO:0005554	6
										BeE60H15H11	Q7SGN0 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003779	6
										BeE120N35H01	Q7SAQ1 Hypothetical protein GO:0006886 GO:0030125	6
										BeE60C01E02	Q7S2J5 Hypothetical protein GO:0005524 GO:0008233	6
										BeE120N36B05	Q7QK56 AgCP14714 GO:0006468 GO:0004672 GO:0005524	6
										BeZSPN16D09	Q12741 cAMP-dependent protein kinase catalytic sub	6
										BeE120N28D07	P40581 Glutathione peroxidase 3 GO:0005622 GO:0004	6
										BeE60N07E08	P40581 Glutathione peroxidase 3 GO:0005622 GO:0004	6
										BeE60N16D02	P34046 Guanine nucleotide-binding protein alpha-8	6
										BeE60N04B11	P26587 Aquaporin TIP3.1 GO:0006810 GO:0006355 GO:0	6
										BeE60N10E10	P19984 Profilin II GO:0015629 GO:0007010 GO:000585	6
										BeE60H28B01	P10989 Actin GO:0015629 GO:0005884 GO:0005200 GO:0	6
										BeE120N32H02	Q93787 Chs3 GO:0016758	6
										BeE60H27E01	Q93787 Chs3 GO:0016758	6

Tabela 5: continuação

	E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
										BeE120N01C01	No match	1
										BeE120N02A03	No match	1
										BeE120N02D06	No match	1
										BeE120N03E07	No match	1
										BeE120N08D02	No match	1
										BeE120N08G03	No match	1
										BeE120N18F03	No match	1
										BeE120N20C04	No match	1
										BeE120N20G09	No match	1
										BeE120N28A06	No match	1
										BeE120N31H05	No match	1
										BeE120N32C02	No match	1
										BeE120N36A09	No match	1
										BeE120N37D03	No match	1
										BeE120N37H05	No match	1
										BeE120N38F05	No match	1
										BeE120N38H05	No match	1
										BeE30N07H02	No match	1
										BeE60C24E07	No match	1
										BeE60H05F08	No match	1
										BeE60H08F08	No match	1
										BeE60H26D11	No match	1
										BeE60H27A04	No match	1
										BeE60H31A03	No match	1
										BeE60N02F10	No match	1
										BeE60N05B05	No match	1
										BeE60N06B11	No match	1
										BeE60N08B09	No match	1
										BeE60N13H06	No match	1
										BeE90N12F11	No match	1
										BeG120N10C05	No match	1
										BeG120N25C09	No match	1
										BeG30N05H08	No match	1
										BeG30N07F06	No match	1
										BeG30N14D05	No match	1
										BeG30N18A09	No match	1
										BeG60N07B05	No match	1
										BeG60N07F02	No match	1
										BeG60N12B02	No match	1
										BeG60N17B09	No match	1
										BeG90N08D08	No match	1
										BeG90N11B09	No match	1
										BeG90N11E11	No match	1
										BeZSPN01D09	No match	1
										BeZSPN02G03	No match	1
										BeZSPN06C12	No match	1
										BeZSPN09G01	No match	1
										BeZSPN10C07	No match	1
										BeZSPN10F01	No match	1
										BeZSPN12A12	No match	1
										BeZSPN12E04	No match	1
										BeZSPN12E12	No match	1
										BeZSPN13H07	No match	1

Tabela 5: continuação

E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
									BeZSPN14H11	No match	1
									BeZSPN15C09	No match	1
									BeZSPN16E03	No match	1
									BeZSPN16E05	No match	1
									BeZSPN18D01	No match	1
									BeZSPN18D04	No match	1
									BeZSPN19A07	No match	1
									BeZSPN19D01	No match	1
									BeE120N09C11	No match	1
									BeE120N25B05	No match	1
									BeE120N28H09	No match	1
									BeE120N30G07	No match	1
									BeE120N37B08	No match	1
									BeE90N16F09	No match	1
									BeG30N05B01	No match	1
									BeG30N07D01	No match	1
									BeG60N03A04	No match	1
									BeE120N07G01	No match	1
									BeE60N18C04	No match	1
									BeE90N25F01	No match	1
									BeG30N14D11	No match	1
									BeG60N05H09	No match	1
									BeG90N20B02	No match	1
									BeZSPN09E12	No match	1
									BeZSPN09F02	No match	1
									BeZSPN13E03	No match	1
									BeZSPN14D03	No match	1
									BeZSPN17F02	No match	1
									BeZSPN19A04	No match	1
									BeZSPN19C12	No match	1
									BeZSPN08E05	No match	1
									BeE120N01C06	No match	2
									BeE30N02C02	No match	2
									BeE30N03B08	No match	2
									BeE60H26C07	No match	2
									BeE60N16B07	No match	2
									BeG30N08E06	No match	2
									BeG30N12E02	No match	2
									BeG30N17B05	No match	2
									BeG60N10B01	No match	2
									BeG90N18G03	No match	2
									BeZSPN02C10	No match	2
									BeZSPN07A05	No match	2
									BeZSPN11G07	No match	2
									BeZSPN13A01	No match	2
									BeZSPN13F01	No match	2
									BeZSPN15A06	No match	2
									BeZSPN15C07	No match	2
									BeZSPN15D04	No match	2
									BeZSPN15F06	No match	2
									BeZSPN16H09	No match	2
									BeZSPN17B10	No match	2
									BeE120N09G08	No match	2
									BeG60N05B05	No match	2

Tabela 5: continuação

	E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
										BeG90N18G02	No match	2
										BeZSPN15G04	No match	2
										BeG30N06H02	No match	2
										BeZSPN16G12	No match	2
										BeZSPN17B12	No match	2
										BeZSPN18C11	No match	2
										BeZSPN19D07	No match	2
										BeZSPN14H05	No match	2
										BeE120N28B11	No match	3
										BeE60H32E11	No match	3
										BeE60H32H06	No match	3
										BeE60N18B07	No match	3
										BeG30N16C06	No match	3
										BeG30N17E10	No match	3
										BeG60N14D07	No match	3
										BeG90N10E11	No match	3
										BeNSVP09G10	No match	3
										BeZSPN16A12	No match	3
										BeZSPN18A11	No match	3
										BeZSPN19G06	No match	3
										BeE60C05C02	No match	3
										BeG120N09E12	No match	3
										BeG30N01C09	No match	3
										BeG30N14D01	No match	3
										BeG60N14D06	No match	3
										BeG90N17D12	No match	3
										BeZSPN12B09	No match	3
										BeE60H16A10	No match	3
										BeE90N21E03	No match	3
										BeE30N14F05	No match	3
										BeE120N25E05	No match	3
										BeE30N06B11	No match	4
										BeE30N11E08	No match	4
										BeE30N11F03	No match	4
										BeE30N16A03	No match	4
										BeE30N20B03	No match	4
										BeE60C03F10	No match	4
										BeE60H03G06	No match	4
										BeE60H04A08	No match	4
										BeE60H05A12	No match	4
										BeE60H06C04	No match	4
										BeE60H06G05	No match	4
										BeE60H07D11	No match	4
										BeE60H07F03	No match	4
										BeE60H11C06	No match	4
										BeE60H28F09	No match	4
										BeE60H29E08	No match	4
										BeE60H30G03	No match	4
										BeE60H32A05	No match	4
										BeE60H32F04	No match	4
										BeE60N05E11	No match	4
										BeE60N06C09	No match	4
										BeE60N13F03	No match	4
										BeE60N16G08	No match	4

Tabela 5: continuação

	E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
										BeE90N11H01	No match	4
										BeG120N11D04	No match	4
										BeG120N18B05	No match	4
										BeG120N22B01	No match	4
										BeG30N02D09-2	No match	4
										BeG30N02F02	No match	4
										BeG30N03F10	No match	4
										BeG30N09G04	No match	4
										BeG30N12E04	No match	4
										BeG30N14B07	No match	4
										BeG30N15A08	No match	4
										BeG60N03E12	No match	4
										BeG60N04H08	No match	4
										BeG60N14E04	No match	4
										BeG60N18G09	No match	4
										BeG90N01C12	No match	4
										BeG90N07C04	No match	4
										BeG90N10H02	No match	4
										BeG90N20G03	No match	4
										BeNSVP02H10	No match	4
										BeNSVP04A06	No match	4
										BeNSVP04E05	No match	4
										BeNSVP04F11	No match	4
										BeNSVP09B02	No match	4
										BeNSVP05E03	No match	4
										BeE120N07D01	No match	4
										BeE60C04F02	No match	4
										BeE60N13D02	No match	4
										BeG120N19F03	No match	4
										BeG90N01F12	No match	4
										BeNSVP04E09	No match	4
										BeE30N13A06	No match	4
										BeE30N14E03	No match	4
										BeE30N15B02	No match	4
										BeE30N18G10	No match	4
										BeE60C24F01	No match	4
										BeE60H09C09	No match	4
										BeE60H09C11-1	No match	4
										BeE60H12F03	No match	4
										BeE60H15D02	No match	4
										BeE60H30A10	No match	4
										BeE60H31F05	No match	4
										BeE60H32B03	No match	4
										BeE60N10H11	No match	4
										BeE90N08B10	No match	4
										BeE90N22H04	No match	4
										BeE90N25C12	No match	4
										BeE90N26C08	No match	4
										BeG120N12C07	No match	4
										BeG30N07F02	No match	4
										BeG30N07H02	No match	4
										BeG30N09H02	No match	4
										BeG30N10A11	No match	4
										BeG30N10B04	No match	4

Tabela 5: continuação

	E0	E60	E120	E150	ZSP	ZSP	G30	G60	G90	ID	SwissProt	Kmeans
										BeG30N10B08	No match	4
										BeG30N10B09	No match	4
										BeG30N10E10	No match	4
										BeG30N10H02	No match	4
										BeG30N11D04	No match	4
										BeG30N11G11	No match	4
										BeG30N12B08	No match	4
										BeG30N12B09	No match	4
										BeG30N12D08	No match	4
										BeG30N12F08	No match	4
										BeG30N12F10	No match	4
										BeG30N12G03	No match	4
										BeG30N12G06	No match	4
										BeG30N12G10	No match	4
										BeG30N12H12	No match	4
										BeG90N01E12	No match	4
										BeG90N05G10	No match	4
										BeG90N07G03	No match	4
										BeG90N10C12	No match	4
										BeG90N12B05	No match	4
										BeG90N13A04	No match	4
										BeG90N13F08	No match	4
										BeG90N21C05	No match	4
										BeG90N21H11	No match	4
										BeG90N22A10	No match	4
										BeG90N22H09	No match	4
										BeNSVP01G12	No match	4
										BeNSVP05B07	No match	4
										BeNSVP07B04	No match	4
										BeNSVP07B06	No match	4
										BeNSVP07F06	No match	4
										BeNSVP11A09	No match	4
										BeNSVP12A11	No match	4
										BeNSVP12B09	No match	4
										BeNSVP12G10	No match	4
										BeZSPN05F06	No match	4
										BeE60N10C01	No match	4
										BeE90N04D11	No match	4
										BeE30N11E09	No match	4
										BeG90N11G02	No match	4
										BeNSVP02C09	No match	4
										BeG120N06C12	No match	4
										BeE30N20D06	No match	5
										BeG120N22B10	No match	5
										BeNSVP07F10	No match	5
										BeE30N18H03	No match	5
										BeE30N20B08	No match	5
										BeG30N11F01	No match	5
										BeG90N16A06-1	No match	5
										BeNSVP12C06	No match	5
										BeG60N19C12	No match	5
										BeE60N19C09	No match	6
										BeG90N03D10	No match	6
										BeZSPN11A12	No match	6
										BeZSPN13C02	No match	6
										BeZSPN15B02	No match	6
										BeE120N38E01	No match	6

Razão de expressão (M)



$$M = \log_2(I_{\text{teste}}/I_{\text{referência}})$$

#### **4.4. Efeito de nutrientes sobre a expressão gênica durante a esporulação de *Blastocladiella emersonii***

A esporulação é um processo importante no ciclo de vida de muitos fungos, a qual se dá em resposta a situações adversas que ocorrem no ambiente em que a célula está se desenvolvendo. Fatores ambientais tais como luz, nutrientes, temperatura e produtos do metabolismo secundário podem desencadear a esporulação ou outro processo (tal como a conidiação, em certos fungos) que cumine com a formação de células de resistência denominadas esporos (Gong *et al.*, 2007), os quais são capazes de sobreviver na ausência de nutrientes até que as condições ambientais voltem a ser favoráveis.

A esporulação em *B. emersonii* pode ser induzida por meio da troca do meio de crescimento (DM4) por uma solução desprovida de nutrientes (solução de esporulação). O efeito de carboidratos e aminoácidos sobre a esporulação foi avaliado por Correa e Lodi (1986) a fim de identificar a influência de diferentes variáveis nutricionais sobre os eventos fenotípicos característicos dessa fase do desenvolvimento de *B. emersonii*, tais como formação do septo basal, aparecimento da papila de descarga, clivagem citoplasmática e liberação dos zoósporos.

##### **4.4.1. Efeito da glicose**

Em 1986, Correa e Lodi estudaram o efeito de diferentes concentrações de glicose sobre as mudanças morfológicas que ocorrem na esporulação de *B. emersonii*. Eles mostraram que, assim como em *Dictyostellium discoideum* (Darmon and Klein, 1978), a glicose não interfere nas mudanças morfológicas iniciais da esporulação, tal como a formação do septo basal. No entanto, nas fases mais adiantadas, observou-se

que o carboidrato em questão provocou um pequeno atraso na formação da papila de descarga e, principalmente, interrompeu a diferenciação dos zoósporos.

Com o objetivo de verificar quais genes poderiam ter seus níveis de expressão perturbados por glicose durante a esporulação de *B. emersonii*, foram realizados ensaios de microarranjos de cDNA utilizando-se RNAs extraídos de células durante o processo de esporulação na presença de 1% de glicose.

De uma maneira geral, o tratamento com glicose (1%) não parece ter provocado mudanças significativas no padrão de expressão gênica durante a esporulação de *B. emersonii*. O perfil de expressão dos genes ao longo da esporulação na presença de glicose 1% mostrou-se muito similar àquele observado para a esporulação em condições padrão (sem glicose). No entanto, além do atraso provocado no processo de esporulação (aproximadamente 30 minutos), os zoósporos formados na presença de glicose pareceram ser mais arredondados e apresentaram pouca mobilidade. Como ilustrado na figura 12, muitos zoósporos produzidos na presença de glicose não possuem flagelo, sugerindo que, de fato, a glicose parece inibir eventos tardios da esporulação de *B. emersonii*.

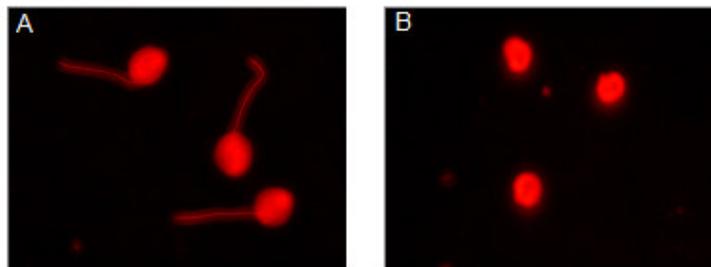


Figura 12: Efeito da glicose (1%) sobre formação de flagelos em zoósporos de *B. emersonii*. A. Zoósporos de esporulação controle. B. Zoósporos de esporulação na presença de glicose (1%).

Embora o tratamento com glicose não tenha provocado profundas modificações na expressão gênica da fase de esporulação, a categoria funcional mais afetada pela presença de glicose foi microtúbulo e citoesqueleto. Como pode ser visto na tabela 6, transcritos que codificam as proteínas miosina, actina, cofilina, dineína e tubulina são superexpressos na presença de glicose principalmente durante a esporulação tardia (120—150 minutos). Esses resultados sugerem que a glicose interfere na expressão de genes do citoesqueleto de uma maneira ainda não conhecida em *B. emersonii*.

Os níveis transcricionais do gene da cofilina aumentaram aproximadamente duas vezes ao longo da esporulação na presença de glicose em relação à esporulação em condições controle (Tabela 6). Cofilina é uma proteína de baixo peso molecular cuja função é modular a atividade da actina. Células de levedura superexpressando o gene da cofilina não são capazes de sobreviver, indicando que a expressão da cofilina precisa ser apropriadamente regulada para que a célula sobreviva (Iida and Yahara, 1999). Uma vez que o citoesqueleto de actina está envolvido em vários processos celulares tais como, mobilidade e divisão, e sabendo que cofilina é a única proteína reguladora da atividade de actina essencial à viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Iida *et al.*, 1993; Moon *et al.*, 1993), *Dictyostelium discoideum* (Aizawa *et al.*, 1995), *Drosophila melanogaster* (Gunsalus *et al.*, 1995) e *Caenorhabditis elegans* (McKim *et al.*, 1994), é possível que o aumento transcricional observado para o gene da cofilina contribua para o bloqueio da esporulação em altas concentrações de glicose, como visto por Correa & Lodi (1986).

O aumento na síntese de proteínas de microtúbulo também é responsável por vários distúrbios do ciclo celular. Em *Aspergillus nidulans*, a síntese aumentada de  $\beta$ -tubulina inibiu o crescimento vegetativo (Waring *et al.*, 1989), e a superexpressão da  $\beta$ -tubulina de classe V de camundongo em células de mamífero produziu forte distúrbio

na organização dos microtúbulos, aumento da fragmentação dos mesmos e a conseqüente redução dos polímeros de microtúbulos na célula. Como conseqüência, essas alterações também perturbaram a montagem do fuso mitótico e o bloqueio da proliferação celular (Bhattacharya and Cabral, 2004). Assim sendo, a superexpressão de diferentes genes de tubulina provocada pela presença de glicose na solução de esporulação (Tabela 6) poderia contribuir para a interrupção da citodiferenciação dos zoósporos.

Genes envolvidos no transporte mediado por vesículas tais como aqueles que codificam diferentes cadeias da proteína dineína também foram superexpressos na presença de glicose (Tabela 6). Dineínas são moléculas motoras que têm importante papel no transporte de organelas bem como na ancoragem da extremidade distal dos microtúbulos ao córtex celular (Koonce *et al.*, 1999). Em leveduras e outros fungos, dineína funciona como uma âncora, servindo para posicionar o fuso e os núcleos, e também para regular o comprimento dos microtúbulos (Carminati and Stearns, 1997; Eshel *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1993; Xiang *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 1999).

Tabela 6: Comparação dos perfis de expressão gênica de células em esporulação na ausência e na presença de glicose 1%.

Clone ID	Anotação	GO	Razão de expressão									
			Esporulação padrão					Esporulação glicose 1%				
			E0	E60	E120	E150	ZSP	E0	E60	E120	E150	ZSP
BeE80N09D06	Vesicle soluble NSF attachment protein	MC	1.00	1.13	2.73	1.50	1.44	1.00	1.08	2.69	4.20	1.30
BeE90D04C07	Cofilin	MC	1.00	1.77	2.27	1.61	0.99	1.00	4.50	4.72	2.64	1.00
BeE80H28B01	Actin	MC	1.00	0.93	2.71	1.64	0.28	1.00	1.13	3.03	6.54	0.20
BeE120N35H01	Vesicle-mediated transport-related protein	MC	1.00	2.45	4.26	2.14	2.20	1.00	3.16	17.27	6.87	1.98
BeE120N07A12	Roadblock-related dynein light chain	MC	1.00	1.31	2.46	1.62	0.39	1.00	1.19	3.66	2.89	0.53
BeE80N07E05	Myosin regulatory light chain 2	MC	1.00	1.83	4.20	4.06	0.78	1.00	2.16	8.22	11.71	0.84
BeE80N12E01	Myosin regulatory light chain cdc4	MC	1.00	1.09	2.66	1.94	0.78	1.00	1.34	8.94	2.45	0.99
BeE80H23E05	Muscle-specific protein 20 - calponin	MC	1.00	0.84	2.16	2.75	0.78	1.00	0.78	1.62	4.53	1.00
BeE90N15E03	Dynein light polypeptide 4	MC	1.00	1.18	2.58	2.50	2.03	1.00	1.44	2.97	12.04	1.63
BeE90N17C06	Dynein 1-alpha heavy chain	MC	1.00	1.96	2.23	1.73	1.06	1.00	1.42	3.97	3.34	1.00
BeE80H10E11	Cytoplasmic dynein light chain	MC	1.00	1.67	1.63	1.41	2.22	1.00	1.65	2.83	2.68	1.14
BeE120N30D02	Myh11 protein	MC	1.00	1.03	3.29	2.17	0.77	1.00	0.80	5.62	6.87	0.80
BeE90D13B04	Tubulin alpha-6 chain	MC	1.00	2.93	4.89	4.20	0.34	1.00	2.45	8.63	8.94	0.57
BeE90D18C07	Tubulin, alpha 2	MC	1.00	3.20	3.63	4.11	0.36	1.00	2.33	7.41	11.88	0.36
BeE30N08A11	Alpha-tubulin	MC	1.00	2.77	4.14	2.99	0.38	1.00	2.11	7.26	10.34	0.48

MC – microtúbulo e citoesqueleto

Experimentos de RT-PCR quantitativo em tempo real (Figura 13) mostraram que, de fato, concentrações crescentes de glicose provocam a superexpressão não apenas de genes envolvidos na composição do citoesqueleto, mas também daqueles envolvidos em seu funcionamento, tais como pequenas GTPases da superfamília RAS, as quais regulam diversos eventos celulares, incluindo diferenciação, divisão celular, transporte de vesículas e controle do citoesqueleto (Lundquist, 2006).

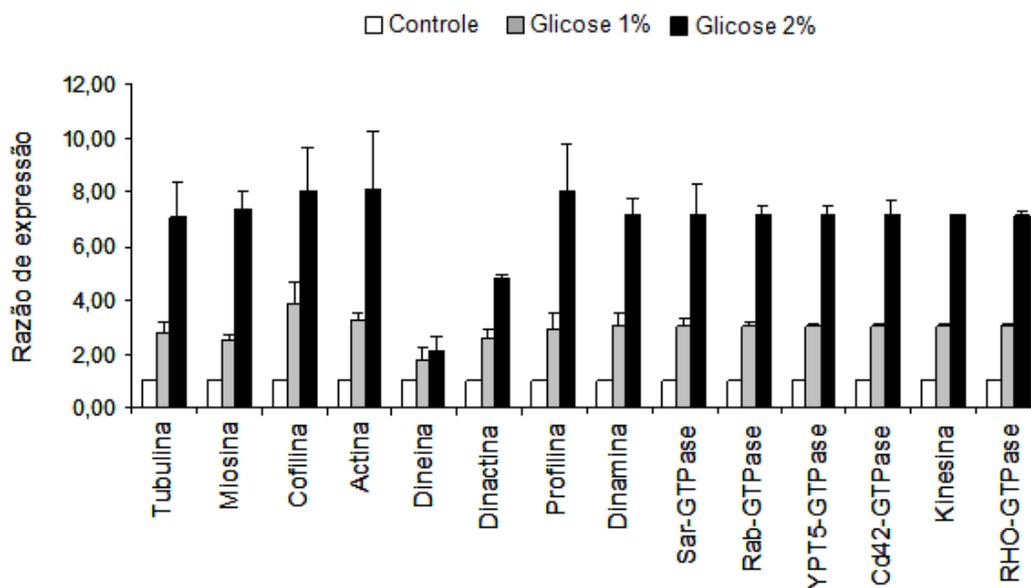


Figura 13: Análise por RT-PCR quantitativo em tempo real dos níveis de mRNA de 14 genes envolvidos com a estrutura e função do citoesqueleto. Os cDNAs utilizados nos ensaios foram sintetizados utilizando RNAs obtidos a partir de zoóspôros de 150 minutos de esporulação na ausência e na presença de glicose.

Durante a esporulação tardia de *B. emersonii*, inúmeras transformações ocorrem a fim de produzir células altamente diferenciadas denominadas zoósporos. Dentre essas modificações, podemos citar a fusão de várias mitocôndrias pequenas para gerar organelas maiores (mitocôndrias gigantes), as quais devem ser distribuídas corretamente, de maneira que cada zoósporo tenha apenas uma em seu citoplasma. Além disso, a formação de estruturas tais como o flagelo, o capacete nuclear (armazenamento de RNAs e proteínas), as partículas  $\gamma$  (armazenamento de proteínas envolvidas na síntese da parede de quitina) e a membrana plasmática em torno de cada núcleo sugere uma intensa atividade do citoesqueleto a fim de garantir a correta diferenciação dos zoósporos. Sendo assim, é possível que eventuais distúrbios na síntese de proteínas envolvidas na estrutura e atividade do citoesqueleto tenham um reflexo direto na biogênese dos zoósporos de *B. emersonii*.

#### 4.4.2. Efeito do triptofano

Correa e Lodi (1986) estudaram também o efeito de 14 aminoácidos, os quais estão presentes no meio de crescimento DM4, sobre a esporulação de *B. emersonii*. De acordo com os resultados obtidos, os autores puderam classificar os aminoácidos em três grupos distintos: (a) aminoácidos que bloqueiam completamente a esporulação (Tyr, Phe, Trp, His, Thr), (b) bloqueiam parcialmente (Ser, Arg, Val, Met, Gly), e aqueles que não bloqueiam a formação dos zoósporos (Lys, Ile, Leu, Glu), todos a uma concentração igual a 1 mM. Em seguida, os autores escolheram um representante de cada grupo para avaliar o efeito da concentração sobre a cinética da esporulação. Os resultados mostraram que concentrações de triptofano  $\geq 0,2$  mM bloquearam completamente a esporulação (100% de zoosporângios cheios); as células sendo bloqueadas antes do surgimento do septo basal. Concentrações de triptofano variando de 0,01 a 0,05 mM provocaram atrasos na esporulação, atrasos que foram diretamente proporcionais à concentração de triptofano presente na solução de esporulação. Em concentrações de triptofano iguais a 0,1 mM, apenas 20% dos zoosporângios esporularam completamente após 420 minutos (Correa and Lodi, 1986).

Com o objetivo de investigar o motivo pelo qual o triptofano é capaz de inibir a diferenciação dos zoósporos de *B. emersonii*, realizamos a análise da expressão gênica aos 150 minutos da fase de esporulação na presença de 0,01 mM de triptofano, concentração esta que apenas provoca um atraso de aproximadamente 30 minutos no processo de diferenciação, efeito semelhante ao observado em nossos experimentos de esporulação na presença de glicose 1%. Ao contrário do que foi observado para glicose, zoósporos produzidos na presença de triptofano não apresentaram alteração na motilidade ou formação do flagelo (dados não mostrados).

A análise dos dados revelou um total de 876 genes diferencialmente expressos aos 150 minutos da esporulação em resposta à presença de triptofano (0,01 mM), sendo que 340 deles foram induzidos e 536 foram reprimidos. As categorias funcionais mais representadas entre os genes induzidos foram: transporte de aminoácidos, resposta a estresse e enovelamento de proteínas e proteólise (Tabela 7).

Como mostra a tabela 7, cinco transcritos envolvidos no transporte de aminoácidos foram induzidos, sugerindo que a célula capta o triptofano presente na solução de esporulação. Ainda entre os genes induzidos por triptofano, estão 11 transcritos envolvidos na resposta a estresse, e outros 47 relacionados com o catabolismo e enovelamento de proteínas, sugerindo a existência de um estresse durante o tratamento com triptofano.

De fato, vários genes envolvidos na resposta antioxidante foram induzidos pelo tratamento com triptofano, tais como aqueles que codificam as enzimas peroxiredoxinas, tioredoxinas, glutathione-S-transferase, quinona oxidoreductase e dissulfeto isomerases, sugerindo a existência de estresse oxidativo durante o tratamento com triptofano.

Não coincidentemente, a indução de genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo foi acompanhada do aumento na expressão de genes cujos produtos estão relacionados com o enovelamento de proteínas e proteólise. Dentre os genes relacionados com a proteólise, encontra-se aquele codificando a proteína DER1, a qual é especificamente requisitada no processo de degradação de proteínas desenoveladas presentes no lúmen do retículo endoplasmático (Knop *et al.*, 1996). Genes relacionados com a proteólise dependente de ubiquitina também foram induzidos por triptofano, tais como aqueles que codificam diferentes parálogos putativos da enzima ativadora de ubiquitina E1 (*ubiquitin-activating enzyme* E1). Esta enzima é responsável pelo

primeiro passo da via de ubiquitinação de proteínas. Foi induzido também o gene que codifica outra enzima da mesma via, denominada *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2). Esta ubiquitinação pode alterar a função e/ou a localização das proteínas ou direcioná-las para a degradação através do proteassomo 26S (Sun and Chen, 2004). De fato, como mostrado na tabela 7, genes codificando diferentes subunidades do proteassomo foram também induzidos em consequência do tratamento com triptofano. Além disso, genes codificando diferentes proteases e peptidases também foram induzidos, sugerindo uma alta atividade proteolítica. Interessantemente, três genes codificando metacaspases foram induzidos por triptofano. Metacaspases são proteases, da família das caspases, encontradas em plantas, fungos e protozoários, e que estão relacionadas com a morte celular programada (apoptose) (Uren *et al.*, 2000). Como pode ser visto na tabela 7, um dos genes de metacaspase mostrou-se mais de 5 vezes induzido na presença de triptofano. Estudos recentes do nosso laboratório, investigando os efeitos de cádmio sobre a esporulação e a germinação de *B. emersonii*, revelaram que vários genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo foram induzidos em ambas as fases, mas apenas na esporulação houve a indução de genes codificando metacaspases ou proteínas putativas que contêm domínios de caspase (Georg and Gomes, 2007).

A indução de vários genes que codificam chaperones moleculares, responsáveis pelo correto enovelamento de proteínas, tais como: HSP10, várias subunidades do complexo-T, HSP90, prefoldina e diferentes peptidil-prolil cis-trans isomerases, também sugere a existência de estresse durante o tratamento com triptofano. Além disso, uma proteína de reparo de DNA (DNA mismatch repair protein) também apresentou aumento em seus níveis de expressão na presença de triptofano, sugerindo a existência de danos no DNA.

Tabela 7: Genes induzidos por triptofano (0,01 mM) aos 150 minutos da esporulação de *B. emersonii*.

ID	Anotação	Nº SwissProt	Categoria funcional	R. expressão
BeE60N05B04	Carboxypeptidase	Q7SI81	Enovelamento de proteína e proteólise	9.99
BeE30N22H03	Hypothetical subtilase-type proteinase	Q9UTS0	Enovelamento de proteína e proteólise	6.11
BeG30N02D12	Metacaspase-1	Q08601	Enovelamento de proteína e proteólise	5.66
BeG90N22C02	Proteasome subunit alpha type 7	Q9PTW9	Enovelamento de proteína e proteólise	4.23
BeE30N15E12	PROSBETA2 protein	Q9VUJ1	Enovelamento de proteína e proteólise	4.17
BeZSPN13B02	Vacuolar serine protease	Q9HF04	Enovelamento de proteína e proteólise	4.17
BeE60N10D10	Proteasome subunit alpha type	Q7S2D6	Enovelamento de proteína e proteólise	3.84
BeE60N02F11	26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	Q13200	Enovelamento de proteína e proteólise	3.61
BeG90N10A09	Putative secreted metalloprotease 3	Q8NIH1	Enovelamento de proteína e proteólise	3.41
BeE30N14B02	Proteasome subunit alpha type	Q7S903	Enovelamento de proteína e proteólise	3.36
BeE30N08B10	Probable proteasome subunit beta type 2	Q09720	Enovelamento de proteína e proteólise	3.2
BeE60N08H03	ENSANGP0000023984 (Fragment)	Q7PGR3	Enovelamento de proteína e proteólise	3.18
BeNSVP09F06	Mitochondrial processing peptidase beta sub	Q00302	Enovelamento de proteína e proteólise	3.03
BeG120N08G03	26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	Q13200	Enovelamento de proteína e proteólise	2.83
BeG120N01H03	Similar to prolyl endopeptidase (Fragment)	Q7ZWL1	Enovelamento de proteína e proteólise	2.71
BeE60H17C06	Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Fragment)	P52495	Enovelamento de proteína e proteólise	2.58
BeG30N09H07	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa	P52493	Enovelamento de proteína e proteólise	2.57
BeE60H28G06	Proteasome subunit beta type 3	O73817	Enovelamento de proteína e proteólise	2.45
BeE60H29G11	Glutamate carboxypeptidase-like protein	Q9P612	Enovelamento de proteína e proteólise	2.43
BeE90D20F05	Metacaspase-1	O74477	Enovelamento de proteína e proteólise	2.31
BeE30N21E09	Similar to prolyl endopeptidase (Fragment)	Q7ZWL1	Enovelamento de proteína e proteólise	2.27
BeE30N13G07	Proteasome regulatory subunit 12	O13386	Enovelamento de proteína e proteólise	2.17
BeE60N07B03	Sexual differentiation process putative subtilase-type proteinase isp6	P40903	Enovelamento de proteína e proteólise	2.14
BeE60H23F08	Degradation in endoplasmic reticulum protein 2	Q9GZP9	Enovelamento de proteína e proteólise	2.14
BeNSVP12G06	26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	Q99J14	Enovelamento de proteína e proteólise	2.07
BeE60N10D04	Ubiquitin-activating enzyme E1-like protein	Q9D906	Enovelamento de proteína e proteólise	2.07
BeG90N07B07	AGAP009907-PA	Q7Q192	Enovelamento de proteína e proteólise	2.04
BeE60N06H11	26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	O75832	Enovelamento de proteína e proteólise	2.03
BeZSPN06B03	Metacaspase-1	O74477	Enovelamento de proteína e proteólise	1.99

BeE30N03D01	Ubiquitin conjugating enzyme	Q9P7R4	Enovelamento de proteína e proteólise	1.94
BeE60C30D10	NEDD8-activating enzyme E1 catalytic subunit	Q7SHT1	Enovelamento de proteína e proteólise	1.89
BeE120N37H01	Polyprotein (Fragment)	Q9MZG9	Enovelamento de proteína e proteólise	1.87
BeZSPN03G07	Mitochondrial processing peptidase beta sub	Q00302	Enovelamento de proteína e proteólise	1.82
BeG120N17H03	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 4	P46595	Enovelamento de proteína e proteólise	1.8
BeE90D03E05	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 3	Q9NTU3	Enovelamento de proteína e proteólise	1.79
BeE30N13D09	Peptidase M20 domain-containing protein 2	Q8IYS1	Enovelamento de proteína e proteólise	1.72
BeE60H23C11	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q9W227	Enovelamento de proteína e proteólise	4.59
BeE60H32E04	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	O42993	Enovelamento de proteína e proteólise	4.14
BeE60H14B07	Heat-shock protein 90 [Cryptococcus neoformans var	P41887	Enovelamento de proteína e proteólise	2.85
BeZSPN11F03	GroES chaperonin family	Q7RX42	Enovelamento de proteína e proteólise	2.13
BeE30N09G01	Probable prefoldin subunit 4 (VIP3)	Q9M4C4	Enovelamento de proteína e proteólise	2.00
BeG120N23B05	T-complex protein 1, eta subunit (tcp-1-eta), puta	Q99832	Enovelamento de proteína e proteólise	3.66
BeE60H30F05	T-complex protein 1 subunit delta	Q96C51	Enovelamento de proteína e proteólise	2.87
BeG90N03D07	T-complex protein 1 subunit alpha	O94501	Enovelamento de proteína e proteólise	2.68
BeE60C24C07	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	Q7ZA53	Enovelamento de proteína e proteólise	1.92
BeE30N17A01	Probable t-complex protein 1, beta subunit [Schizo	Q10147	Enovelamento de proteína e proteólise	1.85
BeG60N12E03	Peptidyl prolyl isomerase H (cyclophilin H) [Homo	O43447	Enovelamento de proteína e proteólise	1.77
BeG30N13H09	Amino acid transporters	Q7NK14	Transporte de aminoácidos	3.63
BeG90N09B05	Proton-glutamate symporter	N/A	Transporte de aminoácidos	3.51
BeG60N01F09	Hypothetical protein AN2560.2	Q7S4C6	Transporte de aminoácidos	2.39
BeG30N12H02	Probable amino acid transporter	Q7NK14	Transporte de aminoácidos	2.20
BeE30N06E01	Amino acid permease family protein	Q9A910	Transporte de aminoácidos	1.97
BeE60C31E12	Putative glutathione S-transferase	Q94GY8	Resposta a estresse	1.79
BeE60H08E04	Quinone oxidoreductase	Q9A212	Resposta a estresse	3.01
BeG120N23D09	Protein disulfide-isomerase	Q7S399	Resposta a estresse	4.38
BeE30N15B06	Glutaredoxin [Tilia platyphyllos]	Q945T3	Resposta a estresse	2.46
BeE60N16G11	Thioredoxin-1	P22217	Resposta a estresse	2.01
BeE60H21G07	Ankyrin repeat-containing protein YAR1	P46683	Resposta a estresse	1.96
BeE60C19G01	Peroxiredoxins [Phanerochaete chrysosporium]	Q9NL98	Resposta a estresse	1.88

BeE60H30A11	Protein disulfide-isomerase tlgA	Q00216	Resposta a estresse	1.86
BeG120N16D10	VIP1 protein [Schizosaccharomyces pombe]	P87216	Resposta a estresse	1.85
BeE60N14F11	Peroxiredoxin 2 [Bos taurus]	Q9BG13	Resposta a estresse	1.81
BeE60H11C04	Peroxiredoxins [Phanerochaete chrysosporium]	Q7YXM3	Resposta a estresse	1.81

Tabela 8: Genes reprimidos por triptofano (0,01 mM) aos 150 minutos da esporulação de *B. emersonii*.

