

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

César Moisés Camilo

Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo
aquático *Blastocladiella emersonii*

São Paulo

Data do Depósito na SPG
13/11/2009

César Moisés Camilo

**Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo
aquático *Blastocladiella emersonii***

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

Orientadora: Prof^a Dr^a Suely Lopes Gomes

São Paulo

2009

César Moisés Camilo

Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo aquático *Blastocladiella emersonii*

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: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

PRÓLOGO

Por absoluto acaso, mas por ironia dele, neste ano de 2009 comemoramos os 200 anos do nascimento de Charles Robert Darwin e os 150 anos da publicação de sua mais bela obra “A Origem das Espécies”. Não quero sugerir nenhum significado cabalístico para esta data, mas fica impossível não reverenciar este que é um dos maiores pensadores que já existiram. Darwin, por meio da teoria da seleção natural, conseguiu dar uma explicação elegante e absolutamente bela a uma das questões mais intrigantes da humanidade: “De onde viemos?”. Sua teoria mudou para sempre nossa visão em relação ao mundo e nosso lugar nele, além de lançar as bases da biologia moderna, juntamente com as descobertas posteriores sobre a transmissão hereditária das características dos seres, por meio dos genes. A genialidade de Darwin não está somente em sua descoberta sobre a complexidade e diversidade da vida, mas na simplicidade de sua explicação e nas evidências gritantes que ele encontrou em sua viagem a bordo do HMS Beagle. Tanto foi genial sua teoria, que conseguiu se perpetuar em uma época em que os mitos religiosos de criação divina tinham extrema influência, até mesmo no meio científico. Darwin iluminou o mundo provando que não somos seres perfeitos criados por entidades sobrenaturais. Na verdade, somos seres vencedores que graças à adaptação de nossos antepassados mais distantes, gozamos de um momento único e fantasticamente supremo – a vida.

"Eu estou quase convencido de que (completamente contrário à opinião de quando comecei) as espécies não são (e isso é tal como uma confissão de um assassinato) imutáveis."

Charles Darwin, 1844

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Suely Lopes Gomes, por confiar no meu trabalho e me proporcionar todas as condições para desenvolver minha pesquisa. Sua seriedade e zelo com que trata o patrimônio público é algo que deveria ser copiado e que levarei comigo para sempre.

Ao Prof. Dr. Hamza El-Dorry e todos os amigos de seu antigo laboratório, Wilton, Zilda, Marluce, Erik, Augusto, Eric, Ari e Inês.

Ao Prof. Dr. Felipe Chambergo pela amizade, parceria e discussões durante todo meu doutorado e iniciação científica.

À CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro.

Aos amigos do laboratório André Vieira, Rogério Lourenço, Gabriela Mol, Raphaela Georg, Karina Ribichich, Michelle Suzin, Christian Kohler, Anne Krause, Ricardo Vêncio, Tie Koide, Luci Navarro, Sandra Mara e Ivone Pereira, pela amizade, trabalho em equipe e ajudas imprescindíveis para a realização desse trabalho.

À Prof^a. Dra. Regina Baldini e seus alunos Ana Laura, Eliezer, Diogo, Gianluca, Ana Paula, Patrícia e Gilberto, por tornarem a rotina no laboratório sempre agradável.

À Denise Yamamoto, pelo apoio técnico durante os experimentos de microarranjo e pelas divertidas conversas.

Aos colegas da Secretaria de Pós-Graduação pela ajuda e agilidade.

Ao Prof. Dr. Etelvino Bechara, ao Prof. Dr. Nilson Assunção e suas alunas de iniciação científica Adriana, Cecilia e Ana, pela realização das análises metabolômicas por Eletroforese Capilar.

Aos meus amigos da Rep. Pasquote e da Rep. Pablito: Otávio, Jairo, Pedro, Diego e Gordz, por tudo aquilo que não diz respeito a trabalho na vida acadêmica.

Aos meus amigões do peito Jão, Rita, Rafa, Rê, Careca, Liger, Regina, Northon, Brunão, Lucas, Gui, Heid, Flaviona, Flavinha, Tabata e Talissa, pela valiosa e sincera amizade de sempre.

À Fabiana, que me fez superar todos os momentos difíceis deste trabalho e por ser uma pessoa tão maravilhosa com quem tenho o prazer de compartilhar minha vida. E é claro a toda sua família, Mariângela, Sérgio, Marina e Renata, que sempre me apoiaram em tudo.

Aos meus irmãos Thales e Luciana, companheiros de todas as horas.

Aos meus pais, Ciro e Beth, meus agradecimentos vão muito além desta tese. Toda uma vida de exemplos, dedicação e ensinamentos é prova de verdadeiro amor incondicional que me faz um imenso nó na garganta. Além de matarem um leão por dia para que eu e meus irmãos pudéssemos estudar, fizeram de nossa casa um ambiente de inúmeros estímulos à cultura, ao esporte e à ciência, sem os quais dificilmente estaria defendendo uma tese de doutorado.

