

Análise estrutural e funcional dos genes *KEX2* e *SNX4* de fungos

Structural and functional analysis of *KEX2* and *SNX4* genes from fungi

Adriane Feijó Evangelista, Emerson José Venancio

Resumo

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomicose (PCM), micose profunda e endêmica na América Latina. *P. brasiliensis* é um fungo dimórfico que pode ser encontrado na forma de micélio ou de levedura dependendo da temperatura. Em fungos, diversos genes envolvidos no dimorfismo têm sido identificados e estudos recentes sugerem que a organização genômica pode ser importante na regulação da expressão gênica e no processo dimórfico. Em *P. brasiliensis* recentemente foi descrito um fragmento genômico contendo os genes *KEX2* e *SNX4* que possivelmente estão envolvidos no processo dimórfico. O objetivo desse trabalho foi investigar o posicionamento relativo e a presença de motivos de regulação da expressão dos genes *KEX2* e *SNX4* em fungos. Foi observado que em *Aspergillus nidulans* (FGSC A4), *Neurospora crassa* (OR74A), *Gibberella zeae* (PH-1) e *Magnaporthe grisea* (70-15) os genes *KEX2* e *SNX4* estão localizados no mesmo cromossomo e apresentam uma estrutura similar aos genes *KEX2* e *SNX4* de *P. brasiliensis*. Na região 5' não traduzida (5'UTR) do gene *KEX2* de todas as espécies analisadas foi observado os motivos para os fatores de transcrição Gal4 e Gcn4. O mesmo motivo foi encontrado na região 5'UTR do gene *SNX4* da maioria das espécies estudadas, com exceção de *M. grisea*. Os resultados obtidos mostram que os genes *KEX2* e *SNX4* estão na mesma ordem em espécies diferentes e que compartilham motivos para fatores de transcrição, sugerindo a presença de uma relação funcional entre eles.

Palavras-chave: *Paracoccidioides brasiliensis*, *KEX2*, *SNX4*, Gal4, Gcn4.

Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.
E-mail emersonj@uel.br

Abstract

Paracoccidioides brasiliensis is the etiologic agent of paracoccidioidomycosis (PCM), a deep mycosis endemic in Latin America. *P. brasiliensis* is a dimorphic fungus that can be found in the yeast or micelium forms depending on the temperature. In fungi, several genes involved in the dimorphic process have been identified and recent studies suggest that the genomic organization can be important in the regulation of the gene expression and dimorphism. In *P. brasiliensis* recently has been described one genomic fragment with *KEX2* and *SNX4* genes, probably involved in dimorphic process. The objective of this work was to investigate the relative positioning and the presence of motifs related to expression control of *KEX2* and *SNX4* genes in fungi. It was observed that in *Aspergillus nidulans* (FGSC A4), *Neurospora crassa* (OR74A), *Gibberella zeae* (PH-1) and *Magnaporthe grisea* (70-15) the *KEX2* and *SNX4* genes are located in the same chromosome and have a similar structure to *KEX2* and *SNX4* genes of *P. brasiliensis*. In 5' untranslated region (5'UTR) of *KEX2* gene of all analysed species was observed motifs to Gal4 and Gcn4 transcription factors. The same motif was found in the region 5'UTR of *SNX4* gene in all studied species, with exception of *M. grisea*. The results show that the *KEX2* and *SNX4* genes are in the same chromosomal order in different species suggesting the presence of a functional relation between them.

Key words: *Paracoccidioides brasiliensis*, *KEX2*, *SNX4*, Gal4, Gcn4.

INTRODUÇÃO

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* é o agente etiológico da paracoccidioidomycose (PCM), micose sistêmica que acomete o homem e, possivelmente, animais. Na natureza o fungo *P. brasiliensis* provavelmente encontra-se nas formas de micélio (M) ou de levedura (Y) dependendo da temperatura ambiente. A alternância entre as formas de micélio e levedura envolve um complexo processo fisiológico chamado de dimorfismo. O processo dimórfico em fungos é um evento biológico complexo que tem sido associado à ocorrência de infecção no homem, em animais ou mesmo em plantas^(1, 2). Em *P. brasiliensis* diversos estudos sugerem que a transição de micélio para levedura é um processo essencial

para o estabelecimento do fungo no hospedeiro. Recentemente, o estudo do processo dimórfico, por técnicas moleculares, tem permitido a identificação de genes de *P. brasiliensis* potencialmente envolvidos na transição micélio-levedura. Em especial, foram identificados genes relacionados com alterações na parede celular e com metabolismo energético ⁽³⁾. Em outros fungos dimórficos, nos quais os processos de transformação são conhecidos em maiores detalhes, foram identificados diversos genes relacionados com o dimorfismo, entre eles os genes *CPH1* e *EFG1* de *C. albicans* ^(4, 5) e *STE12* de *Cryptococcus neoformans* ⁽⁶⁾. O estudo de mecanismos biológicos, como o dimorfismo, é complexo devido ao grande número de fatores que podem influenciar nas análises feitas a partir de um isolado ⁽⁷⁾. Dessa forma, a evidência de elementos funcionais, estruturais e regulatórios semelhantes em espécies diferentes indicam uma força de conservação que deve possuir um importante papel biológico ⁽⁸⁾. Por isso, estudos de genômica comparativa podem resultar na identificação de regiões genômicas contendo genes na mesma ordem em espécies diferentes, sugerindo uma relação funcional entre os genes e que pode ser usada para se fazer inferências sobre a relação filogenética entre diferentes espécies ⁽⁹⁾. No presente trabalho foi feita a análise comparativa da região genômica contendo os genes *KEX2* e *SNX4* de *P. brasiliensis*, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*, *Gibberella zeae* e *Magnaporthe grisea*, para a identificação de padrões conservados entre elas e que podem contribuir para o entendimento do dimorfismo de *P. brasiliensis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Fragmento MY-2