<b>ID</b>	<b>Anotação</b>	<b>Nº SwissProt</b>	<b>R. expressão</b>
BeG60N14A03	Sporulation protein RMD1	Q03441	-1,94
BeZSPN09E03	Sporulation-specific protein 20 (Sec14 cytosolic factor )	Q10137	-2,18
BeE60C06B03	Flagellar hook-associated protein FlgK [Pseudomona	Q88ES2	-4,72
BeE120N21G10	Probable synaptobrevin homolog C6G9.11	Q92356	-3,05
BeZSPN19C11	Synaptobrevin-like V snare protein (SNARE protein Ykt6)	O15498	-2,17
BeE120N27D02	Reduced viability upon starvation protein homolog ( Protein hob3)	Q9UUM7	-3,33

Em córtex cerebral de ratos, a adição de L-triptofano induz estresse oxidativo, o que também ocorre em animais ou pacientes com hipertriptofanemia e outras desordens neurodegenerativas em que há acúmulo de triptofano (Feksa *et al.*, 2006; Feksa *et al.*, 2008; Forrest *et al.*, 2004). Nessas células, o triptofano induz a peroxidação de lipídeos, indicando a existência de estresse oxidativo, o qual é resultado do aumento da produção de compostos tais como: ácido quinolínico, 3-hidroxiquinurenina e ácido 3-hidroxi-antranílico, todos capazes de gerarem radicais livres.

Um dos metabólitos do triptofano, a 3-hidroxiquinurenina, foi purificada do fungo patógeno de planta *Blumeria graminis*, tendo sido encontrada abundantemente em esporos em desenvolvimento e em germinação, bem como nas hifas (Wilson *et al.*, 2003). Além disso, várias evidências sugerem a existência das enzimas quinureninase e hidroxiquinureninase em fungos e outros microrganismos (Gaertner *et al.*, 1971; Gaertner and Shetty, 1975; Sanjust *et al.*, 2003; Shetty and Gaertner, 1973, 1975; Shin *et al.*, 1991; Turner, 1973).

Dentre os genes reprimidos, nenhuma categoria funcional mostrou-se enriquecida. Contudo, uma busca detalhada mostrou que seis genes envolvidos com o processo de formação de esporos (esporulação) tiveram seus níveis transcricionais reduzidos, fato este que, juntamente com aqueles discutidos anteriormente, pode explicar o bloqueio da esporulação por triptofano (Tabela 8). Em *S. cerevisiae*, a proteína RMD1 (Required for meiotic nuclear division protein 1) é necessária durante a esporulação, onde parece estar envolvida na divisão nuclear (Enyenihi and Saunders, 2003). Em *S. pombe*, o gene *spo20* codifica uma proteína homóloga ao fator citosólico Sec14 de *S. cerevisiae*, o qual tem papel importante na formação da membrana do esporo de *S. pombe* (Nakase *et al.*, 2001). Também em *S. pombe*, os genes *syb1* e *hob3* codificam as proteínas sinaptobrevina e *hob3*,

envolvidas no tráfego de membrana durante a citocinese e na localização dos filamentos de actina durante a citocinese, respectivamente. Já a proteína flgK está envolvida na montagem do flagelo da bactéria *Pseudomonas putida* (Kieboom *et al.*, 2001).

Sendo assim, nossos dados de expressão gênica sugerem a existência de estresse oxidativo durante a diferenciação dos zoósporos de *B. emersonii* provocado pela adição do aminoácido triptofano à solução de esporulação. É possível que os danos celulares provocados por tal estresse expliquem o forte efeito inibidor que esse aminoácido possui sobre a esporulação de *B. emersonii*, descrito por Correa e Lodi em 1986. Além disso, observamos a repressão de genes envolvidos com o processo de esporulação, o que também contribui para explicar o efeito inibidor do triptofano sobre a esporulação de *B. emersonii*.

#### **4.5. Estudo da via de sinalização por cGMP durante a esporulação de *B. emersonii***

##### **4.5.1. Identificação e análise de seqüências que codificam guanilato ciclases e fosfodiesterase de cGMP putativas**

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 (Silverman, 1976; Vale *et al.*, 1975), nenhum gene codificando guanilato ciclase e fosfodiesterase de cGMP foi descrito em fungos, até o momento.

Um investigação recente no banco de ESTs de *B. emersonii* (<http://blasto.iq.usp.br>), construído a partir das informações obtidas do sequenciamento de várias bibliotecas de cDNA (Georg and Gomes, 2007; Ribichich *et al.*, 2005), revelou a existência de três ESTs

codificando parte de diferentes domínios catalíticos da enzima guanilato ciclase e uma EST codificando uma fosfodiesterase de cGMP.

Com o objetivo de completar a sequencia correspondente a esses domínios ciclase putativos, procedemos a extensão das sequencias nucleotídicas em direção às extremidades 5' e 3' usando o kit GenomeWalker<sup>TM</sup> Universal Kit (Clontech), como descrito em materiais e métodos (item 3.14). As seqüências peptídicas completas correspondentes ao domínio catalítico das ciclasses foram submetidas à análise por alinhamento utilizando o programa blastP, e todas as três apresentaram maior similaridade com domínios catalíticos de guanilato ciclasses depositados no GenBank. Assim sendo, as três ESTs de *B. emersonii* foram denominadas BeGC1, BeGC2 e BeGC3.

A seqüência correspondente ao domínio catalítico de BeGC1 apresentou maior similaridade (BlastP) com uma guanilato ciclase solúvel de *Aedes aegypti* (47% de identidade e 69% de similaridade), enquanto as seqüências correspondentes aos domínios catalíticos de BeGC2 e BeGC3 apresentaram maior similaridade com uma guanilato ciclase de membrana (receptora) do inseto *Nasonia vitripennis* (43% de identidade e 60% de similaridade) e a guanilato ciclase 2 da ascídia *Ciona intestinalis* (48% de identidade e 70% de similaridade), respectivamente.

As seqüências peptídicas correspondentes ao domínio catalítico das três guanilato ciclasses de *B. emersonii* foram comparadas com seqüências de outros domínios catalíticos de ciclasses, incluindo aqueles de adenilato e guanilato ciclasses, a fim de obter maiores informações acerca dos aminoácidos conservados (Figura 14).

O alinhamento mostrou que a maioria dos aminoácidos envolvidos na interação com GTP está conservada nas três guanilato ciclasses putativas de *B. emersinii*. Dentre esses aminoácidos, está o resíduo de glutamato (E) no motivo YKVET, o qual apresenta alta

especificidade pelo grupo amino N-2 do GTP. Em adenilato ciclases, esse resíduo é substituído por uma lisina (K), o qual apresenta alta especificidade por ATP (Liu et al., 1997).

Dois outros resíduos considerados importantes no reconhecimento do GTP em guanilato ciclases são uma arginina (R) e uma cisteína (C), ambas presentes no motivo MP<sub>RY</sub>CL. Foi proposto que esses resíduo são importantes para a orientação correta do resíduo de glutamato no sítio ativo da enzima (Liu et al., 1997). Em BeGC1, o resíduo de arginina no motivo MP<sub>RY</sub>CL foi substituído por um de histidina, e a cisteína presente no mesmo motivo foi trocada por uma alanina (A) em BeGC2 (Figura 14). Embora esses dois aminoácidos sejam importantes na orientação do resíduo de glutamato, substituições nesses resíduos também foram descritas na guanilato ciclase A de *Dictyostelium discoideum* (GCA) e na guanilato ciclase Cya2 de *Synechocystis* (Rauch et al., 2008; Roelofs et al., 2001). Em adenilato ciclases, os resíduos correspondentes à arginina e à cisteína no motivo MP<sub>RY</sub>CL são uma glutamina (Q) e um aspartato (D), respectivamente (Roelofs et al., 2001).

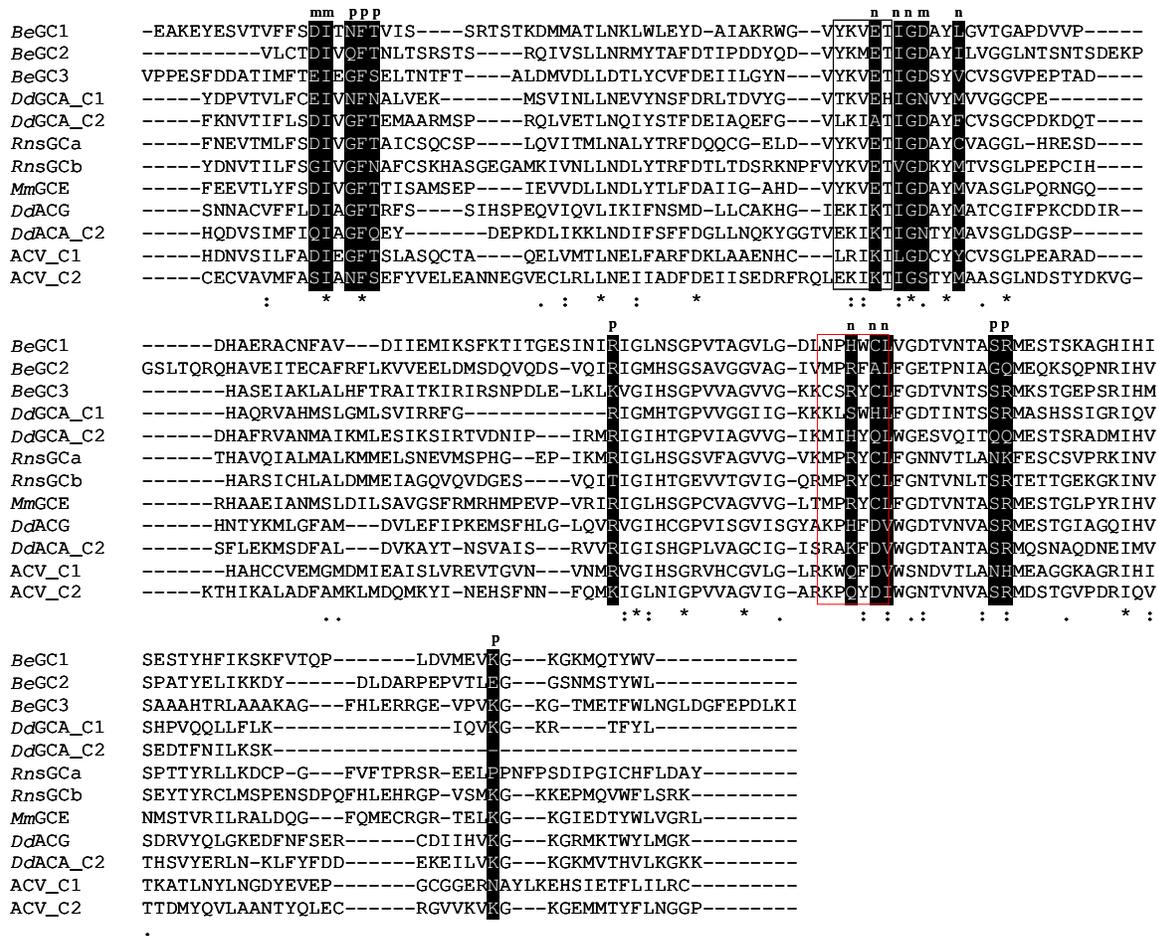


Figura 14: Alinhamento das seqüências deduzidas de aminoácidos correspondentes ao domínio catalítico de diferentes ciclases de nucleotídeos cíclicos. Os aminoácidos cuja função específica foi deduzida a partir de análise de estrutura e modelagem da adenilato ciclase de mamífero são mostrados em colunas pretas indicadas com uma letra na parte superior, onde: m, aminoácido que interage com  $Mg^{2+}$ ; p, resíduo que interage com ribose ou pirofosfato; n, interação com GTP ou ATP. As regiões correspondentes aos motivos YKVT e MPRYCL são mostradas dentro das caixas preta e vermelha, respectivamente. BeGC1, BeGC2 e BeGC3, domínios catalíticos das guanilato ciclases putativas de *B. emersonii*; DdGCA\_C1 e DdGCA\_C2, domínios catalíticos 1 e 2 da guanilato ciclase de *Dictyostelium discoideum*; RnsGCa e RnsGCB, subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da guanilato ciclase solúvel de rato; MmGCE, guanilato ciclase do tipo E ligada à membrana de células de mamífero. DdACG e DdACA\_C2, adenilato ciclases G e A de *D. discoideum* (domínio catalítico 2); e ACV\_C1 e ACV\_C2, adenilato ciclases do tipo V de mamíferos.

O perfil de expressão transcricional de BeGC1, BeGC2 e BeGC3 ao longo da esporulação foi determinado por experimentos de microarranjos de cDNA e confirmados através de RT-PCR quantitativo em tempo real. Como mostra a figura 15, os três transcritos apresentaram razão de expressão máxima aos 150 minutos da esporulação, no entanto, os níveis de BeGC1 foram consideravelmente maiores do que os observados para BeGC2 e BeGC3. Esses resultados são corroborados por aqueles obtidos por Silverman & Epstein (1975), os quais observaram que os níveis de cGMP aumentam significativamente (100 vezes) somente entre 60 e 150 minutos após a indução da esporulação, e são reduzidos aproximadamente 50% em zoósporos. De igual modo, a atividade guanilato ciclase aumenta cerca de 50 vezes durante a diferenciação dos zoósporos (Silverman, 1976). Silverman (1976) também mostrou que a síntese de cGMP durante a esporulação é dependente de transcrição e tradução, haja vista que a adição de actinomicina D e cicloeximida no início do processo bloqueia a produção de cGMP.

Dado que a atividade guanilato ciclase bem como os níveis de cGMP aumentam significativamente somente durante o estágio formação dos zoósporos (esporulação), cGMP parece desempenhar um papel fundamental durante a citodiferenciação de *B. emersonii*.

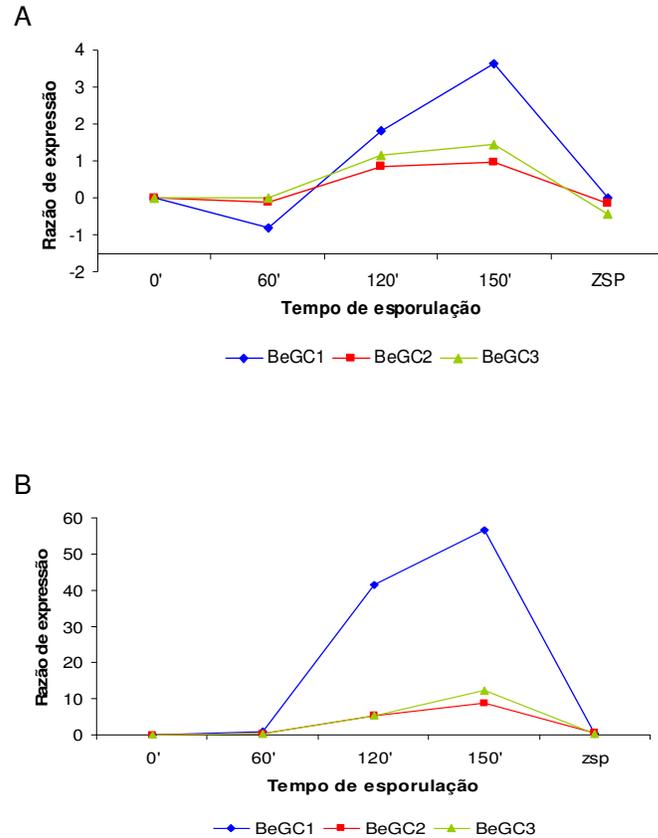


Figura 15: Perfis de expressão transcricional de BeGC1, BeGC2 e BeGC3 durante a esporulação, determinados por microarranjos de cDNA (A) e RT-PCR quantitativo em tempo real (B).

O perfil de expressão transcricional de BeGC1 também pôde ser avaliado por Northern blot (Figura 16), o qual confirmou os resultados anteriormente obtidos. Não foi possível observar bandas nos experimentos de Northern blot referentes a BeGC2 e BeGC3, provavelmente devido a uma baixa expressão desses transcritos durante a esporulação.

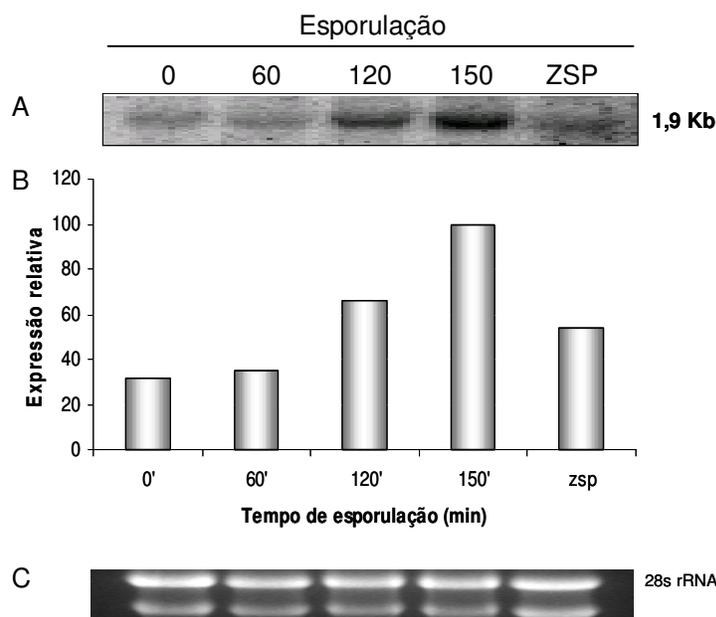


Figura 16: Níveis relativos do transcrito de BeGC1 durante a esporulação de *B. emersonii*. A- Autoradiograma do experimento de Northern blot. B- Níveis relativos do transcrito do gene que codifica a guanilato ciclase 1 de *B. emersonii* determinado por densitometria do autoradiograma apresentado em A. C- RNA ribossômico 28S visualizado por coloração com brometo de etídio, para controle das quantidades de RNA total aplicadas no gel.

Além da existência de genes de guanilato ciclases, também uma EST codificando uma fosfodiesterase de cGMP (BePDE de cGMP) putativa foi encontrada no banco de seqüências de *B. emersonii*. Esse transcrito codifica uma proteína deduzida de 484 aminoácidos, cujo domínio catalítico apresenta 231 resíduos (Figura 17a). Análises de alinhamento da seqüência da BePDE de cGMP utilizando o programa BlastP revelou uma maior similaridade com a fosfodiesterase de cGMP 9A de *Danio rerio* (41% de identidade e 60% de similaridade).

Nove famílias de fosfodiesterases foram descritas de acordo com suas características cinéticas, especificidade por substrato, perfis de inibição, inibidores e ativadores alostéricos

e outras (Soderling et al., 1998). A seqüência de aminoácidos correspondente ao domínio catalítico (231 resíduos) da BePDE de cGMP foi utilizada para a realização de uma análise comparativa através de seu alinhamento com representantes das nove famílias de fosfodiesterases já descritas. Como mostra a figura 17b, o domínio catalítico da enzima de *B. emersonii* apresentou maior identidade (53%) com o representante da família 9, cujos membros apresentam alta especificidade por cGMP (Soderling et al., 1998). De fato, uma análise mais detalhada da região C-terminal do domínio catalítico da BePDE de cGMP revelou a presença de três resíduos de aminoácidos que são conservados somente entre PDEs da família 9 (Figura 17a, região sublinhada). Em membros de todas as outras famílias, o aminoácido tirosina (Y) na região C-terminal do domínio catalítico das enzimas da família 9 é substituído por uma fenilalanina. A segunda substituição refere-se à serina (S), em cuja posição encontra-se um resíduo de glicina em membros das outras famílias. Por fim, o resíduo de lisina (K) encontrado nos membros da família 9 é substituído por um dos três resíduos hidrofóbicos (leucina, isoleucina ou valina) em membros das outras famílias. Embora a porção C-terminal do domínio catalítico de BePDE possua esses três resíduos conservados, de acordo com Soderling et al.(1998), para que fosfodiesterases sejam consideradas membros de uma mesma família, é necessário que haja pelo menos 80% de identidade entre a seqüência peptídica de seus domínios catalíticos, fato este que não ocorre com a seqüência correspondente ao domínio catalítico da enzima de *B. emersonii*, a qual apresentou máxima identidade (55%) com um membro da família 9 (PDE9 de *Mus musculus*). Embora tal identidade (<80%) provavelmente seja resultado da grande distância evolutiva entre quitridiomictos e eucariotos superiores (tal como *M. musculus*), as análises sugerem que BePDE pertence há uma nova família de

fosfodiesterases, cujos membros apresentam alta identidade de seqüência peptídica com fosfodiesterases da família 9, podendo portanto, assim como as PDEs dessa família, ter alta afinidade por cGMP.

O perfil de expressão transcricional da BePDE de cGMP ao longo da esporulação foi determinado por RT-PCR quantitativo em tempo real. Como pode ser observado na figura 17c, o nível do transcrito aumenta consideravelmente durante a esporulação tardia (120-150 minutos) e diminui nos zoósporos. Embora os níveis do mensageiro da BePDE de cGMP apresentem o perfil mencionado acima, os resultados obtidos por Vale *et al.* (1975) mostraram atividade fosfodiesterase de cGMP em zoósporos, sugerindo que, embora haja uma queda significativa nos níveis do mensageiro da PDE, a enzima parece estar presente durante toda a fase tardia da esporulação, inclusive no zoósporo, regulando os níveis de cGMP, os quais de fato são reduzidos em cerca de 50% nos zoósporos (Silverman & Epstein, 1975).

A

```

MAKVPTRIH VKLDDKTEAF ELYPGSSNDD VRAILYSIAS LSLDDKDVWF
KLTKPDGTVV PPSPELLPGNT EKDPYVLSVK RATASPKDTN AQTASKLAPL
ELKLNDAKQ LEPLRDISAF REQLVSEFQKR VEVAEKNTLM SQFPATKVTG
KTIKRISKID PIFTHQPKYV FTDETVAYLK QPSFNNWQWE ENEMVALIEH
MFSELGLIER FKIELPLIKR FLHTVKIDYN NNEFHNFRHC FCVTQMFYGI
VNVTKIMDKV EPIDLLIGLV ACIIHDIDHP GFNNAYQVNA RTELATVYND
QSPLNHHCA VGFTIIRNKD CNIFKNLTDK EYDAARKGIV RCVLSTDITK
HGDIMAKFKV VADNFSFTDP EHRMQLLVMM VKCADISNEA READVAEPWL
DCILLEEFQK SDEKKAELP VAEEMDRDKV TDEGACWGET QEVMIPLFEH
LARVLPQLEG DVIEQIRKSL AYYQELQQKM QKPM

```

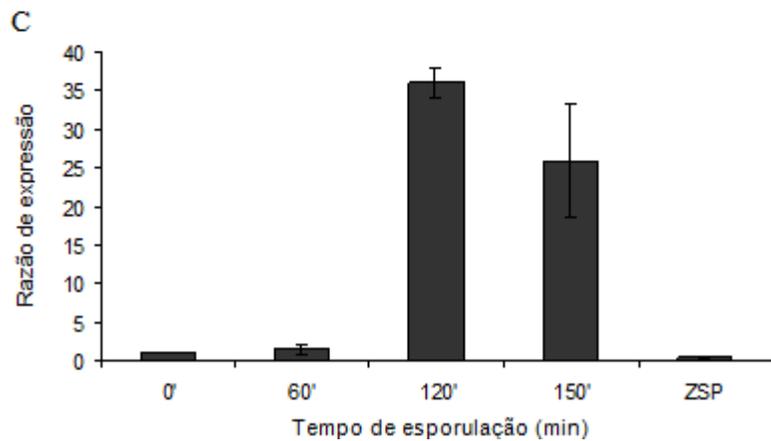
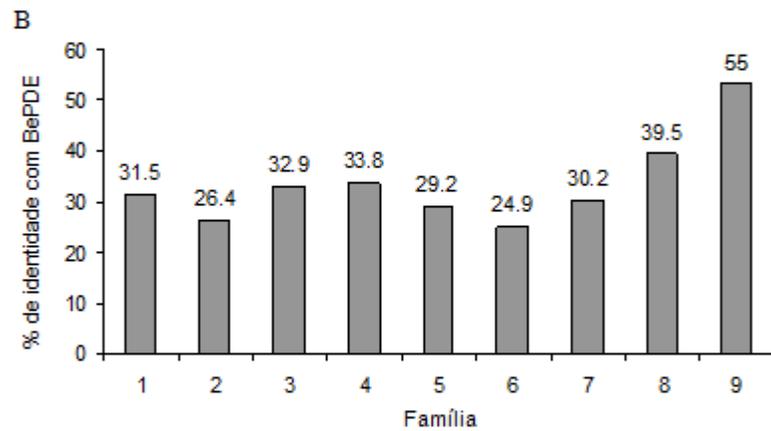


Figura 17: Análise da seqüência de aminoácidos da fosfodiesterase de cGMP de *B. emersonii* e determinação do perfil de variação do transcrito ao longo da esporulação. A- A região correspondente ao domínio catalítico é mostrada dentro do retângulo, e a porção C-terminal contendo os três resíduos conservados entre enzimas da família 9 aparece sublinhada. B- Porcentagem de aminoácidos idênticos entre a BePDE de cGMP e representantes das nove famílias de fosfodiesterases descritas em eucariotos. C- Perfil de expressão do transcrito da BePDE de cGMP ao longo da esporulação de *B. emersonii*.

Poucos trabalhos têm mostrado a existência 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 freqüentemente 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 guanilato ciclase nesses grupos (Baker and Kelly, 2004; Linder and Schultz, 2002; Schaap, 2005).

No entanto, os quitridiomicetos divergiram cedo na linhagem dos fungos, estando, portanto, na base da árvore filogenética do grupo (Heckman *et al.*, 2001; Van der Auwera and De Wachter, 1996). Além disso, os quitridiomicetos apresentam uma célula móvel em pelo menos um estágio do 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, fazendo uma busca no genoma seqüenciado do quitridiomiceto *Batrachochytrium dendrobatidis* (<http://www.broad.mit.edu>), foi possível detectar a presença de pelo menos dois genes que codificam guanilato ciclases (BDEG\_02490.1 e BDEG\_00667.1) e pelo menos um codificando uma fosfodiesterase de cGMP (BDEG\_08369.1) no genoma daquele fungo, o que reforça a tese da existência e participação do cGMP em importantes vias de sinalização nos quitridiomicetos. Por outro lado, outros fungos primitivos, porém sem células móveis, tais como os zigomicetos *Rhizopus oryzae* e *Phycomyces blakesleeanus*, cujos genomas foram recentemente

seqüenciados (<http://www.broad.mit.edu> e <http://www.jgi.doe.gov>, respectivamente), não revelaram a presença de genes com similaridade com guanilato ciclases. No entanto, seqüências apresentando similaridade com fosfodiesterases de cGMP foram encontradas no genoma desses fungos (*R. oryzae* e *P. blakesleeanus*), sugerindo um resquício da sinalização por cGMP. Análises de alinhamento (BlastP) utilizando a seqüência peptídica completa das PDEs de *R. oryzae* e *P. blakesleeanus* anotadas como PDE de cGMP revelam alinhamentos tanto com PDE de cGMP quanto com PDE de cAMP. A mesma análise utilizando a seqüência peptídica completa da PDE de *B. emersonii* resulta apenas em alinhamentos com PDE com alta especificidade por cGMP (PDE9). Além disso, os três resíduos de aminoácidos altamente conservados na porção C-terminal do domínio catalítico das PDE da família 9 só estão conservados na enzima de *B. emersonii* (figura 18a). As seqüências correspondentes ao domínio catalítico das PDE encontradas em *B. emersonii*, *R. oryzae* e *P. blakesleeanus* foram alinhadas com o domínio catalítico da PDE de cGMP de *Mus musculus*. Como pode ser visto na figura 18b, a enzima de *B. emersonii* apresenta 55% de identidade, ao passo que as enzimas de *R. oryzae* (RoPDE-2 e RoPDE-3) e *P. blakesleeanus* (PbPDE-2) anotadas como PDE de cGMP apresentaram 11,1%, 23,6% e 33,3% de identidade, respectivamente. Essa análise sugere que o gene que codifica a PDE de *B. emersonii* parece estar sob maior pressão seletiva, sugerindo que de fato, em *B. emersonii* tal enzima esteja envolvida na degradação de cGMP.

A

```

MmPDE9A      EHLTLKMLIKCCDISNEVRPMEVAEPWVDCLEEEYFMQSDREKSEGLPVAPFMDRDKVTKATAQIGFIKFVLIIPMF
BePDE        EHRMQLLVMMVKCADISNEARPADVAEPWLDCLLEEFYFAQSDREKAEGLPVAPFMDRDKVTKPGAQVGFIQFVMIPLF
RoPDE-1 (cAMP) EERLMLCHILHAADISNFCRPWPIFYHAAQLVCTEFFRQAEEEFHMRLIP----HIGNTNPSTISVGFIDFIVYPYF
RoPDE-2 (cGMP) DQRRRFARILLHAADISNTVRPWPISKQWSDLVREFFRQGDAEKTAGLTVSTGMDRDLDTQASISLRFTEGIVQPYF
RoPDE-3 (cGMP) QQRLILCQIILHAADISNALRPWPICRSWSNLVCEEFFGQGDAEKAQGLPISPMDRNLQISQTTIGLQFGDFVVPYF
RoPDE-4 (cAMP) EERLMLCNILHAADVSNPCRPWQVSRELSRLVCIIEFSRQAEEEHQRFVVS---QIA-AEPTMNTSFIDLIVYPYF
RoPDE-5 (cAMP) KRRTNFAKILLHAADISNTVRVWPIKQWSDLIVQEEFFRQGDAAERSAGLTVSPGMDRALASQASISLRFGDLIVKPYF
PbPDE-1 (cAMP) KERLLLCSAIICKADISNVARPYTQAAKWAELLVEEFACQGDLERELGMPLVPLNDRDKIVLEDSQIGFIRYVTLDF
PbPDE-2 (cGMP) DDRQGLCRVLLHAADISNTVRPWPVIAKQWSDLIVQEEFFRQGDAAERRAGLPVSPGMDRDLSSQADISLGFVVKPYF
PbPDE-3 (cAMP) NDRLSLCGILMHAADINNTVRPWVAKQWSDLVQEEFFRQGDAAERAAGLPITPNMDRTEISQPMISITFGD-LIRPFF
PbPDE-4 (cAMP) QERLIICGALIKCADISNCARPFSSAEKWAKLLVEEFCKQGDLEKELGMPLVPMNQRKLPLEDFQLSFKRNVAKLF
PbPDE-5 (cAMP) LEREVLCCQIMLHAADISNALRPWSICKTWSNLVCEEFFGQGDAEKAFGLPISPMDRGTTOATISLKFQDYIVNPYF
      :      : : : : * : * * : * : * : * : * : * : *

```

B

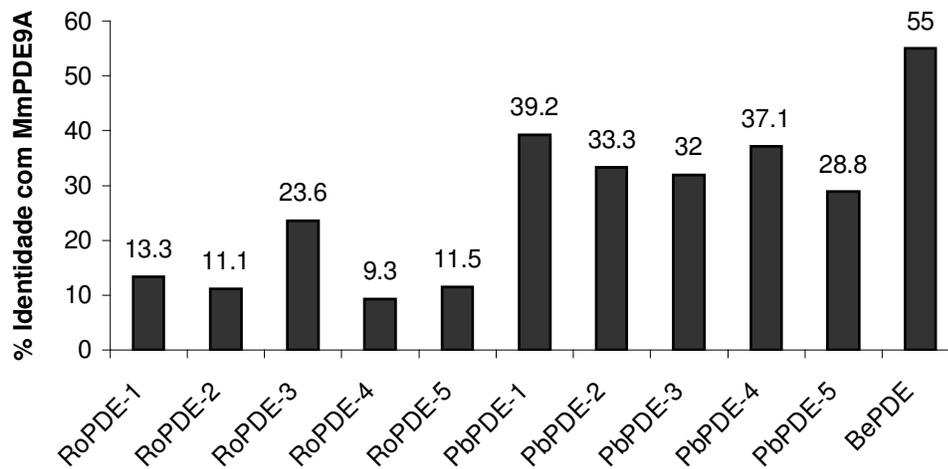


Figura 18: Análise de alinhamento da região correspondente ao domínio catalítico de diferentes PDEs. A- Porção C-terminal do domínio catalítico das PDEs de *B. emersonii* (BePDE), *R. oryzae* (RoPDE) e *P. blakesleanus* (PbPDE). B- Porcentagem de identidade do domínio catalítico das PDEs de *B. emersonii* (BePDE), *R. oryzae* (RoPDE) e *P. blakesleanus* (PbPDE) com a enzima de *Mus musculus* (MmPDE) pertencente à família 9.