É com imensa gratidão que dedico esta tese aos meus pais.

RESUMO

Camilo, C.M. Regulação da expressão gênica por oxigênio no fungo aquático *Blastocladiella emersonii*. 2009. 140 p. 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 do fungo aquático *Blastocladiella emersonii* submetido ao estresse de carência de oxigênio (hipóxia), utilizando a técnica de microarranjos de cDNA em lâminas contendo 3773 genes distintos. Nos experimentos de hipóxia gradual (diminuição gradual da concentração de oxigênio dissolvido, seguido de reoxigenação) e hipóxia direta (diminuição direta da concentração de oxigênio dissolvido, seguido de reoxigenação) observamos que 650 genes foram diferencialmente expressos em pelo menos uma das condições de estresse e que 534 deles mostraram-se afetados (direta ou indiretamente) pela disponibilidade de oxigênio, uma vez que apresentaram recuperação (ou tendência à recuperação) da sua expressão aos níveis normais, quando as células foram reoxigenadas. Além de modular a expressão de diversos genes sem função conhecida, *B. emersonii* responde à hipóxia reajustando a expressão de genes responsáveis pela produção e consumo de energia. Pelo menos transcricionalmente, este fungo favorece o metabolismo anaeróbico, através da indução de genes que codificam enzimas da via glicolítica e lactato desidrogenase, ao passo que no ciclo do ácido cítrico, a maioria dos genes encontram-se reprimidos ou não sofrem alteração na expressão. Processos dispendiosos em energia como síntese protéica, metabolismo de aminoácidos, enovelamento de proteínas e transporte por membrana apresentaram perfis predominantemente de repressão gênica quando em carência de oxigênio. Ainda utilizando a técnica de microarranjos, mostramos semelhanças entre os perfis transcricionais nos experimentos hipóxia e de carência de Fe^{2+} (tratamento com quelante de Fe^{2+} 2,2'-dipyridyl) sugerem que estes estresses estão de alguma forma relacionados, fornecendo bons indícios de que o íon Fe^{2+} possa ter um papel importante no mecanismo sensor de oxigênio e/ou de resposta a hipóxia em *B. emersonii*. Além disso, o tratamento prévio de células submetidas à hipóxia com o antibiótico geldanamicina, um conhecido inibidor da proteína de choque térmico HSP90, levou à diminuição da indução de certos genes de hipóxia, indicando que este fungo pode possuir algum mecanismo semelhante ao do fator de transcrição de hipóxia HIF1- α de mamíferos, uma vez que este fator também é afetado por geldanamicina. Adicionalmente, desenvolvemos um protocolo para transformação de *B. emersonii* mediada por *Agrobacterium tumefaciens* que se mostrou promissor. A transferência do T-DNA contendo um gene de resistência a higromicina B, presente no vetor binário pBINPLUS-Hph, foi evidenciada pelo crescimento normal e esporulação das células transformadas, na presença do antibiótico e pela amplificação do gene de resistência no DNA genômico de células transformadas.

Palavras-chave: fungo aquático, microarranjos de cDNA, hipóxia, expressão gênica

ABSTRACT

Camilo, C.M. Regulation of gene expression by oxygen in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. 2009. 140 p. PhD Thesis - Graduate Program in Biochemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

In this work we analyzed global gene expression changes in the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii* submitted to oxygen deprivation (hypoxia), using cDNA microarrays containing 3,773 distinct genes. In gradual hypoxia (gradual decrease in dissolved oxygen concentration, followed by reoxygenation) and direct hypoxia (direct decrease of dissolved oxygen concentration, followed by reoxygenation) we observed 650 differentially expressed genes in at least one of the stress conditions tested, 534 of them being affected (directly or indirectly) by oxygen availability, since they showed recovery of normal expression levels or a tendency to recover, when cells were reoxygenated. Besides modulating many genes with no previously assigned function, *B. emersonii* responds to hypoxia by readjusting the expression levels of genes responsible for energy production and consumption. At least transcriptionally, this fungus seems to favour anaerobic metabolism through the induction of genes encoding glycolytic enzymes and lactate dehydrogenase, while in the TCA-cycle, most genes were repressed or unchanged. Energy-costly processes like protein synthesis, amino acid metabolism, protein folding and transport had their gene expression profiles predominantly repressed during oxygen deprivation. Microarray experiments also showed similarities between the transcriptional profile of genes in hypoxia and iron (II) deprivation (treatment with the iron (II) chelator 2,2'-dipyridyl), suggesting that these stresses are somehow related, giving good evidence that Fe^{2+} ion could have a role in the mechanism of oxygen sensing and/or response to hypoxia in *B. emersonii*. Furthermore, pretreatment of cells subjected to hypoxia with the antibiotic geldanamycin, a known inhibitor of the heat shock protein HSP90, caused a significant decrease in the induction of certain hypoxic genes, indicating that this fungus could have a mechanism similar to that of the mammalian hypoxia transcription factor HIF-1 α , which is also affected by geldanamycin. Additionally, we developed an *Agrobacterium tumefaciens*-mediated protocol for transformation of *B. emersonii* that has shown to be promising. The capacity to transfer the T-DNA containing a hygromycin B resistance gene, present in the pBINPLUS-Hph binary vector, was evidenced by the normal growth and sporulation of the transformed cells in the presence of antibiotic and by amplification of the resistance gene from the genomic DNA of transformed cells.