Embora as atividades de guanilato ciclase e de PDE de cGMP tenham sido anteriormente demonstradas em *B. emersonii* (Vale *et al.*, 1975; Silverman, 1976), experimentos que comprovem de fato a especificidade de tais enzimas pelos seus substratos, tais como a construção de mutantes nesses genes ou o isolamento do gene e a expressão da proteína recombinante para a realização de ensaios *in vitro*, são ainda necessários. Tal necessidade torna-se mais evidente em vista do fato de que as PDEs de *P. blakesleeanus*, inclusive aquelas anotadas como PDE de cAMP, apresentam uma razoável identidade (domínio catalítico) com a PDE9A de *M. musculus*.

#### **4.5.2. A produção de cGMP em *B. emersonii* é dependente de óxido nítrico**

De uma maneira geral, guanilato ciclases podem ser de dois tipos, guanilato ciclases particuladas, as quais possuem domínios transmembranares e encontram-se, portanto, associadas à membrana, e guanilato ciclases solúveis, as quais não possuem regiões transmembranares. Essas últimas são em muitos casos heme-proteínas heterodiméricas contendo uma subunidade  $\alpha$  e outra  $\beta$  que são ativadas por óxido nítrico.

Com o objetivo de investigar o mecanismo de produção de cGMP em *B. emersonii*, foi realizado um experimento de inibição da esporulação utilizando-se o inibidor de guanilato ciclase sensível a  $\bullet$ NO denominado 1*H*-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ). Essa droga inibe guanilato ciclases estimuladas por  $\bullet$ NO, não tendo efeito inibidor sobre guanilato ciclases de membrana nem mesmo sobre adenilato ciclases. Seu mecanismo básico de ação envolve a oxidação do grupo heme da guanilato ciclase para a forma férrica, o que diminui sua afinidade por  $\bullet$ NO (Garthwaite *et al.*, 1995; Schrammel *et al.*, 1996).

ODQ (250  $\mu$ M) foi administrado em diferentes tempos a partir da indução da esporulação e as células foram incubadas a 27°C até que todos os zoosporângios da placa

controle (sem ODQ) esporulassem (zoosporângio vazio), fenômeno observado após aproximadamente 4 horas. Como pode ser visto na figura 19a, a administração de ODQ até os 90 minutos inibe a esporulação em 100% dos zoosporângios. Quando a adição da droga se dá aos 120 minutos após a indução da esporulação, aproximadamente 30% das células são capazes de esporular. A porcentagem de zoosporângios vazios aumenta para cerca de 60% e 80% quando ODQ é adicionado 150 e 180 minutos após a indução da esporulação, respectivamente. Além disso, como mostra a figura 19b, os níveis de cGMP estão, de fato, reduzidos em zoosporângios tratados com ODQ (250  $\mu$ M), sugerindo não apenas o envolvimento do  $\bullet$ NO na produção de cGMP mas também um importante papel para esse nucleotídeo cíclico nos eventos finais da esporulação, os quais levam à diferenciação dos zoósporos.

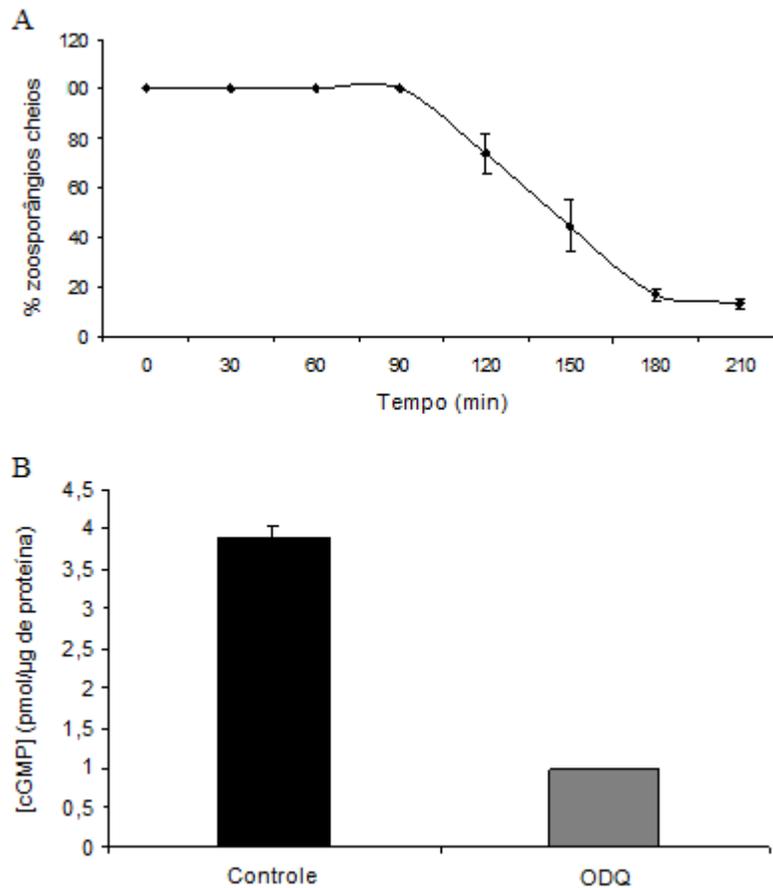


Figura 19: Efeito do ODQ sobre a esporulação e a síntese de cGMP em *B. emersonii*. A- A droga (250 µM) foi administrada no início da esporulação (0') e após diferentes tempos ao longo do estágio em questão (30', 60', 90', 120', 150', 180' e 210'). B- Níveis de cGMP medidos em zoosporângios de 150 minutos de esporulação na ausência (controle) e presença de ODQ (250 µM).

A redução do efeito inibidor do ODQ observada após os 90 minutos, deve-se provavelmente ao fato de que os níveis de cGMP começam a aumentar a partir da primeira hora após a indução da esporulação, como foi descrito por Silverman & Epstein (1975). Embora os autores tenham mostrado um aumento na produção de cGMP a partir dos 60 minutos da esporulação, o fato de as células ainda estarem inibidas por ODQ aos 90 minutos pode ser explicado por atrasos na sincronia das células, o que pode ter sido provocado pelas diferentes condições em que as células foram cultivadas nos diferentes experimentos, ou ainda a quantidades de cGMP insuficientes para assegurar o processo de diferenciação. Já a adição da droga a partir dos 120 minutos da esporulação não foi capaz de inibir a diferenciação em 100% dos zoosporângios, provavelmente devido ao fato de os níveis de cGMP já estarem altos o suficiente para assegurar a continuidade do processo.

É importante salientar que ODQ, mesmo quando adicionado no início da esporulação, não impede a formação do septo basal aos 60 minutos nem mesmo o aparecimento da papila de descarga aos 150 minutos, sugerindo que tal droga tem efeito sobre eventos mais tardios da esporulação, tal qual a citodiferenciação (Figura 20).

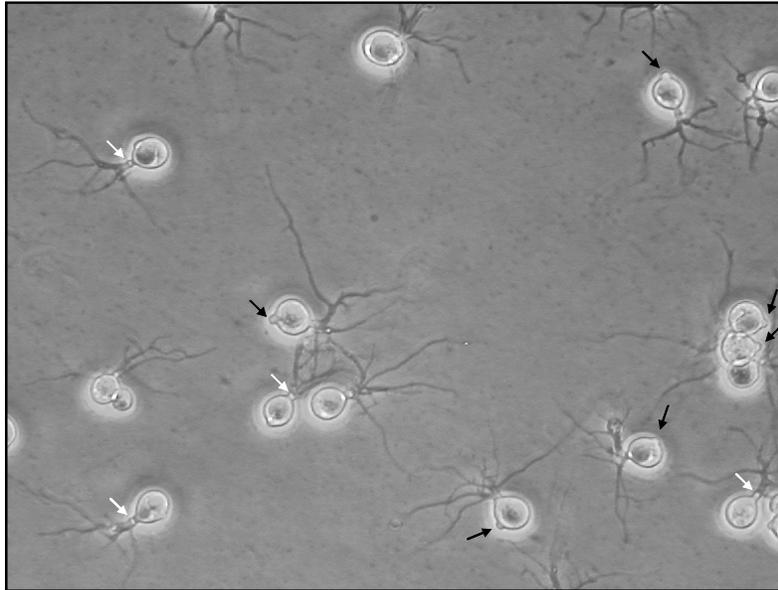


Figura 20: Efeito do inibidor ODQ sobre mudanças fenotípicas características da esporulação de *B. emersonii*. As células foram incubadas em solução de esporulação com ODQ 250  $\mu$ M no início deste estágio (E0'). As setas brancas e pretas indicam o septo basal e a papila de descarga, respectivamente, em células observadas após 150 minutos da indução da esporulação.

#### 4.5.3. Produção de $\bullet$ NO durante a esporulação de *B. emersonii*

Uma vez que os experimentos com ODQ sugeriam o envolvimento do  $\bullet$ NO na via de sinalização por cGMP, a produção daquele radical durante a esporulação de *B. emersonii* foi investigada usando um indicador fluorescente de  $\bullet$ NO, inibidores da produção de  $\bullet$ NO e ensaio de quimiluminescência de produtos derivados de  $\bullet$ NO.

Com o objetivo de visualizar o  $\bullet$ NO produzido durante a esporulação de *B. emersonii*, os esporângios foram lavados com solução de esporulação e incubados no escuro à temperatura ambiente por 15 minutos na mesma solução contendo 4,5-diaminofluoresceína diacetato (DAF-2 DA) na concentração final de 10  $\mu$ M. Uma vez dentro da célula, DAF-2 DA reage com  $\bullet$ NO produzindo uma fluorescência verde. A figura 21a mostra a fluorescência observada em zoosporângios de 150 minutos de esporulação,

ponto em que foi observado um pico de produção de cGMP por Silverman & Epstein (1975), sugerindo que o  $\bullet$ NO produzido nesse momento possa estar envolvido com o aumento nos níveis de cGMP observado entre 60-150 minutos da esporulação de *B. emersonii*. Células tratadas com L-NAME 1mM apresentaram redução na fluorescência ao passo que o tratamento com D-NAME 1 mM não provocou o mesmo efeito (Figura 21b-c). Nenhuma fluorescência pôde ser observada em células não tratadas com DAF-2 DA, indicando não se tratar de auto-fluorescência (dado não mostrado). De fato, compostos derivados do  $\bullet$ NO, tais como nitrito, nitrato, nitrosotióis, nitrosaminas e nitrosil-heme puderam ser detectados em diferentes tempos ao longo da esporulação de *B. emersonii* (Figura 21d-e), sugerindo um papel importante para o  $\bullet$ NO em eventos de transdução de sinal durante a diferenciação dos zoósporos.

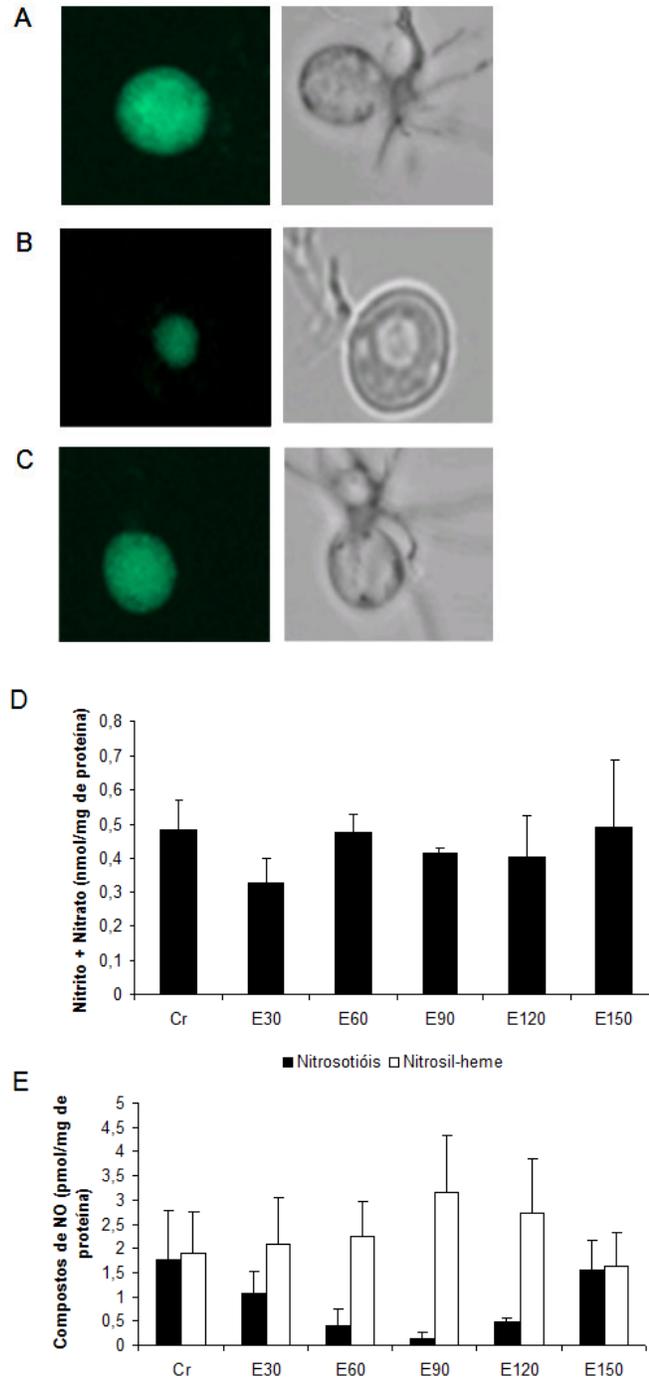


Figura 21: Detecção de  $\bullet$ NO e compostos dele derivados em zoosporângios de *B. emersonii*. A, B e C- Microscopia confocal de varredura a laser de zoosporângios tratados com o indicador de  $\bullet$ NO DAF-2 DA, DAF-2 DA + L-NAME e DAF-2 DA + D-NAME, respectivamente. D e E- Produtos derivados do  $\bullet$ NO quantificados em diferentes tempos (E30, E60, E90, E120 e E150) da esporulação através de ensaios de quimiluminescência de ozônio. Cr indica células em crescimento imediatamente antes da indução da esporulação.

Embora o papel do  $\bullet$ NO ainda seja pouco estudado em fungos, sabe-se que ele está envolvido no desenvolvimento de esporangióforos no zigomiceto *Phycomyces blakesleeanus* (Maier *et al.*, 2001), na fotoconidiação de *Neurospora crassa* (Ninnemann and Maier, 1996) e na germinação dos conídeos de *Colletotrichum coccoodes* (Wang and Higgins, 2005). Em *B. emersonii*, nossos resultados sugerem que o  $\bullet$ NO esteja envolvido na citodiferenciação através da indução da produção de cGMP, nucleotídeo cíclico que parece ser essencial à diferenciação dos zoósporos (Silverman & Epstein, 1975; Silverman, 1976).

Ensaio de esporulação na presença de L-NAME (*N* $\omega$ -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS), mostrou um atraso de aproximadamente 1 hora na liberação dos zoósporos em mais de 60% dos zoosporângios em comparação com as células não tratadas (Figura 22). Uma vez que o L-NAME é um análogo da L-arginina, não metabolizável pela NOS, e dado que certos aminoácidos são capazes de inibir a esporulação de *B. emersonii* (Correa & Lodi, 1986), a L-arginina foi utilizada como controle nos ensaios de esporulação na presença de L-NAME. Como pode ser visto na figura 22, a L-arginina provocou um atraso na esporulação em menos de 10% dos zoosporângios, sugerindo que o efeito observado pelo L-NAME sobre a esporulação de *B. emersonii* deve-se à redução nos níveis de  $\bullet$ NO.

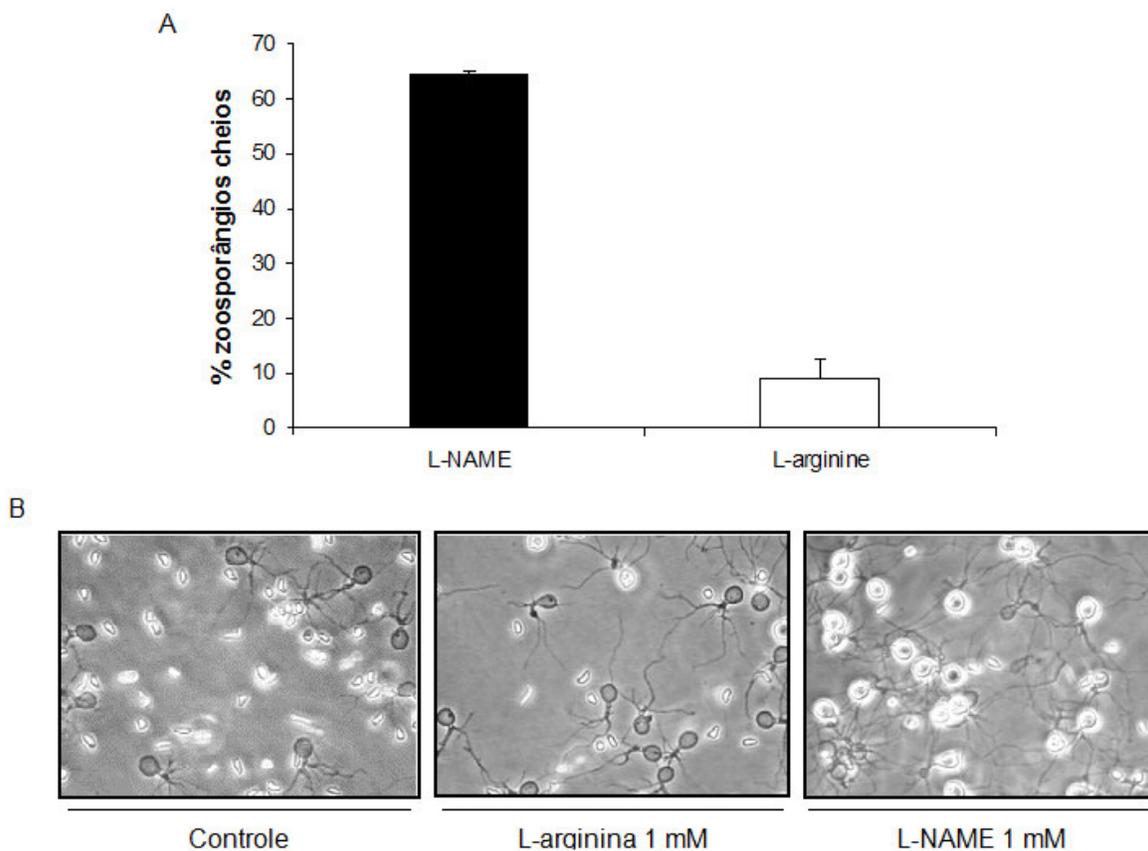


Figura 22: Efeito do L-NAME sobre a esporulação de *B. emersonii*. A- O efeito inibidor do L-NAME e da L-arginina é indicado pela percentagem de zoosporângios cheios. B- Micrografias de zoosporângios tiradas 4 horas após a indução da esporulação.

As observações mencionadas acima sugeriram a existência de um mecanismo enzimático do tipo óxido nítrico sintase (NOS) para a produção de  $\bullet\text{NO}$  a partir de L-arginina em *B. emersonii*. Esse mecanismo envolve a oxidação, dependente de NADPH, de cinco elétrons da L-arginina por  $\text{O}_2$ , resultando em  $\bullet\text{NO}$  e o aminoácido de L-citrulina, com a formação do intermediário  $N^{\text{G}}$ -hidroxi-L-arginina.

De fato, como mostrado na figura 23, a adição de L-arginina à solução de esporulação desencadeia um aumento na produção de  $\bullet\text{NO}$ , quando comparado com zoosporângios tratados ou não com L-NAME.

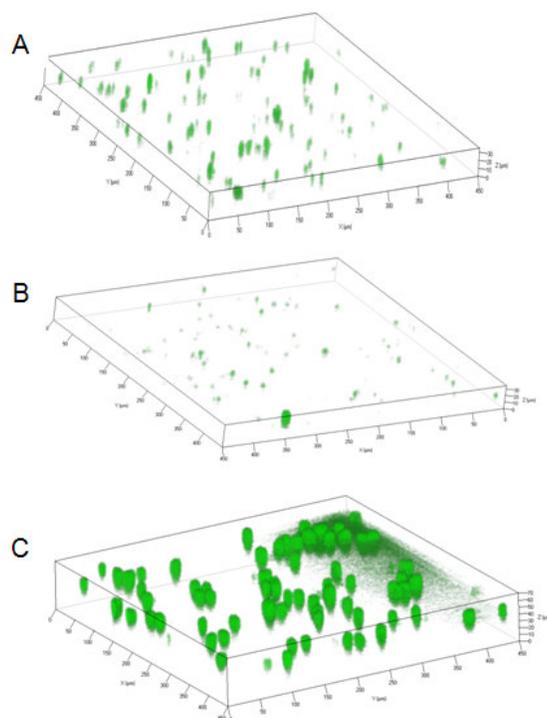


Figura 23: Efeito da L-arginina sobre a produção de  $\bullet\text{NO}$  em zoosporângios de *B. emersonii*. A, B e C mostram a quantidade de  $\bullet\text{NO}$  presente em zoosporângios (150 minutos) não tratados (controle), tratados com L-NAME (1 mM) e tratados com L-arginina (1 mM), respectivamente. As figuras são reconstruções tridimensionais de imagens tomadas em diferentes focos por um microscópio confocal de varredura a laser.

Com o objetivo de investigar a existência de atividade do tipo NOS em extratos de zoosporângios de *B. emersonii*, ensaios de atividade NOS foram realizados como descrito em Materiais e Métodos (item 3.22). A figura 24a mostra que durante a esporulação de *B. emersonii* não só existe uma atividade do tipo NOS, mas também que tal atividade é reduzida por inibidores de NOS tais como L-NAME e 1-[2-(Trifluoromethyl)phenyl]imidazole (TRIM), adicionados à reação na concentração final de 1 mM (Figura 24b).

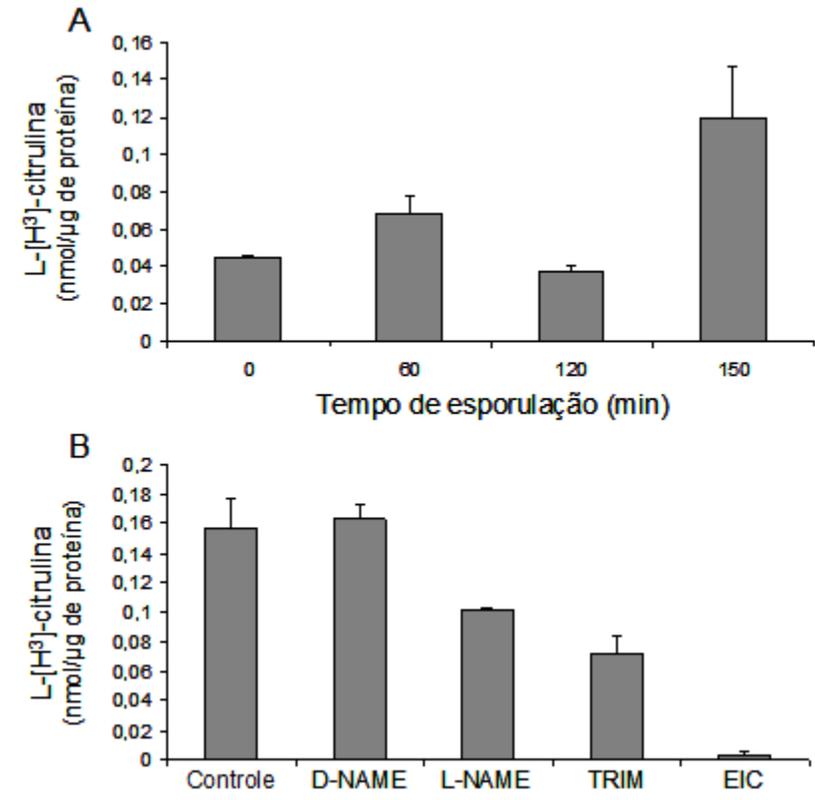


Figura 24: Ensaio de atividade óxido nítrico sintase. A- Atividade NOS putativa determinada através da quantificação de L-[H<sup>3</sup>]-citrulina produzida a partir de L-[H<sup>3</sup>]-arginina em extratos de zoosporângios de diferentes pontos da esporulação. B- Inibição parcial da atividade NOS em extratos de zoosporângios de 150 minutos por L-NAME e TRIM, ambos na concentração final de 1 mM. D-NAME na concentração de 1 mM foi usado como controle, assim como extrato celular inativado por calor (EIC).

Assim como em *B. emersonii*, a produção de  $\bullet\text{NO}$  em outros fungos foi atribuída a enzimas do tipo NOS, as quais também podem ser completa ou parcialmente inibidas por análogos da L-arginina, tal como o L-NAME (Maier *et al.*, 2001; Ninnemann and Maier, 1996; Wang and Higgins, 2005). No entanto, nenhum gene que codifique uma enzima do tipo NOS foi descrito em fungos cujos genomas já foram sequenciados. O mesmo acontece com as plantas, onde atividades do tipo NOS foram descritas mas nenhum gene codificando

uma proteína com atividade NOS foi isolado (Durner and Klessig, 1999; Mur et al., 2006). Uma explicação possível para esse paradoxo poderia ser a existência de um complexo protéico com função óxido nítrico sintase nesses organismos. Além disso, outros mecanismos enzimáticos são capazes de gerar  $\bullet\text{NO}$ , tais como as enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, as quais podem estar envolvidas no aumento dos níveis intracelulares desse radical livre (Modolo et al., 2005; Rockel et al., 2002).

Devido ao fato de que a esporulação de *B. emersonii* é dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular e de que algumas NOS são ativadas por altos níveis intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  (Alderton et al., 2001; Wendehenne et al., 2001), o efeito do EGTA sobre a atividade NOS putativa de *B. emersonii* foi avaliado. Inicialmente, os resultados obtidos por Coutinho & Correa (1999), em relação à rápida captação de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular nos primeiros minutos da esporulação, foram validados utilizando um indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Fluo3) e microscopia confocal a laser. Como mostra a figura 25a-b, 10 minutos após a indução da esporulação, é possível visualizar o  $\text{Ca}^{2+}$  captado pelos zoosporângios, confirmando os dados obtidos por Coutinho & Correa (1999) e reafirmando a importância desse íon em eventos dele dependentes durante a esporulação de *B. emersonii*. De fato, a atividade NOS em extratos de zoosporângios de 150 minutos de esporulação foi reduzida na presença de EGTA, sugerindo a existência de uma atividade do tipo NOS dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  em *B. emersonii* (Figura 25c).

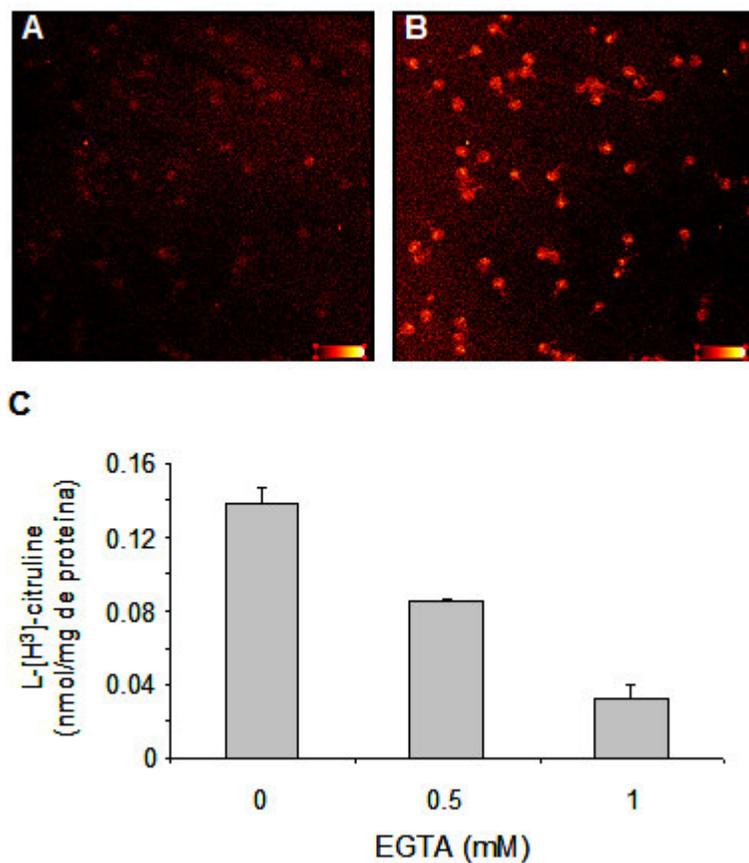


Figura 25: Captação de  $\text{Ca}^{2+}$  no início da esporulação e seu envolvimento na atividade NOS de *B. emersonii*. A e B mostram a rápida captação de  $\text{Ca}^{2+}$  por zoosporângios incubados com Fluo 3, um indicador fluorescente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Em C é mostrado o efeito do EGTA sobre a atividade óxido nítrico sintase em extrato de zoosporângios (150 minutos de esporulação).

## 5. Conclusões Finais

Este trabalho gerou dados de expressão gênica global ao longo da fase de esporulação de *B. emersonii*, os quais permitiram uma melhor compreensão do programa de expressão gênica que determina as alterações bioquímicas e morfológicas responsáveis pela diferenciação e liberação dos zoósporos. Também foi possível analisar os efeitos de dois nutrientes (glicose e triptofano) sobre a expressão gênica durante a esporulação, correlacionando alterações observadas no padrão de expressão gênica com o efeito inibidor desses nutrientes sobre a diferenciação e liberação dos zoósporos. Sendo assim, as principais conclusões dessa parte do trabalho foram:

- Durante a fase de esporulação de *B. emersonii* ocorre uma mudança profunda nos níveis de expressão de um grande número de genes (615 genes induzidos e 645 genes reprimidos), refletindo não apenas a regulação em nível transcricional que ocorre durante a esporulação, mas também a necessidade de diferentes funções moleculares para a formação dos zoósporos, que são liberados para o meio no final dessa fase do desenvolvimento do fungo.
- As categorias funcionais mais representadas entre os genes induzidos foram: microtúbulo e citoesqueleto, transdução de sinal, atividade de ligação ao íon  $\text{Ca}^{2+}$ , proteólise (apenas no início da esporulação) e biogênese e organização do cromossomo (apenas no final da esporulação).
- As categorias funcionais mais representadas entre os genes reprimidos foram: biossíntese de proteína, transporte de carboidratos e metabolismo energético,

indicando que a ausência de nutrientes nesta fase do ciclo é um sinal para a regulação desses genes.

- Os dados do perfil transcricional obtidos em nossos experimentos correlacionaram-se bem com os processos bioquímicos e fisiológicos associados com a esporulação de *B. emersonii*, sugerindo a existência de um importante controle transcricional durante este estágio.
- Os experimentos de expressão gênica durante a esporulação na presença de glicose 1% sugerem que o bloqueio da diferenciação dos zoósporos observado por Corrêa e Lodi (1986) em elevadas concentrações de glicose pode ser causado pela superexpressão de genes cujos produtos são essenciais à formação e funcionamento do citoesqueleto.
- A análise da expressão gênica durante a esporulação tardia na presença de triptofano (0,01 mM) sugere que o bloqueio da diferenciação dos zoósporos observado por Corrêa e Lodi (1986) pode ser causado pelo estresse oxidativo, o qual pode ser gerado por metabólitos do triptofano. Além disso, genes envolvidos no processo de esporulação tiveram sua expressão reduzida na presença desse aminoácido.
- A comparação dos dados de expressão gênica global ao longo da esporulação, gerados neste trabalho, com aqueles obtidos recentemente em nosso laboratório (Salem-Izacc et al., 2009) durante a germinação mostrou que um grande número de

genes tem sua expressão regulada de maneira inversa ao longo dos dois estágios de diferenciação celular de *B. emersonii*. Estes resultados estão de acordo com o fato de que a germinação é o início da fase de crescimento e a esporulação é uma fase de parada de crescimento. Muitos genes sem função definida foram também regulados de maneira inversa nos dois estágios, indicando um papel importante para esses genes nos dois processos de diferenciação do fungo.

Alguns dados de expressão gênica referentes à transdução de sinal durante a fase de esporulação de *B. emersonii* nos levaram a investigar não apenas a possibilidade da existência de genes envolvidos no metabolismo de cGMP em fungos primitivos, mas também a via de sinalização responsável pela elevação dos níveis desse nucleotídeo cíclico durante a esporulação. Portanto, as principais conclusões dessa segunda parte do trabalho são:

- *Blastocladiella emersonii* expressa pelo menos quatro genes envolvidos com a síntese e degradação de cGMP, sendo que três deles codificam diferentes guanilato ciclases e um gene codifica uma fosfodiesterase de cGMP, cuja seqüência deduzida de aminoácidos apresenta alta similaridade com fosfodiesterases da família 9 de mamíferos, cujos membros apresentam alta especificidade por cGMP.
- Os perfis dos transcritos dos três genes de guanilato ciclase obtidos por experimentos de microarranjos de cDNA e validados por RT-PCR quantitativo estão de acordo com os níveis de cGMP encontrados por Silverman & Epstein

(1975) durante a esporulação de *B. emersonii*. Além disso, as análises de expressão transcricional utilizadas nesse trabalho para determinar a expressão dos transcritos de guanilato ciclase (microarranjos de cDNA, RT-PCR quantitativo e northern blot) sugerem que o gene BeGC1 é mais expresso que os genes BeGC2 e BeGC3.

- Os experimentos de inibição da esporulação por ODQ apontam o  $\bullet\text{NO}$  como modulador positivo da produção de cGMP durante a esporulação de *B. emersonii*;
- A presença de compostos derivados de  $\bullet\text{NO}$ , tais como s-nitrosotióis, nitrosil-heme e nitrosaminas, durante a esporulação não apenas fornece evidências indiretas de sua produção como também sugere a participação desse radical em eventos de transmissão de sinal durante a biogênese dos zoósporos.
- O atraso da esporulação provocado por L-NAME bem como a redução da atividade de óxido nítrico sintase por L-NAME e TRIM sugere a existência de um mecanismo enzimático do tipo NOS em *B. emersonii*, embora outros mecanismos também possam contribuir para a elevação desse radical na célula.
- A redução da atividade de óxido nítrico sintase por EGTA indica a participação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  na síntese de  $\bullet\text{NO}$ , sugerindo a existência de uma via  $\text{Ca}^{2+}$ - $\bullet\text{NO}$ -cGMP, essencial à diferenciação dos zoósporos durante a fase tardia da esporulação de *B. emersonii*.

## 6. Referências bibliográficas

- Aizawa, H., Sutoh, K., Tsubuki, S., Kawashima, S., Ishii, A., and Yahara, I. (1995) Identification, characterization, and intracellular distribution of cofilin in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **270**: 10923-10932.
- Alderton, W.K., Cooper, C.E., and Knowles, R.G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* **357**: 593-615.
- Almeida, B., Buttner, S., Ohlmeier, S., Silva, A., Mesquita, A., Sampaio-Marques, B., Osorio, N.S., Kollau, A., Mayer, B., Leao, C., Laranjinha, J., Rodrigues, F., Madeo, F., and Ludovico, P. (2007) NO-mediated apoptosis in yeast. *J Cell Sci* **120**: 3279-3288.
- Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., and Murad, F. (1977) Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3203-3207.
- Baker, D.A., and Kelly, J.M. (2004) Purine nucleotide cyclases in the malaria parasite. *Trends Parasitol* **20**: 227-232.
- Barbieri, C.L., and Camargo, E.P. (1975) Esterase activity during the life cycle of *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol* **124**: 1626-1627.
- Belenghi, B., Romero-Puertas, M.C., Vercammen, D., Brackener, A., Inze, D., Delledonne, M., and Van Breusegem, F. (2007) Metacaspase activity of *Arabidopsis thaliana* is regulated by S-nitrosylation of a critical cysteine residue. *J Biol Chem* **282**: 1352-1358.
- Bhattacharya, R., and Cabral, F. (2004) A ubiquitous beta-tubulin disrupts microtubule assembly and inhibits cell proliferation. *Mol Biol Cell* **15**: 3123-3131.
- Bonato, M.C., Silva, A.M., Gomes, S.L., Maia, J.C., and Juliani, M.H. (1987) Differential expression of heat-shock proteins and spontaneous synthesis of HSP70 during the life cycle of *Blastocladiella emersonii*. *Eur J Biochem* **163**: 211-220.
- Bosgraaf, L., Russcher, H., Snippe, H., Bader, S., Wind, J., and Van Haastert, P.J. (2002) Identification and characterization of two unusual cGMP-stimulated phosphodiesterases in *dictyostelium*. *Mol Biol Cell* **13**: 3878-3889.
- Buck, J., Sinclair, M.L., Schapal, L., Cann, M.J., and Levin, L.R. (1999) Cytosolic adenylyl cyclase defines a unique signaling molecule in mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 79-84.

- Camargo, E.P., Dietrich, C.P., Sonneborn, D., and Strominger, J.L. (1967) Biosynthesis of chitin in spores and growing cells of *Blastocladiella emersonii*. *J Biol Chem* **242**: 3121-3128.
- Campos, C.B., Di Benedette, J.P., Morais, F.V., Ovalle, R., and Nobrega, M.P. (2008) Evidence for the role of calcineurin in morphogenesis and calcium homeostasis during mycelium-to-yeast dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Eukaryot Cell* **7**: 1856-1864.
- Carminati, J.L., and Stearns, T. (1997) Microtubules orient the mitotic spindle in yeast through dynein-dependent interactions with the cell cortex. *J Cell Biol* **138**: 629-641.
- Chvanov, M., Gerasimenko, O.V., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2006) Calcium-dependent release of NO from intracellular S-nitrosothiols. *Embo J* **25**: 3024-3032.
- Cleveland, D.W., and Sullivan, K.F. (1985) Molecular biology and genetics of tubulin. *Annu Rev Biochem* **54**: 331-365.
- 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. In: International Conference on Limited Proteolysis in Microorganisms. G.N. Cohen and H. Holzer (eds.), U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C., pp. 127-130.
- Correa, L.C., and Lodi, W.R. (1986) Induction of Sporulation in *Blastocladiella emersonii*: Influence of Nutritional Variables. *Experimental Mycology* **10**: 270-280.
- Coutinho, E.C., and Correa, L.C. (1999) The induction of sporulation in the aquatic fungus *blastocladiella emersonii* is dependent on extracellular calcium. *FEMS Microbiol Lett* **179**: 353-359.
- da Silva, A.M., da Costa Maia, J.C., and Juliani, M.H. (1986) Developmental changes in translatable RNA species and protein synthesis during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ* **18**: 263-274.
- da Silva, A.M., and Juliani, M.H. (1988) Regulation of tubulin and actin synthesis and accumulation during *Blastocladiella emersonii* development. *Cell Differ* **24**: 45-54.
- Darmon, M., and Klein, C. (1978) Effects of amino acids and glucose on adenylate cyclase and cell differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Dev Biol* **63**: 377-389.
- de Oliveira, J.C., Borges, A.C., Marques Mdo, V., and Gomes, S.L. (1994) Cloning and characterization of the gene for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eur J Biochem* **219**: 555-562.

- de Souza, F.S., and Gomes, S.L. (1998) A P-type ATPase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* similar to animal Na,K-ATPases. *Biochim Biophys Acta* **1383**: 183-187.
- Durner, J., and Klessig, D.F. (1999) Nitric oxide as a signal in plants. *Curr Opin Plant Biol* **2**: 369-374.
- Enyenihi, A.H., and Saunders, W.S. (2003) Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **163**: 47-54.
- Eshel, D., Urrestarazu, L.A., Vissers, S., Jauniaux, J.C., van Vliet-Reedijk, J.C., Planta, R.J., and Gibbons, I.R. (1993) Cytoplasmic dynein is required for normal nuclear segregation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 11172-11176.
- Farmer, S.R., Robinson, G.S., Mbangkollo, D., Bond, J.F., Knight, G.B., Fenton, M.J., and Berkowitz, E.M. (1986) Differential expression of the beta-tubulin multigene family during rat brain development. *Ann N Y Acad Sci* **466**: 41-50.
- Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1984) "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal Biochem* **137**: 266-267.
- Feksa, L.R., Latini, A., Rech, V.C., Wajner, M., Dutra-Filho, C.S., de Souza Wyse, A.T., and Wannmacher, C.M. (2006) Promotion of oxidative stress by L-tryptophan in cerebral cortex of rats. *Neurochem Int* **49**: 87-93.
- Feksa, L.R., Latini, A., Rech, V.C., Feksa, P.B., Koch, G.D., Amaral, M.F., Leipnitz, G., Dutra-Filho, C.S., Wajner, M., and Wannmacher, C.M. (2008) Tryptophan administration induces oxidative stress in brain cortex of rats. *Metab Brain Dis* **23**: 221-233.
- Fietto, L.G., Pugliese, L., and Gomes, S.L. (2002) Characterization and expression of two genes encoding isoforms of a putative Na, K-ATPase in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Biochim Biophys Acta* **1576**: 59-69.
- Forrest, C.M., Mackay, G.M., Stoy, N., Egerton, M., Christofides, J., Stone, T.W., and Darlington, L.G. (2004) Tryptophan loading induces oxidative stress. *Free Radic Res* **38**: 1167-1171.
- Friebe, A., and Koesling, D. (2003) Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Circ Res* **93**: 96-105.
- Gaertner, F.H., Cole, K.W., and Welch, G.R. (1971) Evidence for distinct kynureninase and hydroxykynureninase activities in *Neurospora crassa*. *J Bacteriol* **108**: 902-909.
- Gaertner, F.H., and Shetty, A.S. (1975) Hydroxykynureninase and the excretion of 3-hydroxyanthranilate by yeast. *Acta Vitaminol Enzymol* **29**: 332-334.

- García-Pedrajas M.D., Nadal M., Bölker M., Gold S.E., Perlin M.H. (2008) Sending mixed signals: redundancy vs. uniqueness of signaling components in the plant pathogen, *Ustilago maydis*. *Fungal Genet Biol.* **45** Suppl 1:S22-30.
- Garthwaite, J., Southam, E., Boulton, C.L., Nielsen, E.B., Schmidt, K., and Mayer, B. (1995) Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. *Mol Pharmacol* **48**: 184-188.
- Georg, R.C., and Gomes, S.L. (2007) Transcriptome analysis in response to heat shock and cadmium in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell* **6**: 1053-1062.
- Goldberg, N.D., Ames, A.A., 3rd, Gander, J.E., and Walseth, T.F. (1983) Magnitude of increase in retinal cGMP metabolic flux determined by <sup>18</sup>O incorporation into nucleotide alpha-phosphoryls corresponds with intensity of photic stimulation. *J Biol Chem* **258**: 9213-9219.
- Golderer, G., Werner, E.R., Leitner, S., Grobner, P., and Werner-Felmayer, G. (2001) Nitric oxide synthase is induced in sporulation of *Physarum polycephalum*. *Genes Dev* **15**: 1299-1309.
- Gomes, S.L., Mennucci, L., and da Costa Maia, J.C. (1978) Adenylate cyclase activity and cyclic AMP metabolism during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Biochim Biophys Acta* **541**: 190-198.
- Gomes, S.L., and Da Costa Maia, J.C. (1979) Differential effects of manganese ions on *Blastocladiella emersonii* adenylate cyclase. *Biochim Biophys Acta* **567**: 257-264.
- Gomes, S.L., Mennucci, L., and Carlos da Costa Maia, J. (1980a) Calcium efflux during germination of *Blastocladiella emersonii*. *Dev Biol* **77**: 157-166.
- Gomes, S.L., Mennucci, L., and da Costa Maia J.C. (1980b) Induction of *Blastocladiella emersonii* germination by cyclic Adenosine-3',5'-monophosphate. *Cell differentiation* **9**: 169-179.
- Gong, X., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Yi, X., and Peng, Y. (2007) L-arginine is essential for conidiation in the filamentous fungus *Coniothyrium minitans*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1368-1379.
- Goodman, L.A. and Kruskal, W.H. (1954) Measures of association for cross classifications. *J. Am. Stat. Assoc.* **49**: 732-764.
- Gottschalk, W.K., and Sonneborn, D.R. (1982) Phenotypic dissections of the *Blastocladiella emersonii* zoospore's developmental choice. *Dev Biol* **93**: 165-180.

- Gunsalus, K.C., Bonaccorsi, S., Williams, E., Verni, F., Gatti, M., and Goldberg, M.L. (1995) Mutations in *twinstar*, a *Drosophila* gene encoding a cofilin/ADF homologue, result in defects in centrosome migration and cytokinesis. *J Cell Biol* **131**: 1243-1259.
- Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges, S.B. (2001) Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**: 1129-1133.
- Hohn, T.M., Lovett, J.S., and Bracker, C.E. (1984) Characterization of the major proteins in gamma particles, cytoplasmic organelles in *Blastocladiella emersonii* zoospores. *J Bacteriol* **158**: 253-263.
- Iida, K., Moriyama, K., Matsumoto, S., Kawasaki, H., Nishida, E., and Yahara, I. (1993) Isolation of a yeast essential gene, COF1, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-M(r) actin-binding and depolymerizing protein. *Gene* **124**: 115-120.
- Iida, K., and Yahara, I. (1999) Cooperation of two actin-binding proteins, cofilin and Aip1, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* **4**: 21-32.
- Inoue, S., Turgeon, B.G., Yoder, O.C., and Aist, J.R. (1998) Role of fungal dynein in hyphal growth, microtubule organization, spindle pole body motility and nuclear migration. *J Cell Sci* **111** ( Pt 11): 1555-1566.
- Jaworski, A.J., and Thomson, K. (1980) A temporal analysis of the synthesis of the mRNA sequestered in zoospores of *Blastocladiella emersonii*. *Dev Biol* **75**: 343-357.
- Jaworski, A.J., and Stumhofer, P. (1981) Stage-specific synthesis of proteins complexed to ribonucleoprotein particles and ribosomes in zoospores of *Blastocladiella emersonii*. *Mol Cell Biol* **1**: 310-320.
- Jaworski, A.J., and Stumhofer, P. (1984) Dormant ribosomes in *Blastocladiella emersonii* zoospores are arrested at elongation. *Exp. Mycol.* **8**: 13-24.
- Juliani, M.H., Brochetto, M.R., and Da Costa Maia, J.C. (1979) Changes in cyclic AMP binding and protein kinase activities during growth and differentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ* **8**: 421-430.
- Kanadia, R.N., Kuo, W.N., McNabb, M., and Botchway, A. (1998) Constitutive nitric oxide synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Mol Biol Int* **45**: 1081-1087.
- Kieboom, J., Bruinenberg, R., Keizer-Gunnink, I., and de Bont, J.A. (2001) Transposon mutations in the flagella biosynthetic pathway of the solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 result in a decreased expression of solvent efflux genes. *FEMS Microbiol Lett* **198**: 117-122.

- Knop, M., Finger, A., Braun, T., Hellmuth, K., and Wolf, D.H. (1996) Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J* **15**: 753-763.
- Knowles, R.G., and Moncada, S. (1994) Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* **298 ( Pt 2)**: 249-258.
- Koesling, D., Harteneck, C., Humbert, P., Bosserhoff, A., Frank, R., Schultz, G., and Bohme, E. (1990) The primary structure of the larger subunit of soluble guanylyl cyclase from bovine lung. Homology between the two subunits of the enzyme. *FEBS Lett* **266**: 128-132.
- Koide, T., Salem-Izacc, S.M., Gomes, S.L., and Vencio, R.Z. (2006) SpotWhatR: a user-friendly microarray data analysis system. *Genet Mol Res* **5**: 93-107.
- Koonce, M.P., Kohler, J., Neujahr, R., Schwartz, J.M., Tikhonenko, I., and Gerisch, G. (1999) Dynein motor regulation stabilizes interphase microtubule arrays and determines centrosome position. *Embo J* **18**: 6786-6792.
- Kubler, E., Mosch, H.U., Rupp, S., and Lisanti, M.P. (1997) Gpa2p, a G-protein alpha-subunit, regulates growth and pseudohyphal development in *Saccharomyces cerevisiae* via a cAMP-dependent mechanism. *J Biol Chem* **272**: 20321-20323.
- Kuwayama, H., Ishida, S., and Van Haastert, P.J. (1993) Non-chemotactic *Dictyostelium discoideum* mutants with altered cGMP signal transduction. *J Cell Biol* **123**: 1453-1462.
- Li, Y.Y., Yeh, E., Hays, T., and Bloom, K. (1993) Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 10096-10100.
- Linder, J.U., Engel, P., Reimer, A., Kruger, T., Plattner, H., Schultz, A., and Schultz, J.E. (1999) Guanylyl cyclases with the topology of mammalian adenylyl cyclases and an N-terminal P-type ATPase-like domain in *Paramecium*, *Tetrahymena* and *Plasmodium*. *Embo J* **18**: 4222-4232.
- Linder, J.U., and Schultz, J.E. (2002) Guanylyl cyclases in unicellular organisms. *Mol Cell Biochem* **230**: 149-158.
- Liu, Y., Ruoho, A.E., Rao, V.D., and Hurley, J.H. (1997) Catalytic mechanism of the adenylyl and guanylyl cyclases: modeling and mutational analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13414-13419.
- Lodi, W.R., and Sonneborn, D.R. (1974) Protein degradation and protease activity during the late cycle of *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol* **117**: 1035-1042.

- 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**: 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**: 345-404.
- Lundquist, E.A. (2006) Small GTPases. *WormBook*: 1-18.
- Maia, J.C., and Camargo, E.P. (1974) c-AMP phosphodiesterase activity during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *Cell Differ* **3**: 147-155.
- Maia, J.C., Gomes, S.L., and Mennucci, L. (1979) Induction of germination in *Blastocladiella emersonii* by cyclic AMP and inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Arch Biol Med Exp (Santiago)* **12**: 407-410.
- Maia, J.C. (1994) Hexosamine and cell wall biogenesis in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Faseb J* **8**: 848-853.
- Maier, J., Hecker, R., Rockel, P., and Ninnemann, H. (2001) Role of nitric oxide synthase in the light-induced development of sporangiophores in *Phycomyces blakesleanus*. *Plant Physiol* **126**: 1323-1330.
- Marques Mdo, V., Juliani, M.H., Maia, J.C., and Gomes, S.L. (1989) Developmental regulation of expression of the regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase of *Blastocladiella emersonii*. *Eur J Biochem* **178**: 803-810.
- Marques Mdo, V., Borges, A.C., de Oliveira, J.C., and Gomes, S.L. (1992) Coordinate pretranslational control of cAMP-dependent protein kinase subunit expression during development in the water mold *Blastocladiella emersonii*. *Dev Biol* **149**: 432-439.
- Marques Mdo, V., and Gomes, S.L. (1992) Cloning and structural analysis of the gene for the regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Blastocladiella emersonii*. *J Biol Chem* **267**: 17201-17207.
- Matsumoto, K., Uno, I., Oshima, Y., and Ishikawa, T. (1982) Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 2355-2359.
- Matsuo Y., McInnis B., Marcus S. (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):1450-9.

- McKim, K.S., Matheson, C., Marra, M.A., Wakarchuk, M.F., and Baillie, D.L. (1994) The *Caenorhabditis elegans* unc-60 gene encodes proteins homologous to a family of actin-binding proteins. *Mol Gen Genet* **242**: 346-357.
- McNally, K., Audhya, A., Oegema, K., and McNally, F.J. (2006) Katanin controls mitotic and meiotic spindle length. *J Cell Biol* **175**: 881-891.
- Modolo, L.V., Augusto, O., Almeida, I.M., Magalhaes, J.R., and Salgado, I. (2005) Nitrite as the major source of nitric oxide production by *Arabidopsis thaliana* in response to *Pseudomonas syringae*. *FEBS Lett* **579**: 3814-3820.
- Moncada, S., and Higgs, E.A. (1991) Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* **21**: 361-374.
- Moon, A.L., Janmey, P.A., Louie, K.A., and Drubin, D.G. (1993) Cofilin is an essential component of the yeast cortical cytoskeleton. *J Cell Biol* **120**: 421-435.
- Morton, D.B., and Nighorn, A. (2003) MsGC-II, a receptor guanylyl cyclase isolated from the CNS of *Manduca sexta* that is inhibited by calcium. *J Neurochem* **84**: 363-372.
- Morton, D.B. (2004) Atypical soluble guanylyl cyclases in *Drosophila* can function as molecular oxygen sensors. *J Biol Chem* **279**: 50651-50653.
- Mur, L.A., Carver, T.L., and Prats, E. (2006) NO way to live; the various roles of nitric oxide in plant-pathogen interactions. *J Exp Bot* **57**: 489-505.
- Murphy, M.N., and Lovett, J.S. (1966) RNA and protein synthesis during zoospore differentiation in synchronized cultures of *Blastocladiella*. *Dev Biol* **14**: 68-95.
- Nakase, Y., Nakamura, T., Hirata, A., Routt, S.M., Skinner, H.B., Bankaitis, V.A., and Shimoda, C. (2001) The *Schizosaccharomyces pombe* spo20(+) gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Sec14 plays an important role in forespore membrane formation. *Mol Biol Cell* **12**: 901-917.
- Ninnemann, H., and Maier, J. (1996) Indications for the occurrence of nitric oxide synthases in fungi and plants and the involvement in photoconidiation of *Neurospora crassa*. *Photochem Photobiol* **64**: 393-398.
- Nunes, L.R., Costa de Oliveira, R., Leite, D.B., da Silva, V.S., dos Reis Marques, E., da Silva Ferreira, M.E., Ribeiro, D.C., de Souza Bernardes, L.A., Goldman, M.H., Puccia, R., Travassos, L.R., Batista, W.L., Nobrega, M.P., Nobrega, F.G., Yang, D.Y., de Braganca Pereira, C.A., and Goldman, G.H. (2005) Transcriptome analysis of *Paracoccidioides brasiliensis* cells undergoing mycelium-to-yeast transition. *Eukaryot Cell* **4**: 2115-2128.
- Peralta, R.M., and Lodi, W.R. (1988) An analysis of developmental timing in *Blastocladiella emersonii* sporulation. *Dev Biol* **128**: 78-85.

- Pocsi, I., Prade, R.A., and Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* **49**: 1-76.
- Potter, L.R., and Hunter, T. (2001) Guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors: structure and regulation. *J Biol Chem* **276**: 6057-6060.
- Powell, M.J. (1993) Looking at micology with a janus face: a glimpse at chytridiomycetes active in the environment. *Mycologia* **85**: 1-20.
- Quackenbush, J. (2001) Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet* **2**: 418-427.
- Rauch, A., Leipelt, M., Russwurm, M., and Steegborn, C. (2008) Crystal structure of the guanylyl cyclase Cya2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15720-15725.
- Ribichich, K.F., Salem-Izacc, S.M., Georg, R.C., Vencio, R.Z., Navarro, L.D., and Gomes, S.L. (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**: 455-464.
- Rocha, C.R., and Gomes, S.L. (1999) Characterization and submitochondrial localization of the alpha subunit of the mitochondrial processing peptidase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol* **181**: 4257-4265.
- Rockel, P., Strube, F., Rockel, A., Wildt, J., and Kaiser, W.M. (2002) Regulation of nitric oxide (NO) production by plant nitrate reductase in vivo and in vitro. *J Exp Bot* **53**: 103-110.
- Roelofs, J., Snippe, H., Kleineidam, R.G., and Van Haastert, P.J. (2001) Guanylate cyclase in *Dictyostelium discoideum* with the topology of mammalian adenylate cyclase. *Biochem J* **354**: 697-706.
- Ross, A.F., Green, W.N., Hartman, D.S., and Claudio, T. (1991) Efficiency of acetylcholine receptor subunit assembly and its regulation by cAMP. *J Cell Biol* **113**: 623-636.
- Salem-Izacc, S.M., Koide, T., Vencio, R.Z., and Gomes, S.L. (2009) Global gene expression analysis during germination in the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *Eukaryot Cell*.
- Sanjust, E., Cecchini, G., Sollai, F., Curreli, N., and Rescigno, A. (2003) 3-hydroxykynurenine as a substrate/activator for mushroom tyrosinase. *Arch Biochem Biophys* **412**: 272-278.
- Santangelo, G.M. (2006) Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* **70**(1):253-82.
- Schaap, P. (2005) Guanylyl cyclases across the tree of life. *Front Biosci* **10**: 1485-1498.

- Schrammel, A., Behrends, S., Schmidt, K., Koesling, D., and Mayer, B. (1996) Characterization of 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one as a heme-site inhibitor of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. *Mol Pharmacol* **50**: 1-5.
- Selitrennikoff, C.P., and Sonneborn, D.R. (1977) Alkaline phosphatase of *Blastocladiella emersonii*: partial purification and characterization. *J Bacteriol* **130**: 249-256.
- Shah, S., and Hyde, D.R. (1995) Two *Drosophila* genes that encode the alpha and beta subunits of the brain soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* **270**: 15368-15376.
- Shaulsky, G., Escalante, R., and Loomis, W.F. (1996) Developmental signal transduction pathways uncovered by genetic suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15260-15265.
- Shetty, A.S., and Gaertner, F.H. (1973) Distinct kynureninase and hydroxykynureninase activities in microorganisms: occurrence and properties of a single physiologically discrete enzyme in yeast. *J Bacteriol* **113**: 1127-1133.
- Shetty, A.S., and Gaertner, F.H. (1975) Kynureninase-Type enzymes of *Penicillium roqueforti*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*, and *Pseudomonas fluorescens*: further evidence for distinct kynureninase and hydroxykynureninase activities. *J Bacteriol* **122**: 235-244.
- Shin, M., Shinguu, T., Sano, K., and Umezawa, C. (1991) Metabolic fates of L-tryptophan in *Saccharomyces uvarum* (*Saccharomyces carlsbergensis*). *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **39**: 1792-1795.
- Silva, A.M., Maia, J.C., and Juliani, M.H. (1987) Changes in the pattern of protein synthesis during zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol* **169**: 2069-2078.
- Silverman, P.M., and Epstein, P.M. (1975) Cyclic nucleotide metabolism coupled to cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 442-446.
- Silverman, P.M. (1976) Regulation of guanylate cyclase activity during cytodifferentiation of *Blastocladiella emersonii*. *Biochem Biophys Res Commun* **70**: 381-388.
- Simao, R.C., and Gomes, S.L. (2001) Structure, expression, and functional analysis of the gene coding for calmodulin in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. *J Bacteriol* **183**: 2280-2288.
- Singh, S., Lowe, D.G., Thorpe, D.S., Rodriguez, H., Kuang, W.J., Dangott, L.J., Chinkers, M., Goeddel, D.V., and Garbers, D.L. (1988) Membrane guanylate cyclase is a cell-surface receptor with homology to protein kinases. *Nature* **334**: 708-712.

- Soderling, S.H., Bayuga, S.J., and Beavo, J.A. (1998) Identification and characterization of a novel family of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *J Biol Chem* **273**: 15553-15558.
- Soll, D.R., and Sonneborn, D.R. (1971a) Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. 3. Structural changes in relation to protein and RNA synthesis. *J Cell Sci* **9**: 679-699.
- Soll, D.R., and Sonneborn, D.R. (1971b) Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*: cell differentiation without protein synthesis? *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 459-463.
- Soll, D.R., and Sonneborn, D.R. (1972) Zoospore germination in *Blastocladiella emersonii*. IV. Ion control over cell differentiation. *J Cell Sci* **10**: 315-333.
- Steen, B.R., Lian, T., Zuyderduyn, S., MacDonald, W.K., Marra, M., Jones, S.J., and Kronstad, J.W. (2002) Temperature-regulated transcription in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res* **12**: 1386-1400.
- Stefani, R.M., and Gomes, S.L. (1995) A unique intron-containing hsp70 gene induced by heat shock and during sporulation in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. *Gene* **152**: 19-26.
- Steinbach, W.J., Cramer, R.A., Jr., Perfect, B.Z., Asfaw, Y.G., Sauer, T.C., Najvar, L.K., Kirkpatrick, W.R., Patterson, T.F., Benjamin, D.K., Jr., Heitman, J., and Perfect, J.R. (2006) Calcineurin controls growth, morphology, and pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryot Cell* **5**: 1091-1103.
- Stie, J., and Fox, D. (2008) Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot Cell* **7**: 177-186.
- Subbaraya, I., Zhao, C., and Duda, T. (2003) Structure and Ca<sup>2+</sup> regulation of frog photoreceptor guanylate cyclase, ROS-GC1. *Mol Cell Biochem* **254**: 9-19.
- Sun, L., and Chen, Z.J. (2004) The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol* **16**: 119-126.
- Tao, Y.P., Misko, T.P., Howlett, A.C., and Klein, C. (1997) Nitric oxide, an endogenous regulator of *Dictyostelium discoideum* differentiation. *Development* **124**: 3587-3595.
- Terenzi, H., and Maia, J.C. (1993) Regulation of adenylyl cyclase from *Blastocladiella emersonii* by guanine nucleotides. *FEBS Lett* **334**: 9-12.
- Turner, J.R. (1973) Tryptophan metabolism and kynureninase induction in mutants of *Neurospora crassa* resistant to 4-methyl-tryptophan. *J Bacteriol* **115**: 640-647.

- Uren, A.G., O'Rourke, K., Aravind, L.A., Pisabarro, M.T., Seshagiri, S., Koonin, E.V., and Dixit, V.M. (2000) Identification of paracaspases and metacaspases: two ancient families of caspase-like proteins, one of which plays a key role in MALT lymphoma. *Mol Cell* **6**: 961-967.
- Vale, M.R., Gomes, S.L., and Maia, J.C. (1975) Independent cAMP and cGMP phosphodiesterases in *Blastocladiella emersonii*. *FEBS Lett* **56**: 332-336.
- Vale, M.R., and Maia, J.C. (1976) Changes in cGMP phosphodiesterase levels during growth and differentiation in *Blastocladiella emersonii*. *FEBS Lett* **70**: 205-208.
- Van der Auwera, G., and De Wachter, R. (1996) Large-subunit rRNA sequence of the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*, and implications for the evolution of zoosporic fungi. *J Mol Evol* **43**: 476-483.
- Vencio, R.Z., and Koide, T. (2005) HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. *DNA Res* **12**: 211-214.
- Vencio, R.Z., Koide, T., Gomes, S.L., and Pereira, C.A. (2006) BayGO: Bayesian analysis of ontology term enrichment in microarray data. *BMC Bioinformatics* **7**: 86.
- Wang, J., and Higgins, V.J. (2005) Nitric oxide has a regulatory effect in the germination of conidia of *Colletotrichum coccodes*. *Fungal Genet Biol* **42**: 284-292.
- Waring, R.B., May, G.S., and Morris, N.R. (1989) Characterization of an inducible expression system in *Aspergillus nidulans* using *alcA* and tubulin-coding genes. *Gene* **79**: 119-130.
- Wendehenne, D., Pugin, A., Klessig, D.F., and Durner, J. (2001) Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* **6**: 177-183.
- Werner-Felmayer, G., Golderer, G., Werner, E.R., Grobner, P., and Wachter, H. (1994) Pteridine biosynthesis and nitric oxide synthase in *Physarum polycephalum*. *Biochem J* **304** ( Pt 1): 105-111.
- Wilson, T.J., Thomsen, K.K., Petersen, B.O., Duus, J.O., and Oliver, R.P. (2003) Detection of 3-hydroxykynurenine in a plant pathogenic fungus. *Biochem J* **371**: 783-788.
- Xiang, X., Roghi, C., and Morris, N.R. (1995) Characterization and localization of the cytoplasmic dynein heavy chain in *Aspergillus nidulans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 9890-9894.
- Yamamoto, A., West, R.R., McIntosh, J.R., and Hiraoka, Y. (1999) A cytoplasmic dynein heavy chain is required for oscillatory nuclear movement of meiotic prophase and efficient meiotic recombination in fission yeast. *J Cell Biol* **145**: 1233-1249.

- Yang, Y.H., Dudoit, S., Luu, P., Lin, D.M., Peng, V., Ngai, J., and Speed, T.P. (2002) Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* **30**: e15.
- Yu, S., Avery, L., Baude, E., and Garbers, D.L. (1997) Guanylyl cyclase expression in specific sensory neurons: a new family of chemosensory receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 3384-3387.
- Zayas, R.M., Qazi, S., Morton, D.B., and Trimmer, B.A. (2000) Neurons involved in nitric oxide-mediated cGMP signaling in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J Comp Neurol* **419**: 422-438.
- Zhao, Y., Brandish, P.E., Ballou, D.P., and Marletta, M.A. (1999) A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14753-14758.
- Zhao, Y., Brandish, P.E., DiValentin, M., Schelvis, J.P., Babcock, G.T., and Marletta, M.A. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry* **39**: 10848-10854.
- Zweier, J.L., Wang, P., Samouilov, A., and Kuppusamy, P. (1995) Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat Med* **1**: 804-809.