Keywords: aquatic fungus, cDNA microarray, hypoxia, gene expression

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE TABELAS SUPLEMENTARES	III
ABREVIATURAS E SIGLAS	IV
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 ASPECTOS EVOLUTIVOS NAS VIAS DE PRODUÇÃO DE ATP	6
2.2 RESPOSTAS A CARÊNCIA DE OXIGÊNIO.....	7
2.3 O MODELO DE ESTUDO: <i>BLASTOCLADIELLA EMERSONII</i>	12
2.4 ESTUDOS METABOLÔMICOS UTILIZANDO A TÉCNICA DE ELETROFORESE CAPILAR	17
2.5 TRANSFORMAÇÃO DE EUCARIOTOS MEDIADA POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	19
3 OBJETIVOS.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 CULTIVO DE <i>BLASTOCLADIELLA EMERSONII</i>	23
4.2 MEIOS DE CULTURA.....	23
4.3 LINHAGENS BACTERIANAS	24
4.4 TÉCNICAS GERAIS DE BIOLOGIA MOLECULAR	24
4.5 CULTIVO DE <i>B. EMERSONII</i> EM BIORREATOR	24
4.6 EXPERIMENTOS DE HIPÓXIA GRADUAL (HG)	25
4.7 QUANTIFICAÇÃO DE GLICOSE E LACTATO EXTRACELULAR.....	26
4.8 EXPERIMENTOS DE HIPÓXIA DIRETA (HD).....	27
4.9 EXPERIMENTO DE CARÊNCIA DE FERRO.....	28
4.10 EXPERIMENTO DE HIPÓXIA COM GELDANAMICINA	29
4.11 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL DE <i>B. EMERSONII</i>	29
4.12 MICROARRANJOS DE CDNA	30
4.12.1 Síntese de cDNA e marcação com fluoróforo para hibridização dos microarranjos.....	30

4.12.2	<i>Hibridização e leitura da fluorescência das lâminas de microarranjos.....</i>	31
4.12.3	<i>Quantificação da fluorescência emitida nos microarranjos e extração dos dados</i>	33
4.12.4	<i>Normalização dos dados de Microarranjo.....</i>	34
4.12.5	<i>Determinação dos genes diferencialmente expressos.....</i>	34
4.12.6	<i>Agrupamento dos genes diferencialmente expressos segundo o perfil de expressão.....</i>	37
4.12.7	<i>Determinação das categorias do Consórcio Gene Ontology mais representadas entre os genes diferencialmente expressos</i>	38
4.12.8	<i>Depósito dos dados de microarranjo</i>	39
4.13	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR QUANTITATIVO	39
4.14	ANÁLISE DE METABÓLITOS POR ELETROFORESE CAPILAR.....	41
4.14.1	<i>Princípio do método.....</i>	41
4.14.2	<i>Análise de metabólitos catiônicos por CE-MS.....</i>	41
4.14.3	<i>Preparação dos extratos metabólicos</i>	42
4.14.4	<i>Quantificação de proteínas totais – Método Bradford.....</i>	43
4.15	TRANSFORMAÇÃO DE <i>B. EMERSONII</i> POR <i>AGROBACTERIUM TUMEFASCIENS</i>	43
4.15.1	<i>Construção do Vetor Binário pBINPLUS-Hph</i>	43
4.15.2	<i>Protocolo de transformação</i>	44
4.15.3	<i>Extração rápida de DNA genômico de zoósporos.....</i>	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1	CARÊNCIA DE OXIGÊNIO: HIPÓXIA GRADUAL E DIRETA.....	48
5.1.1	<i>Aspectos morfológicos.....</i>	48
5.1.2	<i>Captação de glicose.....</i>	49
5.1.3	<i>Genes diferencialmente expressos</i>	51
5.1.4	<i>Agrupamento dos genes diferencialmente expressos segundo os perfis de expressão</i>	52
5.1.5	<i>Determinação das categorias do Consórcio Gene Ontology (GO) mais representadas entre os genes diferencialmente expressos em hipóxia.....</i>	54
5.1.6	<i>Análise da expressão de genes ausentes nos microarranjos por qRT-PCR.....</i>	56
5.1.7	<i>Análise dos genes afetados pela concentração de oxigênio dissolvido.....</i>	58

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