# ANEXOS

Anexo 1: Genes transitoriamente reprimidos durante a esporulação de *B. emersonii*.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE120N01C01	No match	1.00	0.11	0.27	0.71	0.47	1
BeE120N20G07	Q9P7J6 40S ribosomal protein S17-B GO:0005622 GO:0	1.00	0.58	0.37	0.31	0.48	1
BeE120N22D12	N/A	1.00	0.47	0.41	0.25	0.61	1
BeE120N27D10	Q90YT9 Ribosomal protein L28 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.58	0.47	0.37	0.44	1
BeE120N28E09	Q9ATF4 Ribosomal protein L33 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.61	0.43	0.24	0.70	1
BeE120N28H03	Q7XMJ1 OSJNBb0006N15.8 protein GO:0005622 GO:00037	1.00	0.51	0.41	0.38	0.42	1
BeE30N02F10	Q9VDV2 CG6195 protein GO:0005525	1.00	0.73	0.61	0.29	0.31	1
BeE30N06F05	No match	1.00	0.28	0.47	0.48	0.13	1
BeE30N06H12	Q86AU7 Similar to Gallus gallus GO:0006857 GO:0005	1.00	0.50	0.32	0.28	0.44	1
BeE30N09B07	Q7RV95 Malate synthase, glyoxysomal GO:0006097 GO:	1.00	0.53	0.33	0.31	0.43	1
BeE30N09E10	No match	1.00	0.71	0.46	0.38	0.60	1
BeE30N11E08	No match	1.00	0.69	0.43	0.37	0.54	1
BeE30N11E09	DNA mismatch repair protein MSH2	1.00	0.44	0.35	0.28	0.61	1
BeE30N11F03	No match	1.00	0.69	0.37	0.44	0.54	1
BeE30N13B01	Q8GUQ9 60S ribosomal protein L38 GO:0005622 GO:000	1.00	0.55	0.41	0.37	0.56	1
BeE30N13H12	Q7QF68 AgCP13420 (Fragment) GO:0006418 GO:0004824	1.00	0.52	0.45	0.35	0.66	1
BeE30N14E03	N/A	1.00	0.55	0.47	0.34	0.35	1
BeE30N15A04	P79083 Eukaryotic translation initiation factor 3	1.00	0.52	0.41	0.38	0.44	1
BeE30N15E11	Q9LUVH1 Putative 60S ribosomal protein L27A GO:0005	1.00	0.61	0.44	0.33	0.58	1
BeE30N16A03	No match	1.00	0.37	0.26	0.25	0.34	1
BeE30N17H11	Q7RWD9 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.52	0.30	0.27	0.57	1
BeE30N18E04	Q7RYQ5 Hypothetical protein GO:0006418 GO:0004812	1.00	0.57	0.33	0.28	0.49	1
BeE30N19G03	Q9LUVB8 Ribosomal protein L41 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.63	0.38	0.30	0.52	1
BeE30N20C09	Q8TDH2 CLL-associated antigen KW-12 (Fragment) GO:	1.00	0.46	0.32	0.24	0.49	1
BeE30N22E01	O14339 60S ribosomal protein L17-A GO:0005622 GO:0	1.00	0.47	0.38	0.35	0.57	1
BeE60C03F10	No match	1.00	0.63	0.45	0.39	0.65	1
BeE60C05D09	No match	1.00	0.70	0.44	0.30	0.29	1
BeE60C11F11	P22768 Argininosuccinate synthase GO:0000052 GO:00	1.00	0.29	0.17	0.37	0.27	1
BeE60C24G08	Q8XRK0 Hypothetical protein RSp0831 GO:0046821	1.00	0.51	0.37	0.35	0.64	1
BeE60C31A02-1	No match	1.00	0.42	0.37	0.38	0.53	1
BeE60H03G06	No match	1.00	0.63	0.44	0.39	0.52	1
BeE60H04A08	No match	1.00	0.59	0.36	0.32	0.60	1
BeE60H06G05	No match	1.00	0.77	0.43	0.34	0.56	1
BeE60H09C09	N/A	1.00	0.67	0.54	0.34	0.60	1
BeE60H10H07	N/A	1.00	0.64	0.45	0.36	0.74	1
BeE60H12F03	N/A	1.00	0.51	0.31	0.24	0.60	1
BeE60H15C05	P87144 Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic GO:00	1.00	0.34	0.34	0.31	0.23	1
BeE60H21G01	Q7PMI7 ENSANGP00000021048 (Fragment) GO:0004411 GO	1.00	0.43	0.34	0.32	0.23	1
BeE60H23E04	O42952 40S ribosomal protein S30 GO:0003735	1.00	0.52	0.47	0.36	0.42	1
BeE60H29E01	Q84JS5 Hypothetical protein GO:0006950	1.00	0.36	0.28	0.47	0.26	1
BeE60H29G11	Q9P6I2 Glutamate carboxypeptidase-like protein GO:	1.00	0.57	0.34	0.37	0.46	1
BeE60H30F10	Q10481 Mitochondrial import inner membrane translo	1.00	0.77	0.37	0.23	0.38	1
BeE60H30G03	No match	1.00	0.56	0.36	0.30	0.57	1
BeE60H31F05	N/A	1.00	0.53	0.30	0.28	0.62	1
BeE60H31G05	Q7Q1H1 AgCP8372 GO:0004245 GO:0006508 GO:0008237 G	1.00	0.82	0.39	0.29	0.41	1
BeE60H32A05	No match	1.00	0.58	0.40	0.37	0.51	1
BeE60H32E04	O42993 FK506-binding protein GO:0003755 GO:0016853	1.00	1.19	0.44	0.23	0.19	1
BeE60H32F04	No match	1.00	0.54	0.40	0.33	0.54	1
BeE60N01B04	No match	1.00	0.59	0.43	0.41	0.35	1
BeE60N02F01	Q7SEL5 Hypothetical protein GO:0008152 GO:0016779	1.00	0.93	0.55	0.25	0.18	1
BeE60N05E11	No match	1.00	0.48	0.43	0.55	0.41	1
BeE60N10C01	multiubiquitin chain-binding protein [Physcomitrel	1.00	0.82	0.39	0.20	0.40	1
BeE60N10H11	ENSANGP00000021149 [Anopheles gambiae]	1.00	0.41	0.38	0.21	0.59	1
BeE60N13C09	P07144 Outer mitochondrial membrane protein porin	1.00	0.67	0.37	0.21	0.21	1
BeE60N15A08	delta-5 fatty acid desaturase [Mortierella alpina]	1.00	0.59	0.41	0.28	0.37	1
BeE60N17B06	Q80111 Ribosomal protein L7A (Fragment) GO:0005622	1.00	0.47	0.41	0.41	0.49	1
BeE90D04H01	0	1.00	0.50	0.35	0.16	0.41	1
BeE90D06C11	0	1.00	0.50	0.38	0.32	0.51	1
BeE90D08A05	0	1.00	0.33	0.49	0.54	0.32	1
BeE90D11C10	>Q7PSW8 ENSANGP00000023750 GO:0005622 GO:0003735 GO:0C	1.00	0.52	0.41	0.35	0.38	1
BeE90D12F12	0	1.00	0.83	0.43	0.35	0.49	1
BeE90D13B10	>Q90YT9 Ribosomal protein L28 GO:0005622 GO:0003735 GO:0005E	1.00	0.57	0.40	0.25	0.42	1
BeE90D13D07	>Q60008 Heat shock protein 60, mitochondrial precursor GO:0005739	1.00	0.54	0.32	0.16	0.42	1
BeE90D16A02	>Q93VC6 Putative 40S ribosomal protein S5 GO:0005622 GO:000373	1.00	0.61	0.36	0.22	0.37	1
BeE90D16G02	>Q7RVY8 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735 GO:000584I	1.00	0.49	0.39	0.31	0.54	1
BeE90D17F12	>Q9UVH9 Fox2 protein GO:0008152 GO:0016491 GO:0005498	1.00	0.54	0.42	0.42	0.42	1
BeE90D17G07	>Q9P4D7 Long chain polyunsaturated fatty acid elongation enzyme GC	1.00	0.64	0.28	0.36	0.23	1
BeE90D17G08	>P49397 40S ribosomal protein S3a GO:0005622 GO:0003735 GO:00	1.00	0.60	0.44	0.28	0.55	1
BeE90D18B03	>Q7RUZ7 Hypothetical protein GO:0004352 GO:0006520 GO:001649	1.00	0.53	0.47	0.44	0.17	1
BeE90N11H01	hypothetical protein CNG01710 [Cryptococcus neofo	1.00	0.60	0.44	0.30	0.79	1
BeE90N17C02-1	Q83PF0 Putative aldolase yihT GO:0016829	1.00	0.73	0.39	0.31	0.53	1
BeG120N01H09	Q7SEP1 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.58	0.42	0.32	0.56	1
BeG120N02D04	No match	1.00	0.57	0.44	0.26	0.36	1
BeG120N03B09	P04643 40S ribosomal protein S11 GO:0005622 GO:000	1.00	0.53	0.37	0.21	0.52	1

BeG120N04D02	Q90YP9 40S ribosomal protein S25 GO:0003735	1.00	0.75	0.26	0.29	0.62	1
BeG120N04E02	Q7SF16 Hypothetical protein GO:0003723 GO:0003743	1.00	0.44	0.47	0.44	0.49	1
BeG120N06A04	Q9SIP7 40S ribosomal protein, contains C-terminal	1.00	0.32	0.31	0.31	0.46	1
BeG120N06C12	60s ribosomal protein l12 [Schizosaccharomyces pom	1.00	0.51	0.28	0.25	0.49	1
BeG120N08C09	P52810 40S ribosomal protein S9 GO:0005622 GO:0003	1.00	0.62	0.38	0.22	0.46	1
BeG120N09C02	Q8NIH8 Nuclease Le3 GO:0004519 GO:0003676 GO:00063	1.00	0.47	0.55	0.42	0.19	1
BeG120N11G04	Q874N9 Ribosomal protein L37A GO:0005622 GO:000373	1.00	0.51	0.41	0.36	0.49	1
BeG120N12C07	N/A	1.00	0.36	0.41	0.45	0.73	1
BeG120N12G05	short chain dehydrogenase [Schizosaccharomyces pom	1.00	0.69	0.35	0.44	0.54	1
BeG120N13B09	Q7WDP3 Isovaleryl-CoA dehydrogenase GO:0008470 GO:	1.00	0.60	0.42	0.41	0.57	1
BeG120N13E04	Q9HGT6 Seryl-tRNA synthetase, cytoplasmic GO:00064	1.00	0.61	0.38	0.31	0.30	1
BeG120N16D10	P87216 Protein vip1 GO:0003723 GO:0003676	1.00	0.38	0.43	0.43	0.27	1
BeG120N17C05	O74836 60S ribosomal protein L1-B GO:0005622 GO:00	1.00	0.67	0.39	0.26	0.67	1
BeG120N20B09	P51424 60S ribosomal protein L39 GO:0005622 GO:000	1.00	0.73	0.45	0.33	0.64	1
BeG120N22B01	No match	1.00	0.31	0.18	0.28	1.11	1
BeG120N22D07	Q05506 Arginyl-tRNA synthetase, cytoplasmic GO:000	1.00	0.44	0.28	0.31	0.29	1
BeG120N23D09	Q7S399 Hypothetical protein GO:0016853 GO:0006118	1.00	1.11	0.41	0.27	0.17	1
BeG30N01A06	Q7RZW8 Hypothetical protein GO:0008017	1.00	0.53	0.59	0.27	0.46	1
BeG30N03A08	N/A	1.00	0.59	0.43	0.23	0.36	1
BeG30N07F02	N/A	1.00	0.56	0.33	0.28	0.50	1
BeG30N08C06	Q9C1M3 Septin GO:0007049 GO:0005525	1.00	0.32	0.30	0.43	2.41	1
BeG30N09B10	OSJNBa0033G05.21 [Oryza sativa (japonica cultivar-	1.00	0.69	0.40	0.48	0.35	1
BeG30N09G04	No match	1.00	0.42	0.28	0.36	0.29	1
BeG30N09H02	N/A	1.00	0.56	0.33	0.24	0.89	1
BeG30N09H06	N/A	1.00	0.82	0.32	0.33	0.86	1
BeG30N10A11	N/A	1.00	0.84	0.29	0.31	0.84	1
BeG30N10B04	N/A	1.00	0.44	0.32	0.30	0.87	1
BeG30N10B05	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	0.96	0.32	0.30	0.91	1
BeG30N10B08	N/A	1.00	0.45	0.28	0.26	0.76	1
BeG30N10B09	hypothetical protein [Cytophaga hutchinsonii]	1.00	0.99	0.41	0.32	0.70	1
BeG30N10C03	N/A	1.00	0.80	0.38	0.24	0.84	1
BeG30N10E10	CG5599-PA [Drosophila melanogaster]	1.00	0.64	0.28	0.26	0.73	1
BeG30N10F02	N/A	1.00	0.63	0.32	0.41	0.90	1
BeG30N10F09	N/A	1.00	0.67	0.33	0.30	0.78	1
BeG30N10H02	similar to hypothetical protein FLJ20729 [Homo sap	1.00	0.83	0.36	0.28	0.86	1
BeG30N11D03	N/A	1.00	1.00	0.35	0.31	0.81	1
BeG30N11D04	N/A	1.00	0.58	0.38	0.30	0.59	1
BeG30N11G11	N/A	1.00	0.51	0.31	0.29	0.78	1
BeG30N11H04	N/A	1.00	0.77	0.36	0.35	0.62	1
BeG30N12B08	N/A	1.00	0.50	0.28	0.27	0.74	1
BeG30N12B09	N/A	1.00	0.67	0.28	0.36	0.82	1
BeG30N12B10	Q7QC42 AgCP1729 (Fragment) GO:0005622 GO:0003735 G	1.00	0.48	0.31	0.27	0.80	1
BeG30N12C05	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	1.00	0.35	0.23	0.79	1
BeG30N12C08	conserved hypothetical protein [Schizosaccharomyce	1.00	1.00	0.33	0.28	0.77	1
BeG30N12C09	N/A	1.00	0.63	0.33	0.29	0.82	1
BeG30N12D08	N/A	1.00	0.45	0.30	0.30	0.81	1
BeG30N12D10	putative 60s ribosomal protein l6, mitochondrial p	1.00	0.65	0.30	0.29	0.82	1
BeG30N12F08	N/A	1.00	0.61	0.37	0.26	0.87	1
BeG30N12F10	N/A	1.00	0.61	0.28	0.32	0.78	1
BeG30N12G03	N/A	1.00	0.63	0.30	0.26	0.75	1
BeG30N12G06	N/A	1.00	0.87	0.23	0.26	0.72	1
BeG30N12G10	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	0.87	0.27	0.24	0.89	1
BeG30N12G11	N/A	1.00	0.55	0.32	0.27	0.80	1
BeG30N12G12	N/A	1.00	0.45	0.42	0.24	0.86	1
BeG30N12H02	Q7NK14 Gll1666 protein GO:0006865 GO:0006810 GO:00	1.00	0.19	0.21	0.33	1.16	1
BeG30N12H05	N/A	1.00	0.47	0.35	0.28	0.85	1
BeG30N14B07	No match	1.00	0.55	0.44	0.31	0.70	1
BeG30N18C11	Q91YK6 Hypothetical protein (Fragment) GO:0005622	1.00	0.50	0.42	0.29	0.64	1
BeG30N19E10	P36584 60S ribosomal protein L3-B GO:0005622 GO:00	1.00	0.42	0.21	0.20	0.46	1
BeG60N01F09	Q7S4C6 Hypothetical protein GO:0006865 GO:0006810	1.00	0.37	0.25	0.23	0.82	1
BeG60N02A02	Q861U9 40S ribosomal protein S4, Y isoform GO:0005	1.00	0.55	0.32	0.25	0.79	1
BeG60N02G07	P49397 40S ribosomal protein S3a GO:0005622 GO:000	1.00	0.54	0.35	0.33	0.51	1
BeG60N04D04	N/A	1.00	0.36	0.49	0.22	0.38	1
BeG60N06G05	P79078 Delta-9 fatty acid desaturase GO:0005506 GO	1.00	0.37	0.42	0.25	0.20	1
BeG60N06H10	Q7ZVY5 Similar to citrate synthase GO:0004108 GO:0	1.00	0.52	0.53	0.36	0.24	1
BeG60N07C03	>Q9S9N1 T24D18.14 protein GO:0005524	1.00	0.68	0.41	0.25	0.46	1
BeG60N09D05	O94083 Eukaryotic translation initiation factor 5A	1.00	0.41	0.24	0.19	0.67	1
BeG60N14G09	Q9XGL4 60S ribosomal protein L31 GO:0005622 GO:000	1.00	0.56	0.33	0.28	0.68	1
BeG60N16E09	Q962R4 Ribosomal protein S15 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.54	0.32	0.23	0.53	1
BeG60N18G09	No match	1.00	0.37	0.33	0.37	0.15	1
BeG60N20C02	O13672 60S ribosomal protein L8 GO:0003735 GO:0005	1.00	0.44	0.32	0.27	0.48	1
BeG90N01C01	O14388 60S ribosomal protein L27-A GO:0005622 GO:0	1.00	0.49	0.35	0.32	0.50	1
BeG90N01E12	similar to Mus musculus (Mouse). Probable urocanat	1.00	0.58	0.45	0.37	0.51	1
BeG90N01H03	No match	1.00	0.63	0.34	0.37	0.62	1
BeG90N02C03	P78568 Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogena	1.00	0.31	0.35	0.62	0.37	1
BeG90N02G11	No hits found	1.00	0.54	0.38	0.41	0.28	1
BeG90N05A03	Q86QS0 Ribosomal protein L32 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.50	0.44	0.35	0.60	1

BeG90N05G10	hypothetical protein F6N23.5 - Arabidopsis thalian	1.00	0.53	0.29	0.21	0.83	1
BeG90N09A08	N/A	1.00	0.81	0.33	0.31	0.65	1
BeG90N09B01	P25388 Guanine nucleotide-binding protein beta sub	1.00	0.41	0.42	0.33	0.51	1
BeG90N09E08	>P41770 Heat shock protein SSB GO:0003773 GO:0005524 GO:0006	1.00	0.82	0.35	0.17	0.40	1
BeG90N10A09	Q8NIH1 Putative secreted metalloprotease 3 GO:0004	1.00	0.83	0.34	0.44	0.44	1
BeG90N10B07	Q7SBD5 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.42	0.35	0.31	0.55	1
BeG90N10B10	P02992 Elongation factor Tu, mitochondrial precurs	1.00	0.42	0.24	0.31	0.25	1
BeG90N10C12	N/A	1.00	0.51	0.28	0.20	0.52	1
BeG90N11F01	Q8ISP7 Ribosomal protein L9 GO:0006355 GO:0005622	1.00	0.41	0.29	0.17	0.43	1
BeG90N11G02	Chitinase [Clostridium thermocellum]	1.00	0.44	0.30	0.24	0.44	1
BeG90N12B05	N/A	1.00	0.56	0.38	0.29	0.23	1
BeG90N12C05	glutaryl-Coenzyme A dehydrogenase isoform a [Homo	1.00	0.28	0.32	0.38	1.70	1
BeG90N13B05	Q7RV84 40S ribosomal protein S7 GO:0005622 GO:0003	1.00	0.56	0.42	0.33	0.42	1
BeG90N13F08	hypothetical protein [Burkholderia fungorum]	1.00	0.47	0.25	0.21	0.53	1
BeG90N18F12	Q9SA73 T5I8.3 protein GO:0005554 GO:0005525	1.00	0.36	0.32	0.21	0.23	1
BeG90N18G12	Q7PJE1 ENSANGP00000023979 (Fragment) GO:0005622 GO	1.00	0.64	0.38	0.27	0.65	1
BeG90N19A11	Q9D8Q1 3100001N19Rik protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.50	0.44	0.34	0.45	1
BeG90N19F06	O42867 60S ribosomal protein L23 GO:0005622 GO:000	1.00	0.50	0.27	0.20	0.62	1
BeG90N19H02	N/A	1.00	0.77	0.21	0.27	0.27	1
BeG90N21A07	Q26481 60S ribosomal protein L5 GO:0008097 GO:0005	1.00	0.37	0.24	0.19	0.43	1
BeG90N21A12	putative P-protein: chorismate mutase, prephenate	1.00	0.82	0.36	0.30	0.62	1
BeG90N21C05	N/A	1.00	0.76	0.34	0.37	0.69	1
BeG90N21E07	O74491 Putative ATP-dependent RNA helicase C285.03	1.00	0.80	0.40	0.25	0.54	1
BeG90N21H11	similar to bA261P9.2 (putative novel protein simil	1.00	0.66	0.47	0.40	0.37	1
BeG90N22A10	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	0.60	0.38	0.28	0.51	1
BeG90N22H09	N/A	1.00	0.60	0.34	0.27	0.59	1
BeNSVP01G12	N/A	1.00	0.97	0.42	0.30	0.49	1
BeNSVP02B03	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase, putativ	1.00	0.59	0.36	0.25	0.54	1
BeNSVP02C01	Q7TSH1 Hypothetical protein (Fragment) GO:0015629	1.00	1.00	0.39	0.29	0.13	1
BeNSVP02H10	No match	1.00	1.34	0.25	0.21	0.64	1
BeNSVP04D08	O61462 60S ribosomal protein L37a GO:0005622 GO:00	1.00	0.68	0.37	0.34	0.51	1
BeNSVP04E05	No match	1.00	0.68	0.32	0.21	0.72	1
BeNSVP04H08	POP4 (processing of precursor , S. cerevisiae) hom	1.00	0.78	0.41	0.33	0.68	1
BeNSVP07B04	N/A	1.00	0.59	0.39	0.33	0.61	1
BeNSVP07B06	N/A	1.00	0.51	0.35	0.20	0.50	1
BeNSVP09C06	No match	1.00	0.33	0.41	0.22	0.87	1
BeNSVP09C11	Q9HGI5 Polypeptide release factor 3 GO:0008547 GO:	1.00	0.70	0.43	0.40	0.44	1
BeNSVP10B09	O59905 Pyridoxine biosynthesis protein GO:0005554	1.00	0.44	0.39	0.48	0.38	1
BeNSVP11A09	N/A	1.00	1.11	0.38	0.32	0.58	1
BeNSVP11B02	P17735 Tyrosine aminotransferase GO:0016740 GO:000	1.00	0.63	0.44	0.38	0.61	1
BeNSVP12A11	N/A	1.00	0.57	0.33	0.27	0.57	1
BeNSVP12B09	N/A	1.00	0.62	0.32	0.25	0.61	1
BeNSVP12G10	N/A	1.00	0.26	0.21	0.19	0.62	1
BeZSPN01B08	Q8ISP4 Ribosomal protein S12 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.35	0.21	0.14	0.52	1
BeZSPN02E05	No match	1.00	0.66	0.36	0.34	1.12	1
BeZSPN03F02	No hits found	1.00	0.26	0.22	0.21	0.51	1
BeZSPN03G07	Q00302 Mitochondrial processing peptidase beta sub	1.00	0.49	0.47	0.41	0.35	1
BeZSPN05A11	Q9QXA6 B(0,+)-type amino acid transporter 1 GO:000	1.00	0.37	0.37	0.24	1.51	1
BeZSPN06C04	Q09692 Putative tryptophanyl-tRNA synthetase GO:00	1.00	0.38	0.31	0.27	0.89	1
BeZSPN07A08	Q8RWN2 Transporter-like protein GO:0006810 GO:0015	1.00	0.53	0.42	0.42	0.68	1
BeZSPN09C01	Q8MUE5 Ribosomal protein S20 GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.55	0.14	0.18	0.59	1
BeZSPN12B03	O13614 40S ribosomal protein S10-B GO:0003735	1.00	0.51	0.38	0.27	0.52	1
BeZSPN12H11	P14249 40S ribosomal protein S24 GO:0016742 GO:000	1.00	0.64	0.37	0.26	0.63	1
BeZSPN15A10	N/A	1.00	0.91	0.37	0.37	0.85	1
BeZSPN17C11	P39958 Secretory pathway GDP dissociation inhibit	1.00	0.52	0.30	0.20	0.25	1

Anexo 2: Genes induzidos em zoósporos.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE120N01C06	No match	1.00	0.80	1.48	1.78	4.56	2
BeE120N02H03	No hits found	1.00	0.50	1.01	0.93	1.31	2
BeE120N20G09	No match	1.00	1.16	1.03	1.22	2.97	2
BeE120N30H05	Q7RV08 Hypothetical protein GO:0006527 GO:0004053	1.00	0.84	0.72	1.87	2.14	2
BeE120N38D09	P38263 Vacuolar import and degradation protein VID	1.00	1.11	1.05	1.36	3.18	2
BeE30N02C02	No match	1.00	1.07	1.01	1.13	3.51	2
BeE30N02C10	Q9HDN1 Histone H3 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	1.00	1.32	0.56	0.94	4.63	2
BeE30N03A09	No match	1.00	0.68	0.79	0.93	2.30	2
BeE30N03B08	No match	1.00	0.95	1.10	1.08	4.11	2
BeE30N06D01	P40206 Hypothetical 24.7 kDa protein in POM152-REC	1.00	0.91	0.92	0.96	2.30	2
BeE30N14D03	Q7ZUY3 Hypothetical protein GO:0007001 GO:0003677	1.00	1.07	0.61	1.09	4.47	2
BeE60C17C02	P38356 Metal homeostatis protein BSD2 GO:0016021 G	1.00	1.00	0.77	1.06	4.14	2
BeE60C24E07	No match	1.00	1.25	0.63	0.92	2.51	2
BeE60H06B09	Q07135 Histone H2A, orphon GO:0007001 GO:0003677 G	1.00	1.24	0.79	1.13	3.94	2
BeE60H08D02	No match	1.00	0.58	0.49	0.71	1.58	2
BeE60H15E02	putative mitochondrial protein import protein [Sch	1.00	0.83	0.60	0.78	2.22	2
BeE60H21G09	Q8RBT1 Amino acid transporters GO:0006865 GO:00068	1.00	0.75	0.44	0.50	1.93	2
BeE60H26C07	No match	1.00	0.60	0.96	1.14	4.38	2
BeE60N03D06	O15819 Histone H3 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	1.00	1.02	0.51	0.61	3.29	2
BeE60N06B08	Q8VZG8 AT4g08850/T32A17_160 GO:0016740 GO:0016301	1.00	0.91	0.56	0.75	1.60	2
BeE60N18C04	N/A	1.00	0.88	1.00	1.24	2.17	2
BeE90D12C12	>Q7S7K6 Related to the component Tra1 of the SAGA complex GO:00	1.00	0.95	0.81	1.02	2.03	2
BeE90N19F09	No match	1.00	0.79	0.75	1.72	3.34	2
BeG120N02A10	Q09916 Putative ATP-dependent RNA helicase C1F7.02	1.00	0.78	0.79	0.99	2.85	2
BeG120N03B03	Q7S4N5 Hypothetical protein GO:0006508 GO:0030693	1.00	0.54	0.50	0.67	2.04	2
BeG120N18B05	conserved hypothetical protein [Entamoeba histolyt	1.00	0.43	0.78	1.12	1.17	2
BeG120N20E02	Q9NPE3 Nop10p GO:0005554 GO:0005732 GO:0001522	1.00	0.46	0.55	0.69	2.57	2
BeG30N01H12	Q9U3I7 F19B6.1b protein GO:0009058 GO:0016301 GO:0	1.00	1.09	1.30	1.45	3.03	2
BeG30N02E11	N/A	1.00	1.00	0.92	1.19	2.60	2
BeG30N02F01	Q7S4Z8 Hypothetical protein GO:0006457 GO:0003754	1.00	0.98	0.92	1.04	2.58	2
BeG30N05D12	Q7SD47 Hypothetical protein GO:0008757	1.00	0.94	0.88	1.25	2.36	2
BeG30N06H02	conserved hypothetical protein. [Schizosaccharomyc	1.00	1.12	0.59	1.09	9.65	2
BeG30N07A07	P46378 Hypothetical 21.1 kDa protein in fasciation	1.00	0.75	0.84	0.77	2.64	2
BeG30N07B07	similar to Homo sapiens (Human). DKFZP564O0463 pro	1.00	0.67	0.89	1.00	3.25	2
BeG30N07D01	No hits found	1.00	1.16	1.09	1.08	2.22	2
BeG30N08E03	Q96VN6 Phosphate transporter (Fragment) GO:0006810	1.00	0.34	0.33	0.49	4.56	2
BeG30N08E06	hypothetical protein MG03324.4 [Magnaporthe grisea	1.00	0.92	0.86	1.03	3.97	2
BeG30N09C02	P14964 Orotidine 5'-phosphate decarboxylase GO:000	1.00	0.76	1.01	1.39	2.13	2
BeG30N09H07	P52493 Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa GO:0	1.00	0.68	0.53	0.57	1.87	2
BeG30N11C03	Q942T3 Putative receptor protein kinase GO:0016740	1.00	0.84	0.80	1.08	3.25	2
BeG30N12C01	Gas1-like protein [Monacrosporium haptotylum]	1.00	0.92	0.43	0.80	2.28	2
BeG30N12E02	No match	1.00	0.77	0.35	0.92	9.38	2
BeG30N12F01	Q7Y5K0 17R GO:0004519 GO:0003676	1.00	0.43	0.41	0.66	1.72	2
BeG30N13A10	Q9KVD5 Orotate phosphoribosyltransferase GO:001674	1.00	0.45	0.83	2.01	2.50	2
BeG30N13H08	Q9JL97 GPI-anchored ceruloplasmin GO:0005507	1.00	0.37	0.47	0.57	2.36	2
BeG30N16B06	Q04740 Ribonuclease H GO:0007047 GO:0004519 GO:001	1.00	1.05	0.79	0.90	3.43	2
BeG30N16H05	P56538 Probable eukaryotic translation initiation	1.00	0.63	0.70	0.90	2.60	2
BeG30N17B05	No match	1.00	1.00	0.88	1.81	27.67	2
BeG30N17F11	An1 protein [Paracentrotus lividus]	1.00	1.00	0.96	1.29	2.58	2
BeG60N01C07	hypothetical protein MIMI_L696 [Mimivirus]	1.00	0.89	0.76	1.17	2.81	2
BeG60N05B05	No hits found	1.00	1.00	0.55	1.73	8.88	2
BeG60N05H09	lethal (2) 35Bg CG4180-PA [Drosophila melanogaster	1.00	1.04	1.36	1.34	2.64	2
BeG60N07E11	Hypothetical protein CBG11217 [Caenorhabditis brig	1.00	0.59	0.60	0.50	1.98	2
BeG60N10B01	No match	1.00	0.89	0.94	1.11	11.96	2
BeG60N12C04	P53738 Hypothetical 15.1 kDa protein in PET494-MSO	1.00	0.75	1.11	1.30	2.99	2
BeG60N12C05	Q9BQ67 Glutamate-rich WD-repeat protein 1 GO:00056	1.00	0.80	0.79	0.70	1.91	2
BeG60N16H02	Q9BLT3 Nucleoside hydrolase GO:0016787	1.00	0.55	0.79	0.95	1.80	2
BeG60N19B01	P38625 GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] GO:000	1.00	0.20	0.28	0.61	2.43	2
BeG60N20F09	Q87216 Probable iron inhibited ABC transporter 2 G	1.00	1.06	1.02	0.94	2.64	2
BeG90N01C12	No match	1.00	0.65	0.51	0.60	3.51	2
BeG90N05B09	No match	1.00	0.90	0.57	0.68	2.45	2
BeG90N10B01	Q7PM95 ENSANGP00000022241 (Fragment) GO:0003677 GO	1.00	0.41	0.50	0.62	4.23	2
BeG90N11E11	No match	1.00	1.02	0.92	1.19	5.17	2
BeG90N15C05	Q9S826 Putative U3 small nucleolar ribonucleoprote	1.00	0.75	0.80	1.05	3.27	2
BeG90N17G03	Q27532 W05B10.1 protein GO:0007001 GO:0003677 GO:0	1.00	1.37	0.84	1.25	3.03	2
BeG90N18F10	Q8SZ87 RE13747p GO:0007067 GO:0006118 GO:0005489 G	1.00	1.34	0.92	1.05	3.94	2
BeG90N18G02	No hits found	1.00	0.46	0.37	0.32	3.86	2
BeG90N18G03	expressed protein [Cryptococcus neoformans var. ne	1.00	0.58	0.39	0.79	4.47	2
BeG90N18H02	Q7Z8T1 Ubiquitin-conjugating enzyme9 GO:0006464 GO	1.00	1.02	0.99	1.09	2.89	2
BeG90N19E11	Q871N5 Probable uracil phosphoribosyltransferase F	1.00	0.60	0.71	0.89	3.94	2
BeG90N19G08	Q8S1Z1 Probable U3 small nucleolar RNA-associated	1.00	0.85	1.03	2.45	3.10	2
BeG90N20B02	N/A	1.00	1.09	1.24	0.98	2.51	2
BeG90N21F06	O42901 Hypothetical 21.5 kDa protein C119.09C in c	1.00	0.88	0.98	0.97	2.17	2
BeNSVP02E01	No hits found	1.00	1.00	1.15	1.63	2.62	2

BeNSVP05B07	N/A	1.00	0.46	0.51	0.59	1.67	2
BeZSPN01D09	No match	1.00	0.71	0.49	0.82	1.69	2
BeZSPN02C05	Q7SFI0 Hypothetical protein GO:0004176 GO:0005524	1.00	0.90	0.66	0.77	2.30	2
BeZSPN02C10	P0452F10.16 [Oryza sativa (japonica cultivar-group	1.00	0.98	0.73	1.63	4.82	2
BeZSPN03D06	Q9HDN1 Histone H3 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	1.00	0.81	0.43	0.53	2.38	2
BeZSPN03G08	N/A	1.00	0.66	0.35	0.41	2.06	2
BeZSPN04C10	Q9P7L5 Probable ornithine aminotransferase GO:0016	1.00	0.99	0.79	1.31	3.36	2
BeZSPN05F06	N/A	1.00	0.46	0.47	0.56	1.94	2
BeZSPN06C12	No match	1.00	1.07	0.85	1.43	3.94	2
BeZSPN07A05	No match	1.00	0.80	0.90	1.09	4.86	2
BeZSPN08H10	Q7S4A0 Hypothetical protein GO:0006810 GO:0005415	1.00	0.91	0.64	1.09	2.55	2
BeZSPN09D06	Q7SE83 Predicted protein GO:0006810 GO:0005215 GO:	1.00	1.03	0.92	1.15	1.93	2
BeZSPN09E08	Q7Z8B6 H(+)-ATPase GO:0015662 GO:0008553 GO:000815	1.00	0.51	0.26	0.55	2.31	2
BeZSPN09E12	N/A	1.00	1.21	0.70	0.64	3.01	2
BeZSPN09G01	No match	1.00	0.89	0.88	1.23	2.77	2
BeZSPN10C02	Q62896 BET1 homolog GO:0015031 GO:0006886 GO:00068	1.00	0.97	1.32	1.28	3.46	2
BeZSPN10C07	No match	1.00	0.96	1.20	1.45	3.63	2
BeZSPN10D09	P54644 RAC-family serine/threonine kinase homolog	1.00	0.86	0.88	1.91	2.39	2
BeZSPN10H02	Q7RW00 Hypothetical protein GO:0006118 GO:0016491	1.00	1.13	1.00	1.42	2.89	2
BeZSPN11B02	Q8NIQ8 Histone H4 GO:0007001 GO:0003677 GO:0006334	1.00	1.25	0.98	1.19	4.50	2
BeZSPN11B05	N/A	1.00	1.15	0.62	0.76	1.93	2
BeZSPN11E04	Q9P6K9 Hypothetical protein GO:0030089	1.00	0.90	0.58	0.88	3.16	2
BeZSPN11G07	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	1.00	1.17	1.02	1.51	5.54	2
BeZSPN11H06	No match	1.00	1.22	1.01	1.49	3.10	2
BeZSPN12C03	unnamed protein product [Kluyveromyces lactis]	1.00	1.04	1.01	1.07	1.96	2
BeZSPN12E04	No match	1.00	0.82	1.02	1.22	2.83	2
BeZSPN12E10	Q7PRI8 ENSANGP00000016126 (Fragment) GO:0006857 GO	1.00	1.38	0.78	0.39	1.84	2
BeZSPN12E12	No match	1.00	0.99	1.04	1.52	2.97	2
BeZSPN12F04	Q03532 Probable ATP-dependent RNA helicase HAS1 GO	1.00	0.63	0.63	0.86	2.99	2
BeZSPN13H03	No match	1.00	0.56	1.20	1.59	7.16	2
BeZSPN14B06	N/A	1.00	1.26	0.49	1.13	5.78	2
BeZSPN14B07	Q7Z9I9 Chitin synthase class VI GO:0016758	1.00	0.83	0.74	1.27	3.78	2
BeZSPN14D03	N/A	1.00	0.64	0.76	1.59	2.69	2
BeZSPN14H05	histidinol-phosphate aminotransferase [uncultured	1.00	0.41	0.55	0.84	4.35	2
BeZSPN15A06	No match	1.00	0.95	1.24	1.57	4.99	2
BeZSPN15C05	Q09919 Hypothetical protein C1F7.07c in chromosome	1.00	0.50	0.51	0.60	2.93	2
BeZSPN15C07	No match	1.00	1.16	1.20	1.38	7.26	2
BeZSPN15C09	No match	1.00	1.15	1.05	0.99	2.20	2
BeZSPN15D04	hypothetical protein TC0110 [Chlamydia muridarum]	1.00	0.76	0.89	1.16	12.38	2
BeZSPN15E12	Q8BNT3 Hypothetical protein GO:0030089	1.00	0.84	0.82	0.83	3.81	2
BeZSPN15F03	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	1.00	1.04	1.70	1.03	2.93	2
BeZSPN15F06	No match	1.00	1.02	1.34	1.33	11.08	2
BeZSPN16C11	Q06543 Similar to C. ELEGANS hypothetical protein	1.00	0.90	0.68	1.31	3.43	2
BeZSPN16E03	No match	1.00	0.86	1.09	0.94	2.17	2
BeZSPN16F12	Q12317 Chromosome XV reading frame ORF YOL112W GO:	1.00	0.74	0.97	1.54	7.52	2
BeZSPN16H02	P10869 Aspartokinase GO:0016740 GO:0008152 GO:0004	1.00	0.72	0.69	0.93	2.62	2
BeZSPN16H09	No match	1.00	0.75	0.91	1.27	6.50	2
BeZSPN17A09	hypothetical protein CaO19.4905 [Candida albicans	1.00	0.88	1.18	1.39	3.73	2
BeZSPN17B12	N/A	1.00	0.74	0.75	2.50	10.48	2
BeZSPN17F02	N/A	1.00	0.98	0.83	1.18	3.36	2
BeZSPN17H06	O06479 YFNA protein GO:0006865 GO:0006810 GO:00052	1.00	0.76	0.58	0.79	4.72	2
BeZSPN18A01	O13395 Chitin synthase 6 GO:0016740 GO:0016758 GO:	1.00	1.09	0.94	1.23	2.25	2
BeZSPN18C06	No match	1.00	1.06	1.14	1.05	3.01	2
BeZSPN18C11	N/A	1.00	0.67	0.60	0.81	7.16	2
BeZSPN18D01	No match	1.00	0.95	1.11	1.07	2.51	2
BeZSPN18D04	No match	1.00	1.09	1.27	1.37	3.25	2
BeZSPN19A07	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	1.14	0.92	1.10	2.39	2
BeZSPN19B01	Q7T339 Hypothetical protein GO:0005554	1.00	0.97	1.05	0.98	4.79	2
BeZSPN19C01	N/A	1.00	1.06	0.96	1.24	2.53	2

Anexo 3: Genes transitoriamente induzidos durante a esporulação de *B. emersonii*.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo	
		Tempo (min)						
		0	60	120	150	ZSP		
BeE120N01C11-1	No hits found	1.00	3.94	6.02	3.16	1.00	3	
BeE120N01D06	No match	1.00	3.68	6.59	7.57	0.52	3	
BeE120N01E04	Q80W96 HesB protein GO:0005554	1.00	2.58	2.25	1.63	1.04	3	
BeE120N01E11	P58466 Carboxy-terminal domain RNA polymerase II p	1.00	0.92	1.23	4.56	0.40	3	
BeE120N01G08	No hits found	1.00	1.73	4.89	5.66	1.60	3	
BeE120N02A03	No match	1.00	1.43	3.10	2.99	1.73	3	
BeE120N02E04	Q7YXG1 Soluble guanylyl cyclase 2 beta (Fragment)	1.00	1.15	4.20	6.96	0.75	3	
BeE120N03E07	No match	1.00	1.44	2.01	1.92	1.24	3	
BeE120N04A06	No match	1.00	1.29	2.41	3.86	1.29	3	
BeE120N05F11	No match	1.00	1.30	2.01	1.37	1.01	3	
BeE120N05H04	Q7PFP4 ENSANGP00000022961 (Fragment) GO:0008067 GO	1.00	1.16	2.30	2.97	1.04	3	
BeE120N06A04	No match	1.00	3.25	3.68	4.89	1.48	3	
BeE120N07A12	roadblock-related dynein light chain [Ciona intest	1.00	1.31	2.46	1.62	0.39	3	
BeE120N07B02	N/A	1.00	1.09	1.71	3.32	1.13	3	
BeE120N07D10	N/A	1.00	1.74	4.79	6.23	1.41	3	
BeE120N07F05	N/A	1.00	1.38	2.69	2.60	0.77	3	
BeE120N07G01	N/A	1.00	0.68	1.17	5.06	0.83	3	
BeE120N08A01	Zgc:101786 [Danio rerio]	1.00	1.24	2.48	2.39	1.74	3	
BeE120N09B11	No hits found	1.00	1.61	2.30	2.03	1.26	3	
BeE120N09C09	No hits found	1.00	1.44	3.12	2.69	1.62	3	
BeE120N09E09	No match	1.00	1.07	1.92	5.31	1.15	3	
BeE120N20A06	No hits found	1.00	0.94	2.55	7.73	1.30	3	
BeE120N20E11	No match	1.00	3.39	7.11	5.10	0.79	3	
BeE120N22B08		0	1.00	2.97	4.03	3.58	0.38	3
BeE120N25B05	No hits found	1.00	1.11	1.89	2.79	1.68	3	
BeE120N25C02	Q7PUT0 ENSANGP00000020068 (Fragment) GO:0003925 GO	1.00	1.31	2.30	2.81	1.12	3	
BeE120N25E05		0	1.00	0.96	2.06	8.63	1.29	3
BeE120N25H06	No match	1.00	0.99	3.25	5.50	0.96	3	
BeE120N26A10	No match	1.00	0.76	4.08	4.79	1.70	3	
BeE120N26G06	Q8VCX2 Solute carrier family 35 member C2 GO:00068	1.00	1.12	2.00	2.13	1.01	3	
BeE120N27B06	Q7S8C1 Hypothetical protein GO:0008152 GO:0016787	1.00	0.57	2.17	4.69	0.87	3	
BeE120N27C01	Q7TNJ2 ATP-binding cassette transporter sub-family	1.00	1.18	1.64	4.69	1.54	3	
BeE120N27F08	No match	1.00	0.97	3.01	4.82	1.44	3	
BeE120N27G08	Q86AY4 Similar to Ralstonia solanacearum GO:000806	1.00	0.99	1.88	2.57	0.64	3	
BeE120N28D07	P40581 Glutathione peroxidase 3 GO:0005622 GO:00004	1.00	1.59	1.55	2.41	0.79	3	
BeE120N30B03	No match	1.00	1.07	1.91	3.78	1.50	3	
BeE120N30B12	P31320 cAMP-dependent protein kinase regulatory ch	1.00	1.02	2.00	2.31	0.73	3	
BeE120N30D02	Q8R384 Hypothetical protein GO:0006939 GO:0016459	1.00	1.03	3.29	2.17	0.77	3	
BeE120N30G01	No match	1.00	2.06	4.47	7.94	0.72	3	
BeE120N31H05	No match	1.00	1.70	2.50	2.36	1.60	3	
BeE120N32A12	No match	1.00	0.94	2.43	2.30	0.64	3	
BeE120N32H02	O93787 Chs3 GO:0016758	1.00	1.08	2.31	3.27	1.28	3	
BeE120N35H01	Q7SAQ1 Hypothetical protein GO:0006886 GO:0030125	1.00	2.45	4.26	2.14	2.20	3	
BeE120N36B05	Q7QK56 AgCP14714 GO:0006468 GO:0004672 GO:0005524	1.00	0.84	1.85	3.58	1.49	3	
BeE120N36C08	No match	1.00	0.79	2.01	3.76	1.25	3	
BeE120N36H09	Q8EXG1 Conserved hypothetical protein GO:0005975 G	1.00	1.27	1.94	2.35	0.79	3	
BeE120N37D03	No match	1.00	0.88	3.39	5.46	1.30	3	
BeE120N37H05	No match	1.00	0.87	1.46	2.04	0.99	3	
BeE120N38C11	No hits found	1.00	2.13	3.10	3.76	2.43	3	
BeE120N38D06	RIKEN cDNA 4930506L13 [Mus musculus]	1.00	1.64	2.13	2.07	0.60	3	
BeE120N38E10	Q9D5P6 4930403C08Rik protein GO:0005509	1.00	1.88	2.83	1.97	1.65	3	
BeE120N38G07	No match	1.00	1.98	7.36	4.29	1.28	3	
BeE30N01C07	Q14107 Protein D123 GO:0008284 GO:0007050	1.00	1.07	2.14	2.38	1.26	3	
BeE30N06A03	Q9U5N0 Vacuolar ATP synthase subunit H GO:0008553	1.00	1.39	2.60	1.47	0.68	3	
BeE30N08A11	Q86ZW6 Alpha-tubulin (Fragment) GO:0007018 GO:00005	1.00	2.77	4.14	2.99	0.38	3	
BeE30N10H03	P31320 cAMP-dependent protein kinase regulatory ch	1.00	1.17	2.95	2.87	0.73	3	
BeE30N11D01	No match	1.00	2.28	1.90	1.38	0.89	3	
BeE30N13H09	Q81EK9 Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetyla	1.00	0.88	4.66	6.96	1.10	3	
BeE30N14B04	No match	1.00	1.94	4.00	1.92	1.34	3	
BeE30N14F05	intersectin 1 [Danio rerio]	1.00	1.01	1.65	3.18	1.29	3	
BeE60C01E02	Q7S2J5 Hypothetical protein GO:0005524 GO:0008233	1.00	1.67	2.73	2.58	0.76	3	
BeE60C03A12	No hits found	1.00	1.61	3.56	3.71	0.51	3	
BeE60H03F09	No match	1.00	2.79	4.23	2.58	1.45	3	
BeE60H15B01	No match	1.00	1.17	1.41	2.16	0.94	3	
BeE60H15H11	Q7SGN0 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003779	1.00	1.69	4.69	4.99	0.64	3	
BeE60H16A10	N/A	1.00	1.04	2.38	2.41	0.27	3	
BeE60H16E03	N/A	1.00	3.07	4.23	3.41	0.41	3	
BeE60H23E05	P14318 Muscle-specific protein 20 GO:0007517	1.00	0.84	2.16	2.75	0.78	3	
BeE60H27E01	O93787 Chs3 GO:0016758	1.00	0.88	2.30	3.36	1.81	3	
BeE60H28F02	O74936 Acyl-CoA oxidase 3 GO:0005777 GO:0006118 GO	1.00	1.15	1.62	3.58	0.77	3	
BeE60H29D02	O50052 Hypothetical protein GO:0042829 GO:0006952	1.00	1.44	3.58	3.92	1.04	3	
BeE60H32H06	No match	1.00	1.53	1.96	4.20	1.88	3	
BeE60N03A04	Q8K2P9 Hypothetical protein GO:0003925 GO:0007264	1.00	1.46	2.27	1.79	0.79	3	
BeE60N03A10	No match	1.00	6.11	6.06	6.96	0.96	3	

BeE60N03C06	Q9HDE1 Calcineurin B regulatory subunit GO:0005509	1.00	1.42	3.07	3.51	0.94	3	
BeE60N04B11	P26587 Aquaporin TIP3.1 GO:0006810 GO:0006355 GO:0	1.00	1.37	2.16	3.34	1.25	3	
BeE60N04E11	Q62219 Transforming growth factor beta 1 induced t	1.00	1.08	2.31	2.36	1.39	3	
BeE60N05B05	No match	1.00	1.77	2.62	3.12	1.59	3	
BeE60N05D04	No match	1.00	0.76	2.19	1.68	0.85	3	
BeE60N05G06	O15127 Secretory carrier-associated membrane prote	1.00	1.27	1.51	2.81	1.42	3	
BeE60N06C01	No match	1.00	2.68	3.84	2.03	1.23	3	
BeE60N07E05	P24032 Myosin regulatory light chain 2, smooth mus	1.00	1.83	4.20	4.06	0.78	3	
BeE60N07E08	P40581 Glutathione peroxidase 3 GO:0005622 GO:0004	1.00	1.70	2.33	1.69	0.66	3	
BeE60N07F01	O13726 Putative sodium/hydrogen exchanger GO:00153	1.00	0.77	2.71	2.33	0.97	3	
BeE60N07G07	No match	1.00	1.48	3.18	1.47	0.85	3	
BeE60N07H08	Q8T367 Small G protein GO:0003925 GO:0003930 GO:00	1.00	0.97	2.45	4.00	1.02	3	
BeE60N08B06	Q872J2 Probable clathrin-associated adaptor comple	1.00	1.83	2.73	1.79	0.92	3	
BeE60N08E08	O62547 Sec1-like protein GO:0009306 GO:0008565	1.00	0.98	2.93	1.17	0.68	3	
BeE60N08G09	No match	1.00	5.78	3.97	2.99	0.82	3	
BeE60N09D06	Q9FRD2 Putative vesicle soluble NSF attachment pro	1.00	1.13	2.73	1.50	1.44	3	
BeE60N09H03	Q9R0L0 JNK-binding protein JNKBP1 GO:0005515 GO:00	1.00	1.02	4.35	2.06	1.00	3	
BeE60N10D02	No match	1.00	1.15	2.41	2.81	1.71	3	
BeE60N12E01	Q09196 Myosin regulatory light chain cdc4 GO:00009	1.00	1.09	2.66	1.94	0.78	3	
BeE60N13A04	No hits found	1.00	5.46	6.32	5.58	0.97	3	
BeE60N13D03	No match	1.00	5.74	1.30	1.40	0.73	3	
BeE60N14B10	No match	1.00	5.74	3.27	1.52	0.95	3	
BeE60N15C03	similar to RIKEN cDNA 5530601119 [Rattus norvegicu	1.00	2.31	1.84	1.29	1.16	3	
BeE60N16A06	Q873H2 Related to stomatin GO:0016020	1.00	0.98	2.28	1.46	1.08	3	
BeE60N18B07	No match	1.00	1.12	1.98	4.26	2.14	3	
BeE60N18D08	No match	1.00	2.01	2.25	1.03	0.86	3	
BeE60N18H09	hypothetical protein [Yarrowia lipolytica]	1.00	2.97	2.22	2.50	1.11	3	
BeE60N19C08	No match	1.00	1.00	2.28	1.17	1.00	3	
BeE60N19E10	Q8T665 ABC transporter AbcH.1 GO:0006810 GO:000016	1.00	1.18	2.07	2.16	0.94	3	
BeE90D01B04		0	1.00	1.08	1.42	3.05	1.02	3
BeE90D03A06	hypothetical protein AN9079.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]	1.00	1.63	2.95	2.73	1.18	3	
BeE90D04C07	>Q96VU9 Cofilin GO:0005622 GO:0003779	1.00	1.77	2.27	1.61	0.99	3	
BeE90D04G12		0	1.00	4.17	4.44	7.16	1.05	3
BeE90D07C08		0	1.00	3.76	5.70	4.82	0.47	3
BeE90D07E02	>Q9RSD4 NADH-dependent flavin oxidoreductase, putative GO:00061	1.00	1.03	2.22	2.53	0.85	3	
BeE90D09F07		0	1.00	1.89	2.03	2.45	1.36	3
BeE90D13B04	>P05216 Tubulin alpha-6 chain GO:0007018 GO:0005874 GO:000519	1.00	2.93	4.89	4.20	0.34	3	
BeE90D18C07	>Q8AWD6 Tubulin, alpha 2 GO:0007018 GO:0005874 GO:0005198	1.00	3.20	3.63	4.11	0.36	3	
BeE90D20G12	>P52808 60S ribosomal protein L30-1 GO:0005622 GO:0003735 GO:(	1.00	0.92	1.59	2.85	0.99	3	
BeE90N01C04	N/A	1.00	1.15	3.01	3.76	2.06	3	
BeE90N01E04	P53871 Hypothetical 40.2 kDa protein in CHS1-SRP1	1.00	1.44	2.46	2.57	0.97	3	
BeE90N02A02	N/A	1.00	4.35	6.06	4.53	0.38	3	
BeE90N02C04	N/A	1.00	1.30	3.66	6.50	1.35	3	
BeE90N04D01	No match	1.00	0.81	1.96	2.53	1.26	3	
BeE90N05E03-1	Q9UST2 Putative mitochondrial inner membrane prote	1.00	1.33	2.27	1.24	0.50	3	
BeE90N09H10	No hits found	1.00	1.50	2.10	1.99	0.76	3	
BeE90N10F09	O08678 Serine/threonine kinase GO:0016740 GO:00163	1.00	1.04	2.13	2.48	1.12	3	
BeE90N11D07	Q8TD57 Axonemal heavy chain dynein type 3 GO:00001	1.00	1.26	2.69	2.22	1.08	3	
BeE90N11E12	No match	1.00	0.89	1.66	3.01	1.02	3	
BeE90N12A05	No match	1.00	2.35	2.27	1.51	1.20	3	
BeE90N12B07	NPY receptor [Lampetra fluviatilis]	1.00	0.84	1.95	3.03	0.75	3	
BeE90N13A10	Q96VU5 UDP-glucose dehydrogenase Uxs2p GO:0003979	1.00	1.02	2.41	1.43	0.98	3	
BeE90N15B12	N/A	1.00	6.36	5.58	2.48	1.66	3	
BeE90N16C12	No match	1.00	1.03	2.08	1.88	1.28	3	
BeE90N17C06	Q9SMH3 Dynein 1-alpha heavy chain, flagellar inner	1.00	1.96	2.23	1.73	1.06	3	
BeE90N18A01	N/A	1.00	1.13	1.79	2.75	1.25	3	
BeE90N18A12	N/A	1.00	1.39	4.59	2.39	1.04	3	
BeE90N18B06	N/A	1.00	1.00	2.66	2.50	1.00	3	
BeE90N20C10	N/A	1.00	1.25	4.29	5.21	1.04	3	
BeE90N21E02	N/A	1.00	0.97	2.04	3.61	1.31	3	
BeE90N23C08	N/A	1.00	1.28	2.58	1.84	1.30	3	
BeE90N24A04	N/A	1.00	0.99	2.45	1.78	1.41	3	
BeE90N24F09	N/A	1.00	1.01	2.19	2.71	0.73	3	
BeE90N25D12	N/A	1.00	1.93	1.48	2.83	0.95	3	
BeE90N25F01	N/A	1.00	1.10	1.85	2.77	1.63	3	
BeG120N10C05	No match	1.00	0.98	1.34	1.86	0.75	3	
BeG120N17G08	Q9UTE9 Putative mitochondrial intermembrane protei	1.00	0.74	1.07	2.20	0.86	3	
BeG120N22C04	Q9D0M5 6720463E02Rik protein GO:0003777 GO:0005875	1.00	1.44	1.93	1.31	1.23	3	
BeG30N01C09	No hits found	1.00	0.50	1.43	4.00	0.75	3	
BeG30N03G06	Q9C0R0 (AF343071) TIM23 GO:0015031 GO:0005744 GO:0	1.00	1.34	2.35	2.20	1.39	3	
BeG30N16C06	No match	1.00	1.51	2.31	2.85	2.17	3	
BeG60N06E08	No hits found	1.00	0.54	1.18	3.32	0.83	3	
BeG60N08H03	Q8J0B8 G protein alpha subunit GO:0007186 GO:00048	1.00	1.48	3.20	3.27	1.86	3	
BeG90N06G11	No hits found	1.00	1.75	2.30	1.88	0.45	3	
BeG90N11B09	No match	1.00	1.29	2.68	2.03	1.39	3	
BeG90N20H10	Threonyl-tRNA synthetase, cytoplasmic (Threonine--	1.00	2.33	4.99	1.92	0.41	3	
BeG90N21D09	N/A	1.00	1.00	3.36	1.00	1.00	3	

BeNSVP01G10	No match	1.00	0.91	1.89	3.32	0.67	3
BeNSVP06B04	hypothetical protein [Plasmodium yoelii yoelii]	1.00	4.53	1.45	1.70	0.72	3
BeNSVP06E02	No match	1.00	2.19	1.32	2.28	0.38	3
BeNSVP07E10	N/A	1.00	2.16	1.93	1.34	0.80	3
BeNSVP07F06	N/A	1.00	4.86	2.03	2.11	0.31	3
BeNSVP09G10	No match	1.00	1.14	3.36	7.26	1.74	3
BeZSPN03D11	No match	1.00	2.91	1.76	2.50	1.03	3
BeZSPN03E07	No hits found	1.00	2.38	1.36	1.51	0.71	3
BeZSPN16D09	Q12741 cAMP-dependent protein kinase catalytic sub	1.00	1.07	2.60	3.36	1.60	3

---

Anexo 4: Genes ligeiramente induzidos durante a esporulação de *B. emersonii*.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE120N01D07	N/A	1.00	0.90	1.66	2.25	1.64	4
BeE120N01D10	Q8S9C7 Flavonoid 3'-hydroxylase GO:0006118 GO:0004	1.00	1.12	1.93	2.46	1.97	4
BeE120N02D06	No match	1.00	1.10	1.07	1.48	2.19	4
BeE120N02H09	No match	1.00	1.64	1.61	1.51	2.30	4
BeE120N03E10	0	1.00	1.71	1.68	1.69	2.43	4
BeE120N03H02	No match	1.00	1.58	1.72	1.75	2.31	4
BeE120N04B04	Q95WR8 PXF isoform C GO:0007218 GO:0007242 GO:0005	1.00	1.47	2.25	2.62	2.30	4
BeE120N05F02	No match	1.00	1.23	1.33	1.33	1.88	4
BeE120N06A07	No match	1.00	1.52	1.34	1.40	1.95	4
BeE120N06B03	No hits found	1.00	1.37	1.37	1.51	2.25	4
BeE120N06B11	Q8CEE6 PAS domain containing serine/threonine prot	1.00	0.93	2.35	1.94	1.61	4
BeE120N06D04	P49789 Bis(5'-adenosyl)-triphosphatase GO:0045786	1.00	1.51	1.46	1.34	2.11	4
BeE120N06E03	LOC443597 protein [ <i>Xenopus laevis</i> ]	1.00	1.40	1.52	1.51	2.43	4
BeE120N07G02	N/A	1.00	1.59	1.68	1.74	1.98	4
BeE120N08C07	No match	1.00	1.77	1.68	1.47	2.64	4
BeE120N08D02	No match	1.00	1.53	1.46	1.46	1.95	4
BeE120N08D07	No match	1.00	1.38	1.35	1.29	1.95	4
BeE120N08E05	Q7QGP3 AgCP10431 GO:0008757	1.00	1.70	1.88	1.56	1.94	4
BeE120N08G03	No match	1.00	1.06	1.40	2.11	1.62	4
BeE120N08H04	No match	1.00	1.60	1.57	1.50	2.20	4
BeE120N09A05	No match	1.00	1.63	1.51	1.65	2.73	4
BeE120N09A09	No match	1.00	1.36	1.67	1.42	2.13	4
BeE120N09C08	Q8P9N1 Cationic amino acid transporter GO:0006865	1.00	1.26	1.96	1.69	2.48	4
BeE120N09C11	No hits found	1.00	1.46	1.80	2.73	2.28	4
BeE120N09G02	No hits found	1.00	1.60	1.68	1.50	2.71	4
BeE120N09G08	No hits found	1.00	1.12	1.20	2.17	5.10	4
BeE120N10B07	No match	1.00	1.76	1.74	1.47	2.60	4
BeE120N10F09	No match	1.00	1.55	1.88	1.59	2.01	4
BeE120N18E04	No match	1.00	1.67	1.64	1.48	2.33	4
BeE120N18F01	Q86WN6 Phosphodiesterase PDE9A13 GO:0007165 GO:000	1.00	1.39	2.20	2.75	2.57	4
BeE120N18F03	No match	1.00	1.31	2.14	2.55	2.22	4
BeE120N18G06	N/A	1.00	1.38	1.79	1.78	1.91	4
BeE120N18H05	No match	1.00	1.54	1.52	1.37	2.60	4
BeE120N18H10	No match	1.00	1.57	1.63	1.47	2.28	4
BeE120N20C04	No match	1.00	1.57	2.30	3.32	2.30	4
BeE120N20D04	No match	1.00	1.56	1.65	1.89	2.28	4
BeE120N20F09	No hits found	1.00	1.63	1.66	1.48	2.30	4
BeE120N22E06	0	1.00	1.55	1.80	1.72	2.48	4
BeE120N23E10	N/A	1.00	1.46	1.51	1.42	2.19	4
BeE120N23H03	No match	1.00	1.32	1.47	1.47	1.90	4
BeE120N24G04	Q7Z8T1 Ubiquitin-conjugating enzyme9 GO:0006464 GO	1.00	1.20	1.50	1.88	1.94	4
BeE120N24H03	Q7PQM1 ENSANGP00000012900 GO:0003925 GO:0007264 GO	1.00	1.20	1.24	1.18	1.95	4
BeE120N25G03	No match	1.00	1.67	1.58	1.86	1.86	4
BeE120N26B07	No match	1.00	1.71	1.71	1.42	2.89	4
BeE120N26D09	Q9UHV5 Link guanine nucleotide exchange factor II	1.00	1.51	1.65	1.73	2.27	4
BeE120N26G04	Q86G47 Nucleotide exchange factor RasGEF Q GO:0007	1.00	1.49	1.48	1.52	2.20	4
BeE120N27G03	No match	1.00	1.24	1.91	2.22	1.51	4
BeE120N28A06	KIAA0590 gene product [ <i>Homo sapiens</i> ]	1.00	1.43	2.13	2.28	1.70	4
BeE120N28C07	Q8KU53 EF0108 GO:0016810 GO:0005975	1.00	1.43	1.97	3.71	2.35	4
BeE120N28E07	Q9HFN1 G protein alpha subunit (Fragment) GO:00071	1.00	1.10	2.04	2.51	1.89	4
BeE120N28H09	No hits found	1.00	1.45	1.61	1.81	2.64	4
BeE120N29G09	N/A	1.00	1.40	1.91	1.56	2.04	4
BeE120N30B11	No match	1.00	1.40	1.43	1.48	1.81	4
BeE120N30G04	No match	1.00	1.47	1.47	1.41	2.22	4
BeE120N30G07	No hits found	1.00	1.15	1.34	1.60	2.22	4
BeE120N32B02	No match	1.00	1.60	1.60	1.51	2.91	4
BeE120N32B05	No match	1.00	1.59	1.48	1.43	2.11	4
BeE120N32B08	Q7SF59 Predicted protein GO:0005554 GO:0016020	1.00	1.01	1.24	1.88	1.38	4
BeE120N32C02	No match	1.00	1.09	1.25	3.71	2.08	4
BeE120N32E07	No match	1.00	1.06	0.97	2.04	1.59	4
BeE120N33F08	N/A	1.00	1.32	1.65	2.13	2.20	4
BeE120N35B07	chromosome 6 open reading frame 206 [ <i>Homo sapiens</i> ]	1.00	1.44	1.76	1.36	1.95	4
BeE120N35E11	No match	1.00	1.06	1.97	2.85	2.38	4
BeE120N36A09	No match	1.00	1.21	1.34	1.94	1.63	4
BeE120N36E01	Q88LQ4 Sensor histidine kinase/response regulator	1.00	1.28	2.33	2.11	2.03	4
BeE120N37B08	No hits found	1.00	1.54	1.56	1.59	2.46	4
BeE120N37C08	No match	1.00	2.41	1.60	1.58	2.28	4
BeE120N37G02	No hits found	1.00	1.79	2.00	1.91	2.58	4
BeE120N37G08	No match	1.00	1.50	1.64	1.43	2.73	4
BeE120N38A03	No match	1.00	1.07	1.55	2.13	1.40	4
BeE120N38C06	No match	1.00	2.06	1.77	1.49	1.96	4
BeE120N38F04	No match	1.00	1.61	1.65	1.48	2.19	4
BeE120N38F05	No match	1.00	1.17	1.49	2.23	2.03	4
BeE120N38H05	No match	1.00	1.40	1.39	1.69	2.11	4

BeE30N02B01	O04974 2-isopropylmalate synthase B GO:0016740 GO:	1.00	0.95	1.11	2.39	1.74	4
BeE30N02E03	No hits found	1.00	1.31	1.60	1.51	2.17	4
BeE30N03A06	Q16550 Transcription initiation protein SPT4 homol	1.00	1.62	1.75	1.49	2.64	4
BeE30N03F04	No match	1.00	1.54	1.60	1.36	2.62	4
BeE30N03F08	No match	1.00	1.59	1.50	1.50	2.08	4
BeE30N04H12	No match	1.00	2.20	1.48	2.36	1.99	4
BeE30N06E01	Q9A910 Amino acid permease family protein GO:00068	1.00	1.26	1.37	1.98	2.30	4
BeE30N06F11	No match	1.00	1.44	1.56	1.37	2.19	4
BeE30N07C04	No match	1.00	1.56	1.65	1.40	2.45	4
BeE30N07E02	No hits found	1.00	1.04	1.01	2.03	1.44	4
BeE30N07H02	No match	1.00	1.42	1.40	1.39	2.41	4
BeE30N08F07	No match	1.00	1.65	1.55	1.44	2.35	4
BeE30N10C10	P26354 TATA-box binding protein GO:0006355 GO:0003	1.00	1.39	1.22	1.19	1.98	4
BeE30N20E04	Q9CPX9 Anaphase promoting complex subunit 11 GO:00	1.00	1.50	1.32	1.47	2.46	4
BeE30N21A05	No match	1.00	1.63	1.59	1.46	2.16	4
BeE30N21A09	No match	1.00	1.65	1.57	1.51	2.13	4
BeE60C03D07	N/A	1.00	0.93	1.37	1.60	2.50	4
BeE60C06C11	No match	1.00	1.28	2.95	1.52	2.23	4
BeE60C06F05	N/A	1.00	1.43	1.21	1.45	1.86	4
BeE60C12C11	No hits found	1.00	1.56	1.47	1.45	2.36	4
BeE60C13B06	No hits found	1.00	1.59	1.49	1.49	2.06	4
BeE60C14B06	No hits found	1.00	1.55	1.46	1.33	2.06	4
BeE60C15E02	No match	1.00	1.31	1.28	1.37	2.28	4
BeE60C22C11	N/A	1.00	1.53	1.41	1.42	2.23	4
BeE60C29H10	N/A	1.00	1.57	1.28	1.21	1.83	4
BeE60C30H04	N/A	1.00	1.52	1.60	1.42	2.13	4
BeE60C31D05	hypothetical protein Pflu02002603 [Pseudomonas flu	1.00	1.50	1.55	1.48	2.28	4
BeE60C34G01	Q7WP09 Polysaccharide biosynthesis protein GO:0006	1.00	0.89	1.59	2.10	1.45	4
BeE60C36G04	Q7VUM3 Putative integral membrane transport protei	1.00	0.83	0.96	2.13	1.53	4
BeE60H04E08	Q95XD4 Hypothetical protein GO:0005732 GO:0008248	1.00	1.51	1.40	1.30	1.98	4
BeE60H05F08	No match	1.00	1.71	1.62	1.39	2.81	4
BeE60H06E10	No match	1.00	1.73	1.64	1.36	2.43	4
BeE60H06H11	Q7TPK6 Serine/threonine kinase WNK4 GO:0016740 GO:	1.00	1.56	1.51	1.46	1.96	4
BeE60H07F04	No match	1.00	1.62	1.52	1.43	2.19	4
BeE60H07F09	No match	1.00	1.52	1.58	1.52	2.27	4
BeE60H08A08	No match	1.00	1.32	1.34	1.45	2.41	4
BeE60H08F08	No match	1.00	1.31	1.25	1.72	1.86	4
BeE60H10C10	No match	1.00	1.70	1.43	1.35	2.01	4
BeE60H10E11	P51807 Cytoplasmic dynein light chain GO:0005794 G	1.00	1.67	1.63	1.41	2.22	4
BeE60H11F02	No match	1.00	1.81	1.57	1.44	2.53	4
BeE60H14B12	No match	1.00	1.59	1.49	1.34	2.50	4
BeE60H15G05	N/A	1.00	1.52	1.55	1.54	2.33	4
BeE60H16B07	N/A	1.00	1.69	1.61	1.40	2.58	4
BeE60H16G01	P-type calcium ATPase [Schizosaccharomyces pombe]	1.00	1.56	1.60	1.51	2.35	4
BeE60H17B03	No match	1.00	1.62	1.56	1.47	2.50	4
BeE60H21D10	No match	1.00	1.63	1.39	1.44	2.23	4
BeE60H21F01	No hits found	1.00	1.68	1.77	1.28	2.14	4
BeE60H22C09	Q9D570 4930509O20Rik protein GO:0006464 GO:0004835	1.00	1.63	1.83	1.45	2.04	4
BeE60H23A11	No match	1.00	1.58	1.53	1.48	2.14	4
BeE60H25F12	No match	1.00	1.60	1.39	1.33	1.86	4
BeE60H25G05	No match	1.00	1.50	1.37	1.53	2.07	4
BeE60H26A09	No match	1.00	1.59	1.51	1.48	2.17	4
BeE60H26C05	Q7PY52 AgCP12010 (Fragment) GO:0016020	1.00	1.09	1.25	2.00	1.16	4
BeE60H26D11	No match	1.00	1.45	1.75	2.48	1.81	4
BeE60H26E07	No match	1.00	1.97	2.01	1.54	2.57	4
BeE60H27A04	No match	1.00	1.03	1.66	2.31	1.55	4
BeE60H27H11	No match	1.00	1.60	1.49	1.41	2.01	4
BeE60H28E02	No hits found	1.00	1.55	1.40	1.64	2.07	4
BeE60H29C07	No match	1.00	1.60	1.46	1.45	2.19	4
BeE60H30C05	NADH-quinone oxidoreductase [Gloeophyllum trabeum]	1.00	1.27	1.76	2.41	1.78	4
BeE60H30E06	No hits found	1.00	2.31	1.05	1.05	1.39	4
BeE60H30F11	O74341 T-complex protein 1, gamma subunit GO:00064	1.00	1.79	1.65	2.53	2.45	4
BeE60H30H08	No match	1.00	1.58	1.60	1.40	2.73	4
BeE60H31A03	No match	1.00	1.48	1.48	1.43	2.27	4
BeE60H31B10	Q9Y8H1 Pol GO:0016740 GO:0006333 GO:0003964 GO:000	1.00	1.12	1.63	1.76	2.68	4
BeE60H31C08	No hits found	1.00	1.68	1.42	1.41	2.25	4
BeE60N01G11	No match	1.00	1.66	2.03	1.70	1.98	4
BeE60N02F10	No match	1.00	1.40	1.61	2.77	1.85	4
BeE60N03A03	Q8R1S3 Hypothetical protein GO:0008152 GO:0003824	1.00	1.97	1.46	1.45	2.03	4
BeE60N03A06	P32561 Histone deacetylase RPD3 GO:0006355 GO:0006	1.00	1.44	1.51	1.51	1.89	4
BeE60N03D10	4933427L07Rik protein [Mus musculus]	1.00	1.54	1.69	1.33	2.41	4
BeE60N03G02	Ribosomal protein L35 [Thermoanaerobacter tengcong	1.00	1.33	1.44	1.22	2.48	4
BeE60N06B11	No match	1.00	1.28	1.46	1.69	1.98	4
BeE60N07D05	Q7UHD8 Probable D-alanine-D-alanine ligase GO:0016	1.00	1.25	2.30	2.38	2.17	4
BeE60N08A03	No hits found	1.00	1.69	1.71	1.38	2.81	4
BeE60N08B09	No match	1.00	1.72	1.66	1.55	1.98	4
BeE60N09C04	No match	1.00	1.50	1.57	1.42	2.01	4

BeE60N09E05	No match	1.00	1.71	1.46	1.40	2.48	4
BeE60N09H02	No match	1.00	1.38	1.97	1.64	1.95	4
BeE60N10G08	No match	1.00	1.66	1.35	1.21	2.07	4
BeE60N11H03	Q92356 Probable synaptobrevin homolog C6G9.11 GO:0	1.00	1.17	1.50	1.57	2.25	4
BeE60N12D03	No match	1.00	1.69	1.56	1.58	2.27	4
BeE60N13A03	No match	1.00	1.73	1.72	2.01	1.89	4
BeE60N13H06	hypothetical protein UM03727.1 [Ustilago maydis 52	1.00	1.20	2.30	1.51	1.71	4
BeE60N16B01	No hits found	1.00	1.53	1.66	1.64	2.00	4
BeE60N16B07	No match	1.00	1.22	2.25	1.20	3.41	4
BeE60N16B11	Q7RVR8 Hypothetical protein GO:0016779 GO:0009058	1.00	1.45	2.03	1.35	1.58	4
BeE60N16C02	No match	1.00	1.44	1.53	1.62	2.03	4
BeE60N16E09	No match	1.00	2.99	1.88	2.43	1.83	4
BeE60N17A03	No match	1.00	1.71	1.64	1.38	2.31	4
BeE60N18D05	Q7RVR4 Hypothetical protein GO:0016301 GO:0006468	1.00	1.34	1.51	3.03	1.99	4
BeE60N18D07	Q96W50 Protein kinase Pbs2p GO:0016740 GO:0016301	1.00	1.27	1.16	1.03	1.89	4
BeE60N18G11	O94417 Cell cycle control protein cwf26 GO:0000398	1.00	1.73	1.48	1.28	1.98	4
BeE90D02D05	>Q9M3R8 Hypothetical protein (Fragment) GO:0016216 GO:0017000	1.00	1.65	1.63	1.48	2.58	4
BeE90D11D12	0	1.00	1.48	1.46	1.51	2.06	4
BeE90D12F02	0	1.00	1.68	1.60	1.40	1.95	4
BeE90D12H11	0	1.00	1.61	1.60	1.50	2.55	4
BeE90D13A06	0	1.00	1.67	1.46	1.48	1.82	4
BeE90D14B09	>Q7S4H3 Hypothetical protein GO:0030288 GO:0015035	1.00	1.55	1.51	1.45	2.19	4
BeE90D16F01	>Q9P6Q6 Putative mRNA capping enzyme subunit GO:0004651 GO:0	1.00	1.07	1.11	1.30	2.00	4
BeE90D17H12	0	1.00	1.69	1.51	1.43	2.19	4
BeE90D18C10	0	1.00	1.66	1.51	1.31	2.22	4
BeE90N02H11	N/A	1.00	1.76	1.80	1.49	1.96	4
BeE90N04C12	No match	1.00	1.51	1.37	1.45	2.00	4
BeE90N04E09	Q9BZE7 Hypothetical protein EVG1 GO:0005554 GO:000	1.00	1.31	2.19	1.74	1.57	4
BeE90N07F09	Q7W512 DNA repair protein GO:0006810 GO:0006281 GO	1.00	1.01	1.18	2.01	1.58	4
BeE90N12F11	No match	1.00	0.80	1.30	2.01	1.08	4
BeE90N13G01	No match	1.00	1.56	1.52	1.72	2.14	4
BeE90N15D12	Q8XQM4 Probable drug efflux pump transmembrane pro	1.00	1.36	1.18	1.51	2.22	4
BeE90N15E03	Q9DCM4 Dynein light polypeptide 4, axonemal GO:000	1.00	1.18	2.58	2.50	2.03	4
BeE90N16F09	No hits found	1.00	1.03	2.19	2.07	1.95	4
BeE90N17B04	Q9BW62 Similar to katanin p60 GO:0000166 GO:000552	1.00	1.39	1.37	1.46	2.00	4
BeG120N01F06	O57656 Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD+],	1.00	0.90	1.00	1.72	2.60	4
BeG120N07D07	No hits found	1.00	1.29	1.18	1.14	1.82	4
BeG120N10E08	Q9Y6V7 R27090_2 GO:0004386 GO:0016787 GO:0005524 G	1.00	1.26	1.25	2.58	1.39	4
BeG120N25C09	No match	1.00	1.24	1.36	2.20	1.99	4
BeG120N25D02	Q92341 Hypothetical protein C1F8.03c in chromosome	1.00	1.21	1.36	1.49	2.08	4
BeG30N02F11	O74862 Conserved protein, putative tRNA synthetase	1.00	1.53	1.35	1.43	4.44	4
BeG30N03D09	N/A	1.00	1.51	1.46	1.39	2.10	4
BeG30N03G10	No hits found	1.00	1.62	1.60	1.57	2.51	4
BeG30N04D06	No hits found	1.00	1.70	1.61	1.47	2.71	4
BeG30N04H10	No match	1.00	0.81	0.98	3.16	2.51	4
BeG30N05A12	No match	1.00	1.76	1.58	1.37	2.10	4
BeG30N05B01	No hits found	1.00	1.42	1.36	2.38	2.01	4
BeG30N05H08	No match	1.00	1.31	1.29	1.42	2.07	4
BeG30N06C03	Q9P7N2 Putative clathrin-associated protein GO:000	1.00	1.37	1.27	1.44	2.87	4
BeG30N07F06	No match	1.00	1.78	1.71	1.72	2.79	4
BeG30N13B10	Q04031 D9461.3P GO:0005737 GO:0006364	1.00	1.20	1.21	1.62	2.41	4
BeG30N13H07	Q13685 Angio-associated migratory cell protein GO:	1.00	0.89	1.29	2.07	1.65	4
BeG30N14A02	Q86IU5 Similar to Dictyostelium discoideum GO:0004	1.00	0.92	1.12	1.27	2.11	4
BeG30N14D05	No match	1.00	1.49	1.16	1.54	3.07	4
BeG30N14D11	N/A	1.00	0.97	1.39	2.50	1.75	4
BeG30N15G07	No match	1.00	1.69	1.63	1.44	2.19	4
BeG30N15H10	N/A	1.00	1.31	1.30	1.28	1.94	4
BeG30N16F10	No match	1.00	1.50	1.44	1.43	2.03	4
BeG30N17E10	No match	1.00	1.24	2.20	2.93	2.66	4
BeG30N17F08	No match	1.00	1.44	1.38	1.48	1.94	4
BeG30N17G05	Q14690 RRP5 protein homolog GO:0006396 GO:0005622	1.00	1.23	1.40	1.56	2.08	4
BeG30N18A09	hypothetical protein UM02877.1 [Ustilago maydis 52	1.00	1.13	1.33	1.25	2.77	4
BeG30N19B10	Q7SY07 Hypothetical protein GO:0003723 GO:0003743	1.00	1.54	1.54	1.37	2.10	4
BeG30N19F03	No hits found	1.00	1.58	1.38	1.25	2.28	4
BeG30N19G05	N/A	1.00	1.27	1.69	1.22	2.60	4
BeG60N03A04	No hits found	1.00	1.64	1.67	1.71	2.89	4
BeG60N03A07	No hits found	1.00	1.75	1.77	1.39	2.33	4
BeG60N03E09	hypothetical protein UM01529.1 [Ustilago maydis 52	1.00	1.30	1.26	1.20	2.64	4
BeG60N03G11	No hits found	1.00	1.64	1.56	1.42	2.27	4
BeG60N04H08	No match	1.00	1.02	1.21	1.02	1.98	4
BeG60N06B09	P33339 Transcription factor tau 131 kDa subunit GO	1.00	1.61	1.62	1.33	2.27	4
BeG60N07B05	No match	1.00	1.68	1.61	1.48	2.22	4
BeG60N07D09	Q9NPJ3 Thioesterase superfamily member 2 GO:001678	1.00	0.89	1.58	2.62	2.27	4
BeG60N07F02	No match	1.00	1.20	1.28	1.23	1.76	4
BeG60N08F12	Q12049 YPR045C protein GO:0005634	1.00	1.16	1.37	1.59	3.25	4
BeG60N09H04	No match	1.00	1.48	1.59	1.54	2.60	4
BeG60N10A05	Q8MRC3 RE14858p GO:0009950	1.00	1.34	1.05	1.06	2.13	4

BeG60N12B02	No match	1.00	0.82	1.85	3.01	2.73	4
BeG60N14H10	No match	1.00	1.21	1.33	1.38	1.97	4
BeG60N15A07	No hits found	1.00	1.59	1.55	1.56	2.03	4
BeG60N17B09	No match	1.00	1.71	1.54	1.47	4.89	4
BeG60N19C01	No match	1.00	1.63	1.47	1.39	2.11	4
BeG60N19F08	O76994 INTRONIC protein 259 GO:0005622 GO:0003735	1.00	1.17	1.04	1.45	1.93	4
BeG60N20H04	No hits found	1.00	1.72	1.67	1.44	2.17	4
BeG90N01E04	No hits found	1.00	1.40	1.46	1.25	1.96	4
BeG90N03D06	No match	1.00	1.29	1.27	1.30	2.25	4
BeG90N05C04	No match	1.00	1.50	1.65	1.49	2.30	4
BeG90N05D06	Q8H0V1 CDK5RAP1-like protein GO:0005554 GO:0008372	1.00	1.23	1.22	1.16	2.08	4
BeG90N08D08	No match	1.00	1.61	1.54	1.46	2.93	4
BeG90N09B12	Q27124 Ribonucleotide reductase small subunit GO:00	1.00	1.08	1.09	1.98	2.39	4
BeG90N09D02	Q9ZR56 Ribonucleotide reductase GO:0006260 GO:0005	1.00	1.90	1.31	1.61	2.43	4
BeG90N13B11	putative 40S ribosomal protein S5 [Oryza sativa (j	1.00	1.60	1.50	1.57	2.01	4
BeG90N15A11	No match	1.00	1.62	1.48	1.52	2.16	4
BeG90N16B07	Q84ND4 Cation diffusion facilitator 3 GO:0008324 G	1.00	1.40	1.38	1.33	2.55	4
BeG90N17B11	No match	1.00	1.34	1.24	1.15	1.80	4
BeG90N17C07	No match	1.00	1.55	1.42	1.47	2.50	4
BeG90N17F03	Q9NQT4 Exosome complex exonuclease RRP46 GO:000573	1.00	0.98	1.43	2.38	1.30	4
BeNSVP03B04	N/A	1.00	1.86	1.12	1.27	2.87	4
BeZSPN02G03	No match	1.00	1.35	1.46	1.61	2.10	4
BeZSPN03G09	No match	1.00	1.11	1.08	1.65	2.30	4
BeZSPN05B03	Q9XVZ8 Hypothetical UPF0222 protein Y54G11A.11 in	1.00	1.23	1.25	1.82	2.83	4
BeZSPN06H07	No match	1.00	1.20	0.87	1.21	2.10	4
BeZSPN08E05	Chain B, Design Of Stable Alpha-Helical Arrays Fro	1.00	1.11	1.20	2.27	2.39	4
BeZSPN08G10	No match	1.00	1.36	1.11	1.27	2.00	4
BeZSPN09F02	N/A	1.00	1.22	1.02	1.36	2.27	4
BeZSPN10F01	hypothetical protein LOC375035 [Homo sapiens]	1.00	1.31	1.14	1.27	2.62	4
BeZSPN10G04	No match	1.00	2.38	0.93	1.15	0.93	4
BeZSPN12A12	hypothetical protein AN3222.2 [Aspergillus nidulan	1.00	1.09	1.81	3.07	3.36	4
BeZSPN12B09	No hits found	1.00	1.25	1.23	4.56	2.33	4
BeZSPN13A01	No match	1.00	1.27	1.71	1.59	4.03	4
BeZSPN13E03	N/A	1.00	1.06	1.08	1.93	2.17	4
BeZSPN13H07	No match	1.00	1.04	1.14	1.39	2.81	4
BeZSPN14E08	Q9SHG5 Similar to cytochrome P450 GO:0006118 GO:00	1.00	1.47	1.43	1.41	2.50	4
BeZSPN14H11	conserved hypothetical protein [Sphingomonas elode	1.00	1.29	1.23	1.18	2.89	4
BeZSPN15E02	No match	1.00	0.98	1.08	1.70	2.14	4
BeZSPN15G04	No hits found	1.00	1.15	1.54	2.13	4.29	4
BeZSPN15H09	No match	1.00	2.25	1.33	1.56	2.41	4
BeZSPN16E05	No match	1.00	1.49	1.50	1.39	2.71	4
BeZSPN17G09	Q8BU05 DNA-directed RNA polymerases III 12.5 kDa p	1.00	1.27	1.27	1.57	2.35	4
BeZSPN19A04	N/A	1.00	1.33	1.21	1.49	2.07	4
BeZSPN19C12	N/A	1.00	1.21	1.40	1.52	2.55	4
BeZSPN19D01	No match	1.00	1.33	1.23	1.42	2.23	4
BeZSPN19E08	Q7RZP8 Hypothetical protein GO:0006810 GO:0005743	1.00	0.95	1.27	1.33	2.36	4

Anexo 5: Genes reprimidos em zoósporos.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE120N01E10	hypothetical protein UM02732.1 [Ustilago maydis 52	1.00	0.87	1.13	1.15	0.44	5
BeE120N03E01	Q8Z0N3 D-lactate dehydrogenase GO:0006564 GO:00166	1.00	0.39	0.78	0.84	0.32	5
BeE120N03E08	No match	1.00	1.54	1.47	1.47	0.34	5
BeE120N07D01	No hits found	1.00	0.92	1.10	1.29	0.44	5
BeE120N25H03	Q9LKK9 14-3-3 protein GO:0019904	1.00	1.07	2.48	1.23	0.11	5
BeE120N26G05	P31413 Vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid su	1.00	1.34	2.51	1.08	0.44	5
BeE120N28B05	P48826 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase GO:0016	1.00	0.85	0.95	0.87	0.47	5
BeE120N28H02	O48920 ADP-ribosylation factor GO:0015031 GO:00068	1.00	0.94	2.79	1.83	0.26	5
BeE120N31E07	No match	1.00	1.00	2.48	0.93	0.40	5
BeE120N32A07	Q02088 Tropomyosin GO:0005856	1.00	0.89	1.10	0.96	0.47	5
BeE120N35B10	super cysteine rich protein; SCRIP [Homo sapiens]	1.00	0.36	0.73	0.75	0.17	5
BeE120N36E08	Q7ZTJ4 Similar to ATPase, H+ transporting, lysosom	1.00	1.01	1.37	1.14	0.56	5
BeE120N37A02	Q94GY8 Putative glutathione S-transferase GO:00167	1.00	1.13	1.00	1.22	0.41	5
BeE120N37H01	Q9MZG9 Polyprotein (Fragment) GO:0004252 GO:000650	1.00	1.01	1.56	1.41	0.45	5
BeE30N02H05	Q9P4V2 Phosphoacetylglucosamine mutase GO:0016853	1.00	0.67	0.84	1.02	0.38	5
BeE30N03D10	P25007 Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase GO:0003	1.00	1.32	1.10	0.74	0.11	5
BeE30N03F06	N/A	1.00	0.75	1.04	1.05	0.54	5
BeE30N04B04	Q9UVH9 Fox2 protein GO:0008152 GO:0016491 GO:00054	1.00	2.83	1.32	0.82	0.50	5
BeE30N06E10	No match	1.00	1.18	0.91	0.72	0.47	5
BeE30N07B02	Q9HFY6 Calmodulin GO:0005509	1.00	0.94	1.58	0.94	0.18	5
BeE30N08D02	Q9P7F8 Putative arsenite-translocating ATPase GO:0	1.00	0.98	1.10	0.52	0.37	5
BeE30N10E02	Q7T3D5 Hypothetical protein GO:0005509	1.00	0.92	0.95	0.66	0.23	5
BeE30N10H08	P33723 GTP-binding protein ypt1 GO:0015031 GO:0006	1.00	0.90	1.69	1.43	0.25	5
BeE30N11G06	Q962X9 G10 protein GO:0009405 GO:0005554 GO:000557	1.00	1.55	0.99	0.51	0.46	5
BeE30N13H07	P35278 Ras-related protein Rab-5C GO:0015031 GO:00	1.00	1.01	1.21	0.78	0.46	5
BeE30N14B02	Q7S903 Hypothetical protein GO:0005839 GO:0004175	1.00	2.95	1.01	0.66	0.38	5
BeE30N14E05	No match	1.00	0.65	0.74	0.56	0.18	5
BeE30N15E05	P24410 Ras-related protein Rab-11A GO:0015031 GO:0	1.00	0.66	1.44	0.82	0.23	5
BeE30N15E12	Q9VUJ1 PROSBETA2 protein GO:0016787 GO:0005839 GO:	1.00	1.93	1.40	0.77	0.41	5
BeE30N17E08	P91252 Probable glutathione S-transferase 6 GO:001	1.00	1.51	0.76	0.49	0.38	5
BeE30N22B03	P21976 NADH-ubiquinone oxidoreductase 20.8 kDa sub	1.00	0.94	0.82	0.66	0.36	5
BeE60C19G01	Q9NL98 Thioredoxin peroxidase GO:0004601	1.00	1.20	1.09	0.49	0.07	5
BeE60C24C07	Q7ZA53 FK506-binding protein FKBP12 GO:0006457	1.00	1.16	0.53	0.34	0.11	5
BeE60C31E12	Q94GY8 Putative glutathione S-transferase GO:00167	1.00	1.92	0.78	0.46	0.29	5
BeE60C31H05	No match	1.00	0.39	0.66	1.11	0.23	5
BeE60H04D06	Q8L9U0 Coclaurine N-methyltransferase GO:0016740 G	1.00	1.31	0.90	0.87	0.45	5
BeE60H11C04	Q7YXM3 Thioredoxin peroxidase GO:0004601	1.00	1.22	1.15	0.53	0.10	5
BeE60H11C06	No match	1.00	1.03	1.04	0.75	0.49	5
BeE60H15D02	N/A	1.00	2.10	0.56	0.50	0.20	5
BeE60H17C06	P52495 Ubiquitin-activating enzyme E1 1 (Fragment)	1.00	1.49	0.79	0.42	0.17	5
BeE60H22A08	Similar to tissue specific transplantation antigen	1.00	0.91	1.92	1.06	0.33	5
BeE60H23C11	Q9W227 CG2852 protein GO:0003755 GO:0016853 GO:000	1.00	1.20	0.82	0.56	0.24	5
BeE60H25C12	Q86HU8 Hypothetical protein GO:0006355 GO:0003700	1.00	1.57	2.77	1.99	0.19	5
BeE60H26A01	At1g61150 [Arabidopsis thaliana]	1.00	0.90	0.97	0.71	0.41	5
BeE60H26C08	Q9P3A7 Cell division cycle protein 48 homolog GO:0	1.00	2.27	1.46	0.80	0.45	5
BeE60H26H05	Q09747 Putative ATP-dependent RNA helicase C12C2.0	1.00	0.90	0.86	0.81	0.50	5
BeE60H27A03	O74559 Surfeit locus protein 4 homolog GO:0016021	1.00	1.29	1.89	0.86	0.41	5
BeE60H27C07	Q92196 ATP synthase delta chain, mitochondrial pre	1.00	1.00	0.93	0.85	0.44	5
BeE60H27E10	P41764 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase GO:0016	1.00	0.90	2.45	1.23	0.42	5
BeE60H28B01	P10989 Actin GO:0015629 GO:0005884 GO:0005200 GO:0	1.00	0.93	2.71	1.64	0.28	5
BeE60H28C01	No match	1.00	1.47	1.12	0.87	0.46	5
BeE60H29B11	Q7PM28 ENSANGP00000025012 GO:0005739 GO:0006754	1.00	0.60	0.67	0.43	0.13	5
BeE60H29E07	Q01137 Superoxide dismutase [Cu-Zn] GO:0004785 GO:	1.00	1.18	1.21	0.92	0.30	5
BeE60H30E02	O60953 Proteasome subunit GO:0016787 GO:0005839 GO	1.00	1.82	1.35	0.87	0.36	5
BeE60H30H04	O93887 G-protein beta subunit GPB1 GO:0005834 GO:0	1.00	0.78	1.39	1.81	0.51	5
BeE60N01B11	O94137 Malate dehydrogenase GO:0016491 GO:0030060	1.00	0.69	0.87	0.89	0.31	5
BeE60N01C08	glutamate--ammonia ligase; glutamine synthetase [S	1.00	0.92	0.95	1.01	0.31	5
BeE60N01G04	No match	1.00	1.71	0.99	0.76	0.37	5
BeE60N02A06	Q9P3F0 Related to ubiquitin-activating enzyme homo	1.00	1.49	1.41	0.94	0.40	5
BeE60N02F11	Q13200 26S proteasome non-ATPase regulatory subuni	1.00	2.10	1.64	0.88	0.34	5
BeE60N03E07	Q99JZ6 Hypothetical protein GO:0007018 GO:0005874	1.00	1.11	1.36	0.72	0.10	5
BeE60N03F03	Q7S0B7 Hypothetical protein GO:0016051 GO:0008152	1.00	0.84	1.16	1.28	0.12	5
BeE60N03G10	Q7SBV0 Hypothetical protein GO:0008757 GO:0008825	1.00	6.59	0.80	0.62	0.32	5
BeE60N04D07	predicted protein [Neurospora crassa]	1.00	1.03	1.13	0.80	0.23	5
BeE60N04G02	Q95U46 GH07925p GO:0003995 GO:0006118 GO:0016491	1.00	0.61	0.85	1.00	0.44	5
BeE60N04H05	Q9BPW0 Hypothetical serine/threonine protein phosph	1.00	1.58	1.37	0.87	0.38	5
BeE60N05B04	Q7S181 Carboxypeptidase GO:0004180 GO:0004185 GO:0	1.00	1.88	0.87	0.59	0.36	5
BeE60N05D05	Q8EBH2 Transaldolase GO:0016740 GO:0006098 GO:0005	1.00	0.91	1.03	1.49	0.37	5
BeE60N05D09	No match	1.00	1.53	1.83	1.02	0.46	5
BeE60N06C09	No match	1.00	1.01	1.28	0.80	0.28	5
BeE60N07C06	Q9UTM4 T-complex protein 1, epsilon subunit GO:000	1.00	1.22	0.63	0.79	0.36	5
BeE60N07C12	Q7ZWF5 Similar to glutamate oxaloacetate transamin	1.00	0.24	0.58	0.59	0.09	5
BeE60N08H03	Q7PGR3 ENSANGP00000023984 (Fragment) GO:0005737 GO	1.00	1.81	2.35	0.91	0.36	5
BeE60N09A10	Q96WN5 Dolichyl-phosphate-mannose:protein mannosyl	1.00	1.26	1.46	1.07	0.42	5

BeE60N10A01	P38264 Inorganic phosphate transporter PHO88 GO:00	1.00	0.71	0.79	0.46	0.24	5
BeE60N10B03	Q7SEH8 Hypothetical protein GO:0015992 GO:0016020	1.00	1.72	1.94	1.03	0.33	5
BeE60N10D10	Q7S2D6 Hypothetical protein GO:0005839 GO:0004175	1.00	1.63	1.28	0.78	0.34	5
BeE60N10E08	>Q8X077 Probable proteasome subunit alpha type 2 GO:0016787 GO:	1.00	1.21	1.14	0.91	0.43	5
BeE60N10E10	P19984 Profilin II GO:0015629 GO:0007010 GO:000585	1.00	1.14	2.10	1.59	0.25	5
BeE60N10F07	Q7ZWR6 Similar to ATP synthase, H+ transporting mi	1.00	0.56	0.54	0.38	0.12	5
BeE60N11C02	O49847 Potassium channel beta subunit (Fragment) G	1.00	1.17	1.05	0.90	0.52	5
BeE60N12F10	hypothetical protein Tery02003600 [Trichodesmium e	1.00	0.90	1.62	0.81	0.43	5
BeE60N12G09	P07436 Tubulin beta-1 chain GO:0007018 GO:0005874	1.00	1.20	2.01	1.86	0.17	5
BeE60N13D02	No hits found	1.00	1.43	1.44	1.26	0.32	5
BeE60N13F03	No match	1.00	1.11	1.15	0.61	0.21	5
BeE60N13F07	P32799 Cytochrome c oxidase polypeptide VIa, mitoc	1.00	0.78	0.98	0.95	0.43	5
BeE60N14C07	O14413 Proteinase A GO:0004194 GO:0016787 GO:00065	1.00	2.19	1.19	0.66	0.32	5
BeE60N16C07	hypothetical protein FLJ10817 [Homo sapiens]	1.00	0.92	1.44	0.87	0.57	5
BeE60N16G08	No match	1.00	1.02	0.79	0.57	0.24	5
BeE60N16H03	Q8GAQ0 BarJ GO:0006118	1.00	1.85	1.14	0.78	0.26	5
BeE60N18B12	P53490 Actin-like protein 3 GO:0015629 GO:0005856	1.00	0.94	1.10	0.94	0.38	5
BeE60N18C09	Q90ZF4 V-ATPase subunit A GO:0008553 GO:0006810 GO	1.00	1.46	1.85	1.47	0.35	5
BeE60N18C10	Acyl carrier protein, mitochondrial precursor (ACP	1.00	0.78	1.23	1.04	0.44	5
BeE60N19B12	GA21201-PA [Drosophila pseudoobscura]	1.00	1.29	1.36	0.75	0.49	5
BeE60N20D03	No hits found	1.00	0.84	1.17	0.72	0.26	5
BeE90D02B10	>Q63716 Peroxiredoxin 1 GO:0004601 GO:0016491 GO:16209	1.00	1.11	0.75	0.38	0.24	5
BeE90D02C04	>Q99NB9 Splicing factor 3B subunit 1 GO:0000398 GO:0005681 GO:(	1.00	0.99	1.24	0.83	0.33	5
BeE90D12G12	>P48611 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase GO:0006728 GO:00067	1.00	0.49	0.59	0.56	0.07	5
BeE90D14D07	0	1.00	0.36	0.61	0.55	0.08	5
BeE90D16A05	>P48580 Serine/threonine protein phosphatase PP2A catalytic subunit	1.00	1.26	1.33	1.23	0.29	5
BeE90D16C06	>P91252 Probable glutathione S-transferase 6 GO:0016740 GO:00081	1.00	1.94	0.79	0.35	0.16	5
BeE90D17B09	0	1.00	0.77	1.32	1.00	0.54	5
BeE90D18B09	hypothetical protein TeryDRAFT_0874 [Trichodesmium erythraeum	1.00	1.01	1.02	0.84	0.30	5
BeE90N08B10	N/A	1.00	1.25	1.20	0.93	0.45	5
BeE90N08E06	single-strand binding protein (SSB) (Helix-destabi	1.00	1.02	0.77	0.77	0.37	5
BeE90N15E12	Q7S9A9 Hypothetical protein GO:0004645 GO:0005975	1.00	0.84	0.90	0.69	0.40	5
BeE90N18E01	Q9C271 Probable cell division control protein CDC1	1.00	0.97	1.47	1.10	0.45	5
BeE90N21E01	N/A	1.00	1.15	1.93	1.47	0.38	5
BeG120N05G05	P48826 Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase GO:0016	1.00	0.80	0.95	0.90	0.49	5
BeG120N05H09	Q64152 Transcription factor BTF3 GO:0006355 GO:000	1.00	0.84	0.77	0.86	0.40	5
BeG120N07D05	No match	1.00	0.39	1.03	1.61	0.59	5
BeG120N07E03	Q9P8H0 Rph1 GO:0005622 GO:0008565 GO:0006606 GO:000	1.00	1.16	0.96	0.35	0.07	5
BeG120N07H08	O74699 Aconitase GO:0016836 GO:0008152 GO:0005739	1.00	0.71	0.86	0.88	0.30	5
BeG120N09B09	Q04767 Hypothetical 18.7 kDa protein in HMS1-ABF2	1.00	1.61	1.58	0.91	0.38	5
BeG120N09D05	Q9LKK9 14-3-3 protein GO:0019904	1.00	1.20	2.08	1.25	0.16	5
BeG120N14G12	No match	1.00	0.53	1.23	1.75	0.26	5
BeG120N16E05	P43098 Fatty acid synthase subunit alpha GO:001674	1.00	0.98	0.75	0.73	0.43	5
BeG120N19F03	No hits found	1.00	0.61	0.66	0.61	0.26	5
BeG120N20D07	Q8LD10 Hypothetical protein GO:0006118 GO:0005489	1.00	0.76	0.94	0.87	0.40	5
BeG120N25A08	O14334 Probable prefoldin subunit 1 GO:0003754	1.00	1.70	0.83	0.72	0.21	5
BeG30N01B10	P06544 Thioredoxin 1 GO:0006118 GO:0005489	1.00	0.73	0.90	0.83	0.41	5
BeG30N04E01	Q8JHX9 Glutamate dehydrogenase 3 GO:0006520 GO:001	1.00	0.71	1.19	0.86	0.47	5
BeG30N16H12	O18694 F28F8.3 protein GO:0005732 GO:0008248 GO:00	1.00	1.18	0.89	0.53	0.23	5
BeG60N01B06	Q84P58 Adenosine kinase-like protein (Fragment) GO	1.00	0.82	1.21	1.33	0.55	5
BeG60N07F05	Q9C6K5 Sm-like protein GO:0005732 GO:0008248 GO:00	1.00	1.79	1.31	1.14	0.52	5
BeG60N14B04	hypothetical protein CNBC4290 [Cryptococcus neofor	1.00	0.83	1.06	1.26	0.37	5
BeG60N17D07	No match	1.00	1.00	1.09	0.79	0.30	5
BeG90N06G12	Q7ZVC7 Hypothetical protein GO:0000062	1.00	1.14	0.71	0.58	0.29	5
BeG90N07C10	Q8TGD1 Putative mitochondrial carrier protein GO:0	1.00	0.68	0.94	0.82	0.34	5
BeG90N10B05	Q8KCK4 Glutamine synthetase GO:0009399 GO:0004356	1.00	0.72	0.86	0.63	0.19	5
BeG90N16G12	Q01475 GTP-binding protein sar1 GO:0015031 GO:0006	1.00	1.02	0.85	0.61	0.22	5
BeG90N17D12	No hits found	1.00	0.54	0.67	2.43	0.35	5
BeG90N18H07	Q87410 Isopentenyl diphosphate isomerase GO:000445	1.00	0.74	0.75	0.95	0.47	5
BeG90N22C02	Q9PTW9 Proteasome subunit alpha type 7 GO:0016787	1.00	2.45	1.58	0.84	0.42	5
BeNSVP01A12	No match	1.00	1.11	2.33	1.61	0.34	5
BeNSVP02G09	Q9P2X0 Dolichol-phosphate mannosyltransferase subu	1.00	1.17	0.87	0.85	0.48	5
BeNSVP07B10	proton glutamate symport protein [Bradyrhizobium j	1.00	4.69	2.00	1.92	0.23	5
BeZSPN09F10	Q8J267 Aconitase (Fragment) GO:0016836 GO:0008152	1.00	0.60	0.64	1.02	0.36	5

Anexo 6: Genes fortemente induzidos durante a esporulação de *B. emersonii*.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE120N01H03	No match	1.00	8.51	4.59	8.46	4.50	6
BeE120N02A09	23K integral membrane protein - fluke (Schistosoma	1.00	1.04	2.07	4.29	2.79	6
BeE120N03D02	No match	1.00	1.24	10.13	13.27	2.64	6
BeE120N20H04	likely protein kinase [Candida albicans SC5314]	1.00	0.88	8.00	23.59	1.06	6
BeE120N22C08	No match	1.00	0.89	1.36	9.06	1.84	6
BeE120N26B11	O60931 Cystinosin GO:0006810 GO:0016021 GO:0015811	1.00	1.07	1.46	4.17	3.03	6
BeE120N28B11	No match	1.00	0.91	3.03	9.65	1.77	6
BeE120N35C12	No hits found	1.00	1.20	2.45	3.27	3.66	6
BeE120N38E01	No hits found	1.00	1.26	5.17	18.38	14.93	6
BeE60C05C02	No hits found	1.00	1.53	2.83	3.84	2.41	6
BeE60C25D08	Q88P63 Conserved hypothetical protein GO:0016020	1.00	1.00	1.61	8.82	2.53	6
BeE60H32E11	No match	1.00	1.40	8.82	8.00	2.53	6
BeE60N10H07	Q9BQH6 Hypothetical protein GO:0005083	1.00	1.19	3.25	9.38	2.01	6
BeE60N12E11	Q9NY68 CTL2 protein GO:0016021 GO:0015871 GO:00152	1.00	0.95	2.68	10.20	2.69	6
BeE60N16D02	P34046 Guanine nucleotide-binding protein alpha-8	1.00	1.27	6.82	7.41	1.80	6
BeE60N19C09	No match	1.00	5.70	17.88	37.53	11.16	6
BeE90N21E03	N/A	1.00	1.26	3.01	9.38	4.69	6
BeG120N09E12	No hits found	1.00	1.52	2.14	6.36	2.68	6
BeG30N14D01	No hits found	1.00	0.89	1.76	4.59	3.05	6
BeG30N20G10	ABC transporter-like protein [Arabidopsis thaliana	1.00	0.97	2.27	3.01	3.25	6
BeG60N14D06	No hits found	1.00	1.26	2.46	5.06	2.64	6
BeG60N14D07	No match	1.00	0.69	1.38	4.53	3.53	6
BeG90N03D10	No match	1.00	0.85	2.77	11.00	38.32	6
BeG90N10E11	No match	1.00	1.48	2.79	4.29	3.20	6
BeZSPN03D08	No hits found	1.00	2.41	3.63	6.02	4.79	6
BeZSPN11A12	No match	1.00	1.48	4.29	20.11	10.78	6
BeZSPN13C02	No match	1.00	1.00	1.40	6.54	126.24	6
BeZSPN13F01	No match	1.00	0.66	0.90	5.06	43.41	6
BeZSPN14D10	O93787 Chs3 GO:0016758	1.00	1.01	1.68	5.24	4.41	6
BeZSPN15B02	No match	1.00	1.58	3.61	7.46	8.06	6
BeZSPN15B04	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	1.00	2.66	5.13	4.53	6
BeZSPN16A12	No match	1.00	1.25	2.60	5.54	5.82	6
BeZSPN16B04	Aqualysin I precursor	1.00	1.00	1.71	4.17	10.85	6
BeZSPN16G12	N/A	1.00	0.97	0.90	3.07	8.94	6
BeZSPN16H11	Q8W0U2 Hypothetical protein GO:0016020	1.00	0.76	1.03	4.26	7.84	6
BeZSPN17B10	No match	1.00	1.05	1.27	2.57	52.71	6
BeZSPN17D01	No match	1.00	1.54	2.95	4.50	3.92	6
BeZSPN18A11	No match	1.00	1.76	3.07	6.77	3.71	6
BeZSPN19D07	N/A	1.00	1.17	1.13	2.19	11.16	6
BeZSPN19G06	No match	1.00	1.07	2.57	4.72	4.89	6

Anexo 7: Genes ligeiramente reprimidos durante a esporulação de *B. emersonii*.

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE120N02C09	No match	1.00	0.47	0.52	0.52	0.30	7
BeE120N04C06	unnamed protein product [Debaryomyces hansenii]	1.00	0.79	0.60	0.67	0.41	7
BeE120N06F04	Q9FJX2 60S ribosomal protein L26B GO:0005622 GO:00	1.00	0.84	0.69	0.38	0.47	7
BeE120N08C10	No match	1.00	0.57	0.87	1.08	0.54	7
BeE120N21F10	N/A	1.00	0.77	0.66	0.75	0.46	7
BeE120N26D02	P41805 60S ribosomal protein L10 GO:0005622 GO:000	1.00	0.84	0.62	0.33	0.50	7
BeE120N37D12	P38665 60S ribosomal protein L24 GO:0005622 GO:000	1.00	0.59	0.50	0.66	0.44	7
BeE120N38G11	Q8U9Y0 Electron transfer flavoprotein beta subunit	1.00	0.83	0.75	0.55	0.36	7
BeE30N02B11	Q03529 Inositolphosphorylceramide-B C-26 hydroxyla	1.00	0.79	0.94	0.67	0.51	7
BeE30N02D11	P34091 60S ribosomal protein L6 GO:0005622 GO:0003	1.00	0.60	0.64	0.41	0.33	7
BeE30N02E08	Q7S5S5 Hypothetical protein GO:0016020	1.00	0.77	0.55	0.47	0.69	7
BeE30N05E04	Q7Z940 Succinyl-CoA synthetase, beta subunit GO:00	1.00	0.72	0.62	0.46	0.25	7
BeE30N06B11	No match	1.00	0.89	0.57	0.48	0.59	7
BeE30N06C01	P50523 Ubiquinol-cytochrome C reductase complex ub	1.00	0.47	0.83	0.64	0.53	7
BeE30N06H07	O14224 Rho gdp dissociation inhibitor GO:0005094 G	1.00	0.87	0.95	0.44	0.43	7
BeE30N07A05	Q7SYP6 Hypothetical protein GO:0004645	1.00	0.76	0.70	0.53	0.31	7
BeE30N07G12	O83041 Probable proline iminopeptidase GO:0006725	1.00	0.78	0.73	0.68	0.51	7
BeE30N08D06	O43660 Pleiotropic regulator 1 GO:0000398 GO:00037	1.00	0.73	0.54	0.53	0.65	7
BeE30N08H12	P94907 2-isopropylmalate synthase GO:0016740 GO:00	1.00	0.65	0.57	0.66	0.54	7
BeE30N09G01	Q9M4C4 Probable prefoldin subunit 4 GO:0003754	1.00	0.89	0.64	0.48	0.36	7
BeE30N09G11	O13580 Manganese resistance 1 protein GO:0016021 G	1.00	0.79	0.52	0.50	0.70	7
BeE30N10A04	No match	1.00	0.66	0.58	0.66	0.53	7
BeE30N10C03	Q9W2N0 F-actin capping protein alpha subunit GO:00	1.00	0.78	0.58	0.54	0.54	7
BeE30N10D01	Q9UKU7 Acyl-CoA dehydrogenase family member 8, mit	1.00	1.02	0.71	0.83	0.51	7
BeE30N11H06	No match	1.00	0.56	0.54	0.66	0.77	7
BeE30N13A06	N/A	1.00	0.57	0.64	0.57	0.40	7
BeE30N13C08	Q91V01 Putative transmembrane protein PTG GO:00160	1.00	0.95	0.64	0.57	0.71	7
BeE30N13E04	P28748 GTP-binding nuclear protein spi1 GO:0015031	1.00	0.60	0.64	0.44	0.61	7
BeE30N14F04	Q92SR2 Putative glutathione S-transferase protein	1.00	0.95	0.74	0.69	0.45	7
BeE30N15B02	N/A	1.00	1.30	0.43	0.61	0.51	7
BeE30N16B09	O77622 T-complex protein 1, zeta subunit GO:000645	1.00	1.51	0.47	0.34	0.26	7
BeE30N17G08	Q7ZV49 Hypothetical protein GO:0004422 GO:0005737	1.00	0.64	0.63	0.97	0.51	7
BeE30N18D06	Q9C474 RNA polymerase II subunit 7 GO:0003723 GO:0	1.00	0.93	0.61	0.47	0.68	7
BeE30N19C11	No hits found	1.00	0.77	0.65	0.75	0.44	7
BeE30N19F07	P24487 ATP synthase alpha chain, mitochondrial pre	1.00	0.87	0.64	0.41	0.24	7
BeE30N20B03	No match	1.00	0.83	0.47	0.43	0.74	7
BeE30N20G07	No match	1.00	0.64	0.72	0.52	0.43	7
BeE30N21H07	P06738 Glycogen phosphorylase GO:0016740 GO:000597	1.00	1.16	0.84	0.67	0.49	7
BeE30N22D03	Q86ZV7 Succinyl-CoA synthetase alpha subunit GO:00	1.00	0.72	0.68	0.59	0.31	7
BeE30N22H03	Q9UTS0 Hypothetical subtilase-type proteinase C100	1.00	0.93	0.63	0.52	0.41	7
BeE60C03H04	N/A	1.00	1.12	0.22	0.69	0.23	7
BeE60C04F02	No hits found	1.00	0.72	0.62	0.57	0.73	7
BeE60C05B03	Q87WW3 Conserved hypothetical protein GO:0003824	1.00	0.85	0.45	0.58	0.83	7
BeE60C06H06	Q7WWT9 Putative NagM-like protein GO:0005554 GO:00	1.00	0.69	0.48	0.43	0.67	7
BeE60C08E01	Q8H727 ADP/ATP translocase GO:0006810 GO:0005743 G	1.00	0.62	0.58	0.60	0.40	7
BeE60C18H05	No match	1.00	0.81	0.66	0.61	0.55	7
BeE60C19C09	O14095 Hypothetical protein C2F3.12c in chromosome	1.00	0.71	0.62	0.79	0.36	7
BeE60C24F01	N/A	1.00	0.81	0.50	0.52	0.78	7
BeE60C26F01	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	1.00	1.06	0.53	0.50	0.48	7
BeE60H03F06	O74507 Hypothetical protein GO:0016021	1.00	0.84	0.68	0.55	0.41	7
BeE60H04C08	No match	1.00	0.72	0.56	0.76	0.53	7
BeE60H05A12	No match	1.00	0.88	0.55	0.55	0.48	7
BeE60H05E07	No match	1.00	0.63	0.52	0.62	0.71	7
BeE60H06A02	>P48720 Heat shock 70 kDa protein GO:0005524 GO:0003754	1.00	0.79	0.56	0.50	0.32	7
BeE60H06A07	N/A	1.00	0.88	0.60	0.51	0.87	7
BeE60H06C04	No match	1.00	0.97	0.67	0.57	1.00	7
BeE60H06D11	0	1.00	0.99	0.59	0.55	0.39	7
BeE60H07D11	No match	1.00	0.74	0.53	0.62	0.67	7
BeE60H07F03	PREDICTED: similar to SFLQ611 [Canis familiaris]	1.00	0.66	0.45	0.42	0.61	7
BeE60H08B05	N/A	1.00	0.80	0.38	0.45	0.81	7
BeE60H09C11-1	N/A	1.00	1.03	0.44	0.50	0.87	7
BeE60H10E07	t-complex protein 1, theta subunit (tcp-1-theta),	1.00	0.74	0.54	0.54	0.64	7
BeE60H14B07	P41887 Heat shock protein 90 homolog GO:0006457 GO	1.00	1.69	0.55	0.49	0.33	7
BeE60H17F01	No match	1.00	0.79	0.53	0.56	0.83	7
BeE60H19B03	N/A	1.00	0.74	0.53	0.41	0.40	7
BeE60H20C05	>P22774 Heat shock 70 kDa protein, mitochondrial precursor GO:0005	1.00	0.65	0.55	0.45	0.39	7
BeE60H22D05	P40513 Mitochondrial acidic protein MAM33, mitocho	1.00	0.72	0.52	0.39	0.53	7
BeE60H25E09	O74892 40S ribosomal protein S2 GO:0005622 GO:0003	1.00	0.68	0.53	0.48	1.63	7
BeE60H28F09	No match	1.00	0.61	0.52	0.46	0.58	7
BeE60H29D03	Q7XZG6 Putative RNA binding protein GO:0003676	1.00	1.45	0.65	0.61	0.50	7
BeE60H29E08	No match	1.00	0.82	0.49	0.43	0.55	7
BeE60H29F06	Q9RZ26 GMC oxidoreductase GO:0006118 GO:0016491	1.00	0.76	0.63	0.65	0.59	7
BeE60H29G12	P32368 Recessive suppressor of secretory defect GO	1.00	0.74	0.60	0.59	0.54	7
BeE60H30A10	N/A	1.00	0.84	0.51	0.37	0.47	7

BeE60H30A11	Q00216 Putative disulfide isomerase TIGA precursor	1.00	0.96	0.68	0.54	0.54	7
BeE60H30E04-1	RuvB-like 1 (Pontin)	1.00	0.62	0.55	0.44	0.61	7
BeE60H30F05	Q96C51 Hypothetical protein (Fragment) GO:0006457	1.00	1.29	0.43	0.37	0.40	7
BeE60H31D07	Q9USR1 Thioredoxin-like protein GO:0006118 GO:0005	1.00	1.06	0.80	0.74	0.49	7
BeE60H31F10	Q9HCT3 RP42 protein GO:0005554 GO:0000004 GO:00083	1.00	0.61	0.61	0.38	0.55	7
BeE60H32B03	N/A	1.00	0.77	0.50	0.41	0.66	7
BeE60H32C06	Q7SD62 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.51	0.54	0.41	0.62	7
BeE60N02F03	Q7ZYC8 Similar to FK506 binding protein 2 GO:00064	1.00	1.01	0.75	0.67	0.54	7
BeE60N03H02	Q9NAR5 Eukaryotic translation initiation factor 2	1.00	0.82	0.70	0.62	0.43	7
BeE60N04A10	Q96VU9 Cofilin GO:0005622 GO:0003779	1.00	0.77	0.71	0.64	0.39	7
BeE60N06B07	P59999 ARP2/3 complex 20 kDa subunit GO:0005885 GO	1.00	1.23	0.55	0.34	0.31	7
BeE60N07B05	Q9NAE2 Probable urocanate hydratase GO:0006547 GO:	1.00	0.65	0.67	0.55	0.27	7
BeE60N08H02	O13350 ATP synthase D chain, mitochondrial GO:0005	1.00	0.82	0.79	0.73	0.53	7
BeE60N11B06	No match	1.00	0.85	0.67	0.87	0.49	7
BeE60N11C12	Q7S952 Hypothetical protein GO:0006810 GO:0005743	1.00	0.63	0.57	0.64	0.51	7
BeE60N11F06	Q8X1D0 Isocitrate dehydrogenase (Fragment) GO:0008	1.00	0.76	0.48	0.38	0.44	7
BeE60N16E03	P51635 Alcohol dehydrogenase [NADP+] GO:0016491 GO	1.00	1.27	0.80	0.48	0.50	7
BeE60N16F09	Q95V46 Chaperonin subunit 1 GO:0006457 GO:0005524	1.00	1.07	0.55	0.54	0.41	7
BeE90D01G09	0	1.00	0.57	0.50	0.44	0.55	7
BeE90D04A06	0	1.00	0.61	0.51	0.50	0.75	7
BeE90D05F08	0	1.00	0.60	0.65	0.56	0.33	7
BeE90D06D09	>Q9FJX2 60S ribosomal protein L26B GO:0005622 GO:0003735 GO:1	1.00	0.84	0.66	0.54	0.52	7
BeE90D10C03	0	1.00	0.61	0.60	0.53	0.56	7
BeE90D11H09	0	1.00	0.85	0.49	0.68	0.41	7
BeE90D13E09	>Q88LT3 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase GO:16740	1.00	0.42	1.23	0.85	0.98	7
BeE90D17D02	>Q84JS5 Hypothetical protein GO:6950	1.00	0.82	0.66	0.53	0.37	7
BeE90N04D11	metacaspase, putative [Cryptococcus neoformans var	1.00	0.58	0.73	0.92	0.73	7
BeE90N06B10	Q9RUE8 Probable ABC transporter binding protein DR	1.00	0.64	0.49	0.45	0.45	7
BeE90N06H03	Q81CV0 Hydrolase GO:0008152 GO:0008967 GO:0016787	1.00	0.23	0.32	7.11	0.63	7
BeE90N17D05	Q9WU83 Dolichol-phosphate mannosyltransferase GO:0	1.00	1.07	0.78	0.33	0.33	7
BeE90N22H04	N/A	1.00	0.67	0.58	0.60	0.57	7
BeE90N25C12	N/A	1.00	0.77	0.62	0.53	0.60	7
BeE90N26C08	N/A	1.00	1.07	0.81	0.55	0.59	7
BeG120N01H03	Q7ZWL1 Similar to prolyl endopeptidase (Fragment)	1.00	0.79	0.66	0.70	0.41	7
BeG120N02B04	P32469 Diphthine synthase GO:0016740 GO:0008152 GO	1.00	0.53	0.76	0.34	0.24	7
BeG120N05C09	Q9Y6D2 N-acetyltransferase 5 GO:0016740 GO:0008415	1.00	0.98	0.66	0.40	0.38	7
BeG120N07C03	Q84VI6 Phosphate transporter HvPT7 GO:0006810 GO:0	1.00	0.60	0.50	0.54	1.34	7
BeG120N08B11	Q94JQ7 At1g07830/F24B9_7 GO:0005622 GO:0003735 GO:	1.00	0.63	0.66	0.61	0.48	7
BeG120N11D04	No match	1.00	0.61	0.71	0.76	0.53	7
BeG120N16A06	Q8R0B2 Hypothetical protein (Fragment) GO:0004239	1.00	0.53	0.72	0.54	1.21	7
BeG120N17B10	P51398 Mitochondrial 28S ribosomal protein S29 GO:	1.00	0.76	0.64	0.65	0.42	7
BeG120N23B05	Q99832 T-complex protein 1, eta subunit GO:0006457	1.00	1.20	0.56	0.51	0.37	7
BeG120N23E01	O13302 Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit 1, m	1.00	0.61	0.63	0.48	0.25	7
BeG120N23E11	Q99L23 Similar to NADH dehydrogenase (Fragment) GO	1.00	0.76	0.95	0.50	0.43	7
BeG120N24A07	Q8H727 ADP/ATP translocase GO:0006810 GO:0005743 G	1.00	0.55	0.58	0.62	0.33	7
BeG120N26D12	Q9Y8G5 NAD-specific glutamate dehydrogenase GO:000	1.00	0.52	0.59	0.51	0.24	7
BeG30N02D09-2	No match	1.00	0.75	0.44	0.44	0.52	7
BeG30N02F02	No match	1.00	0.57	0.88	0.66	0.48	7
BeG30N03F10	No match	1.00	0.91	0.67	0.54	0.49	7
BeG30N04A03	O14027 Hypothetical protein C29B12.04 in chromosom	1.00	0.51	0.50	0.68	0.37	7
BeG30N04H03	Q7S5A1 Hypothetical protein GO:0006457 GO:0016272	1.00	1.00	0.67	0.51	0.40	7
BeG30N04H11	Q7Z8B6 H(+)-ATPase GO:0015662 GO:0008553 GO:000815	1.00	0.67	0.35	0.61	1.61	7
BeG30N05B12	No match	1.00	0.72	0.69	0.40	0.69	7
BeG30N05H06	P52808 60S ribosomal protein L30-1 GO:0005622 GO:0	1.00	0.67	0.57	0.33	0.86	7
BeG30N07G09	Q7NI34 Gll2350 protein GO:0006865 GO:0006810 GO:00	1.00	0.64	0.57	0.42	1.34	7
BeG30N07H02	N/A	1.00	0.72	0.50	0.69	1.01	7
BeG30N09B07	O74330 40S ribosomal protein S27 GO:0005622 GO:000	1.00	0.84	0.45	0.44	0.57	7
BeG30N10E11	N/A	1.00	0.98	0.42	0.36	0.73	7
BeG30N10G03	N/A	1.00	0.57	0.51	0.43	0.59	7
BeG30N12A09	No match	1.00	0.74	0.54	0.52	1.25	7
BeG30N12E04	No match	1.00	0.77	0.64	0.52	0.65	7
BeG30N12F07	O43120 Splicing factor U2AF-associated protein 2 G	1.00	0.62	0.56	0.61	0.81	7
BeG30N12H01	No match	1.00	0.76	0.67	0.57	0.88	7
BeG30N12H12	N/A	1.00	0.67	0.55	0.44	0.65	7
BeG30N14H06	hypothetical protein CNBN1570 [Cryptococcus neofor	1.00	0.89	0.70	0.46	0.35	7
BeG30N15A08	unknown [Ambystoma tigrinum stebbensi virus]	1.00	0.26	0.67	0.69	0.45	7
BeG30N15B12	P07259 URA1 protein [Includes: Glutamine-dependent	1.00	0.60	0.64	0.60	0.58	7
BeG30N15D05	Q8Y2Q8 Probable carbonic anhydrase protein GO:0008	1.00	0.71	0.71	0.66	0.38	7
BeG30N19C05	Q63424 Oligopeptide transporter, kidney isoform GO	1.00	0.74	0.65	0.40	0.66	7
BeG60N01F08	zinc finger protein, putative [Cryptococcus neofor	1.00	3.14	0.87	0.36	0.53	7
BeG60N03D01	avirulence protein AvrXa7-4M [Xanthomonas oryzae p	1.00	0.88	0.58	0.78	0.57	7
BeG60N03E12	conserved hypothetical protein [Entamoeba histolyt	1.00	0.64	0.54	0.49	0.69	7
BeG60N04B05	N/A	1.00	0.50	0.51	0.51	0.66	7
BeG60N04D09	P07806 Valyl-tRNA synthetase, mitochondrial precu	1.00	0.71	0.78	0.67	0.50	7
BeG60N05A06	Q7PSD1 ENSANGP00000016179 GO:0005525	1.00	0.77	0.55	0.47	0.31	7
BeG60N08D11	P50886 60S ribosomal protein L22 GO:0005622 GO:000	1.00	0.70	0.55	0.44	0.50	7
BeG60N08E04	O42468 PP2A inhibitor GO:0003677 GO:0006334 GO:000	1.00	0.49	0.62	0.73	0.41	7

BeG60N14E04	No match	1.00	0.58	0.44	0.65	0.50	7
BeG90N01F12	No hits found	1.00	0.79	0.46	0.53	0.67	7
BeG90N01G09	Q7NJZ3 Ribose 5-phosphate epimerase GO:0005975	1.00	0.57	0.81	0.75	0.40	7
BeG90N01H11	PREDICTED: similar to axonemal dynein heavy chain	1.00	0.54	0.51	0.51	0.52	7
BeG90N02H02	Q871M5 Probable nucleosome assembly protein I GO:0	1.00	0.69	0.61	0.36	0.44	7
BeG90N02H08	Q9BPV9 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.59	0.48	0.45	0.50	7
BeG90N03D07	O94501 T-complex protein 1, alpha subunit GO:00064	1.00	1.68	0.54	0.45	0.35	7
BeG90N03F03	Q9C5Z2 Eukaryotic translation initiation factor 3	1.00	0.88	0.90	0.68	0.57	7
BeG90N03H04	O74225 Heat shock protein Hsp88 GO:0003773 GO:0005	1.00	0.74	0.69	0.83	0.50	7
BeG90N04A04	Probable eukaryotic translation initiation factor	1.00	0.67	0.88	0.68	0.54	7
BeG90N05E08	Q09171 Pyruvate dehydrogenase E1 component beta su	1.00	0.67	0.71	0.69	0.39	7
BeG90N05G09	No match	1.00	1.39	0.71	0.48	0.75	7
BeG90N05H11	Q7PWK7 ENSANGP00000021424 (Fragment) GO:0006418 GO	1.00	0.64	0.48	0.58	0.80	7
BeG90N07A05	Q00808 Vegetatible incompatibility protein HET-E-1	1.00	0.96	0.84	0.65	0.47	7
BeG90N07B07	Q7Q192 AgCP8591 (Fragment) GO:0004179 GO:0006508	1.00	0.65	0.48	0.43	0.38	7
BeG90N07C04	No match	1.00	0.79	0.50	0.65	1.18	7
BeG90N07G03	LD34409p [Drosophila melanogaster]	1.00	0.71	1.06	0.75	0.55	7
BeG90N08B05	Q9P602 ATP synthase oligomycin sensitivity conferr	1.00	0.67	0.62	0.54	0.36	7
BeG90N08C07	N/A	1.00	1.00	0.36	0.37	0.91	7
BeG90N09D10	P07056 Ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfu	1.00	0.63	0.47	0.60	0.71	7
BeG90N09F06	Q7RVY8 Hypothetical protein GO:0005622 GO:0003735	1.00	0.59	0.47	0.48	0.59	7
BeG90N10A10	P32495 High mobility group-like nuclear protein 2	1.00	0.54	0.47	0.53	1.61	7
BeG90N10D06	Q8C644 Phenylalanine-tRNA synthetase-like GO:00057	1.00	0.76	0.55	0.49	0.43	7
BeG90N10E12	Q7SEL5 Hypothetical protein GO:0008152 GO:0016779	1.00	0.79	0.55	0.36	0.30	7
BeG90N10F08	No hits found	1.00	0.55	0.44	0.56	1.26	7
BeG90N10H02	No match	1.00	0.68	0.54	0.57	0.31	7
BeG90N13A04	hypothetical protein [Thermobifida fusca]	1.00	0.74	0.61	0.67	0.55	7
BeG90N16H01	N/A	1.00	0.94	0.72	0.87	0.49	7
BeG90N17A07	Q7S477 Hypothetical protein GO:0006118 GO:0006096	1.00	0.72	0.56	0.46	0.34	7
BeG90N17C01	N/A	1.00	1.09	0.37	0.49	0.57	7
BeG90N18B04	Q7ZY16 Hypothetical protein GO:0004018 GO:0009152	1.00	0.57	0.59	0.40	0.30	7
BeG90N18D03	Similar to cytochrome c-1 [Xenopus laevis]	1.00	0.68	0.56	0.52	0.67	7
BeG90N19G02	No match	1.00	0.60	0.70	0.71	0.39	7
BeG90N19G06	putative succinate dehydrogenase membrane anchor s	1.00	0.64	0.57	0.43	0.76	7
BeG90N20G03	No match	1.00	0.70	0.63	0.49	0.75	7
BeG90N21B12	Enoyl-CoA hydratase (31.2 kD) [Caenorhabditis eleg	1.00	1.06	0.42	0.38	0.45	7
BeG90N21D04	mitochondrial ribosome small subunit component; Rs	1.00	0.69	0.83	0.90	0.56	7
BeG90N22H03	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	0.82	0.59	0.46	0.39	7
BeG90N22H07	P05760 40S ribosomal protein S21 GO:0005622 GO:000	1.00	0.69	0.50	0.35	0.67	7
BeNSVP01F11	Q9ERY9 C14orf1-like protein GO:0005554 GO:0016021	1.00	0.97	0.66	0.52	0.48	7
BeNSVP02C09	amidophosphoribosyltransferase [Shewanella oneiden	1.00	0.68	0.50	0.53	0.64	7
BeNSVP03C07	Q96UB2 (AL451018) conserved hypothetical protein G	1.00	1.13	0.61	0.35	0.29	7
BeNSVP04A06	No match	1.00	0.87	0.26	1.00	0.43	7
BeNSVP04B03	N/A	1.00	1.00	0.47	1.00	1.06	7
BeNSVP04E09	No hits found	1.00	0.88	0.63	0.48	0.53	7
BeNSVP04F11	No match	1.00	1.01	0.29	0.62	0.35	7
BeNSVP05E03	No match	1.00	0.83	0.41	0.39	0.63	7
BeNSVP07G02	N/A	1.00	0.79	0.48	0.44	0.80	7
BeNSVP09B02	No match	1.00	1.13	0.55	0.76	0.72	7
BeNSVP09E01	No hits found	1.00	1.37	0.44	0.50	0.63	7
BeNSVP10C04	N/A	1.00	0.37	0.48	0.71	0.36	7
BeNSVP12B12	N/A	1.00	0.65	0.46	0.46	0.90	7
BeNSVP12G02	phosphoenolpyruvate carboxykinase [Emericella nidu	1.00	0.84	0.44	0.48	0.49	7
BeZSPN01C05	No match	1.00	0.70	0.42	0.54	1.10	7
BeZSPN01C07	Q7SBQ2 Hypothetical protein GO:0005975 GO:0004553	1.00	0.81	0.45	0.42	0.85	7
BeZSPN01D07	N/A	1.00	0.83	0.46	0.58	1.09	7
BeZSPN01D08	No match	1.00	0.67	0.38	0.50	0.96	7
BeZSPN01E05	N/A	1.00	0.77	0.54	0.57	1.08	7
BeZSPN01G05	hypothetical protein [Neurospora crassa]	1.00	0.77	0.49	0.63	0.95	7
BeZSPN02B11	No match	1.00	0.84	0.47	0.45	0.87	7
BeZSPN03E05	No match	1.00	0.91	0.32	0.41	1.31	7
BeZSPN05E04	N/A	1.00	0.76	0.47	0.42	0.73	7
BeZSPN06H12	No match	1.00	0.74	0.55	0.54	0.59	7
BeZSPN09D02	60s ribosomal protein I2 [Schizosaccharomyces pomb	1.00	0.84	0.51	0.43	0.57	7
BeZSPN09H02	N/A	1.00	0.70	0.56	0.46	0.71	7
BeZSPN10F05	N/A	1.00	0.81	0.47	0.48	0.90	7
BeZSPN11B07	Q8XRE0 GALA protein 1 GO:0046821	1.00	0.87	0.53	0.61	1.06	7
BeZSPN11B12	N/A	1.00	0.83	0.49	0.55	0.58	7
BeZSPN11F03	Q7RX42 Hypothetical protein GO:0003754	1.00	1.00	0.58	0.58	0.35	7
BeZSPN13B02	Q9HF04 Vacuolar serine protease GO:0004289 GO:0016	1.00	1.44	0.56	0.58	0.43	7
BeZSPN13B08	RNA elicase [Saccharomyces cerevisiae]	1.00	0.87	0.40	0.43	0.83	7
BeZSPN14F11	Q8AVD5 Similar to Benzodiazepin receptor GO:000487	1.00	0.75	0.56	0.56	1.07	7
BeZSPN15B01	hypothetical protein AN1493.2 [Aspergillus nidulan	1.00	0.83	0.50	0.68	1.07	7

Anexo 8: Genes fortemente reprimidos durante a esporulação de *B. emersonii*

ID	Anotação	Razão de expressão					Grupo
		Tempo (min)					
		0	60	120	150	ZSP	
BeE30N04H06	Q9Z2K9 Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic	1.00	0.40	0.23	0.36	0.16	8
BeE30N10D02	Q06593 Similar to S. CEREVISIAE hypothetical prote	1.00	0.96	0.17	0.14	0.13	8
BeE30N17A03	P40897 Hypothetical 91.6 kDa protein in HXT8-CRT1	1.00	0.99	0.08	0.12	0.09	8
BeE30N18G10	N/A	1.00	0.35	0.25	0.15	0.36	8
BeE30N18H03	N/A	1.00	0.23	0.10	0.07	0.16	8
BeE30N20B08	N/A	1.00	0.16	0.09	0.08	0.08	8
BeE30N20D06	No match	1.00	0.15	0.11	0.08	0.08	8
BeE60C35H09	Q8BH95 Enoyl coenzyme A hydratase GO:0008152 GO:00	1.00	0.65	0.34	0.28	0.12	8
BeE60H26A05	Q872A4 Related to phosphatidylserine decarboxylase	1.00	0.26	0.19	0.18	0.05	8
BeE60H28B12	Q96VZ6 Acetolactate synthase Ilv2 GO:0003984 GO:00	1.00	0.19	0.26	0.17	0.30	8
BeG120N12G04	Q8TFN0 Nucleoside diphosphate kinase GO:0016740 GO	1.00	0.30	0.13	0.09	0.04	8
BeG120N17E03	P32324 Elongation factor 2 GO:0008547 GO:0006414 G	1.00	0.20	0.14	0.13	0.27	8
BeG120N22B10	No match	1.00	0.23	0.13	0.10	0.31	8
BeG120N22G10	Q7S5F0 Hypothetical protein GO:0006810 GO:0005215	1.00	0.28	0.11	0.09	0.13	8
BeG30N02C03	No hits found	1.00	0.28	0.31	0.22	0.17	8
BeG30N02D12	Q08601 Chromosome XV reading frame ORF YOR197W GO:	1.00	0.30	0.27	0.23	0.18	8
BeG30N11F01	N/A	1.00	0.26	0.12	0.11	0.19	8
BeG30N13A03	N/A	1.00	0.54	0.07	0.05	0.16	8
BeG30N17E08	conserved hypothetical protein [Schizosaccharomyce	1.00	0.39	0.12	0.16	0.29	8
BeG60N19C12	antigenic cell wall protein MP2 [Aspergillus fumig	1.00	0.29	0.13	0.14	0.08	8
BeG90N01D10	Q8WZW8 Probable YHM1 GO:0006810 GO:0005488 GO:0016	1.00	0.36	0.30	0.22	0.17	8
BeG90N03E03	P42894 Enolase GO:0004634 GO:0006096 GO:0000015 GO	1.00	0.38	0.26	0.15	0.12	8
BeG90N05A04	Q96TJ5 60S acidic ribosomal protein P0 GO:0005622	1.00	0.43	0.26	0.24	0.19	8
BeG90N05D09	N/A	1.00	1.00	0.24	0.25	0.13	8
BeG90N07C02	Q84KQ4 Elongation factor-1alpha (Fragment) GO:0008	1.00	0.26	0.07	0.05	0.16	8
BeG90N11A02	Q90WD9 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GO	1.00	0.30	0.47	0.34	0.03	8
BeG90N13C04	phosphoglucose isomerase [Aspergillus niger]	1.00	0.27	0.11	0.10	0.43	8
BeG90N16A06-1	N/A	1.00	0.16	0.10	0.13	0.45	8
BeG90N16C06	P42833 Hexose transporter HXT14 GO:0006810 GO:0016	1.00	0.41	0.13	0.13	0.18	8
BeG90N18E08	Q8X097 Probable ATP-citrate synthase subunit 1 GO:	1.00	0.71	0.16	0.17	0.18	8
BeG90N19F12	P29691 Elongation factor 2 GO:0008547 GO:0006414 G	1.00	0.17	0.15	0.12	0.32	8
BeG90N21E08	aspartyl-trna synthetase, cytoplasmic [Schizosacch	1.00	0.26	0.15	0.16	0.21	8
BeNSVP03D05	Q7S9X7 Hypothetical protein GO:0009058 GO:0008483	1.00	0.44	0.35	0.21	0.06	8
BeNSVP07F10	No hits found	1.00	0.32	0.18	0.13	0.11	8
BeNSVP07H09	Q84KQ4 Elongation factor-1alpha (Fragment) GO:0008	1.00	0.54	0.11	0.18	0.32	8
BeNSVP12C06	N/A	1.00	0.19	0.08	0.09	0.18	8

## Súmula curricular

### Dados Pessoais

**Nome:** André Luiz Gomes Vieira

**Local e data de nascimento:** Ipatinga-MG, 27 de julho de 1979.

### Educação:

#### Ensino médio:

Instituto Educacional Mayrink Vieira – Ipatinga-MG – 1996-1998

#### Graduação:

Universidade Federal de Ouro Preto – Ouro Preto – MG

Bacharelado em Ciências Biológicas – 1999-2003.

#### Mestrado:

Universidade Federal de Ouro Preto – Ouro Preto – MG

Mestrado em Ciências Biológicas – Área de concentração: Biologia Molecular – 2004-2005.

### Ocupação:

Bolsista CNPq – 2005-2009.

### Publicações:

- 1- Vieira, A. L. G., Moura, M. B., Babá, E. H., Chávez-Olórtegui, C., Kalapothakis, E., Castro, I. M. 2004. Molecular cloning of toxins expressed by the venom gland of *Lasiadora sp.* *Toxicon* **44**:949-952.
- 2- Vieira, A. L. G., Linares, E., Augusto, O., Gomes, S. L. Developmental expression of cGMP-phosphodiesterase and guanylyl cyclase genes in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* and evidences of a  $Ca^{2+}$ -•NO-cGMP signaling pathway. (Manuscrito submetido para *Fungal Genetics & Biology*)
- 3- Vieira, A. L.G., Gomes, S. L. Global Gene Expression Analysis During Sporulation of the Chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. (Manuscrito em preparação)

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)