O fragmento genômico (G) do fungo *P. brasiliensis* foi identificado e caracterizado por VENANCIO, em 2002 ⁽¹⁰⁾. O fragmento G tem 7384 bp e apresenta duas fases de leituras abertas, uma completa que corresponde ao gene *KEX2* de *P. brasiliensis* ⁽¹¹⁾ e outra parcial com alta identidade com o gene *snx4* de *Schizosaccharomyces pombe*.

Análises de Sequências Nucleotídicas

Para a identificação de seqüências com identidade ou similaridade com os genes *KEX2* e *SNX4* presentes no fragmento G foram utilizados os programas BLASTN – *Basic Local Alignment Search Tool-nucleotide* e BLASTX – *Basic Local Alignment Search Tool-Protein Database* ⁽¹²⁾ disponível no sítio <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>.

Os critérios para a escolha das seqüências para análises posteriores foram um *E value* igual ou menor que 10^{-4} e a presença dos genes *KEX2* e *SNX4* na mesma região cromossômica.

As seqüências selecionadas foram submetidas ao programa ORFfinder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) para a definição da fase de leitura aberta e das regiões 5' não traduzidas (5'UTR) e 3'UTR.

No segmento 5'UTR foi investigada a presença da região promotora, dos elementos TATA-like e de motivos para fatores de transcrição.

A região promotora foi deduzida utilizando o NNPP versão 2.2 – *Neural Network Promoter Prediction Program* (13, http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html).

Os elementos TATA-like foram mapeados pelo programa Hctata – *Hamming-Clustering TATA-box* (14, http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwHC_tata_ex.html).

Os programas MatInspector ^(15,16) <http://www.genomatix.de/products/MatInspector/index.html> e SignalScan ⁽¹⁷⁾ <http://tbr.cit.nib.gov/molbio/signal> foram usados para identificar motivos putativos da transcrição.

Análises de Seqüências de Aminoácidos

Para detectar a presença de seqüências sinais para a secreção e regiões transmembrana putativas foram utilizados, respectivamente, os programas SignalP ⁽¹⁸⁾, <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/> e SOSUI ⁽¹⁹⁾ <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>.

A análise de hidrofobicidade da seqüência deduzida de aminoácidos foi feita usando o programa ProtScale ⁽²⁰⁾ <http://ca.expasy.org/cgi-bin/protscale.pl>.

Para a confirmação dos dados obtidos para as seqüências dos aminoácidos, bem como seus domínios, foi utilizado o pacote SMART ⁽²¹⁾ <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção das Espécies para Análise

Foram identificadas 17 espécies de fungos com similaridade significativa com pelo menos um dos genes *KEX2* e *SNX4*. Destas espécies, 11 tinham seqüências com similaridade significativa para os dois genes, sendo que 5 espécies apresentaram os dois genes na mesma região cromossômica (*Aspergillus nidulans* FGSC A4, *Neurospora crassa* OR74A, *Gibberella zeae* PH-1, *Magnaporthe grisea* 70-15 e *Schizosacharomyces pombe*). A seqüência de *S. pombe* não foi utilizada para análises posteriores por não ter sido possível o seu alinhamento, devido as seqüências disponíveis de *S. pombe* estarem incompletas ou sem a localização cromossômica.

Padrões conservados na seqüência nucleotídica.

Na Figura 1 é mostrada a localização genômica dos prováveis genes *KEX2* e *SNX4* identificados em *P. brasiliensis*, *A. nidulans*, *G. zeae*, *N. crassa* e *M. grisea*. É importante ressaltar que a distância entre os dois genes nas espécies estudadas varia de apenas 334 pb em *G. zeae* até 318345 pb em *M. Grisea* (Tabela 01). O significado da diferença entre a posição dos genes *KEX2* e *SNX4* é de difícil análise em um estudo de genômica comparativa, já que a homologia é uma noção qualitativa de ancestrais comuns. De um modo geral, a presença de uma mesma estrutura genômica em espécies diferentes sugere a existência de uma relação filogenética entre as espécies e pode ajudar na identificação de elementos que participam na regulação transcricional ou pós-transcricional dos genes, da estrutura da cromatina e mesmo do cromossomo. Além do mais, a proximidade entre os genes *KEX2* e *SNX4* em *A. nidulans*, *G. zeae*, *N. crassa* e *P. brasiliensis* sugere a presença de mecanismos de regulação em comum, o que pode ter um importante papel em fungos devido ao genoma compactado ⁽²²⁾.

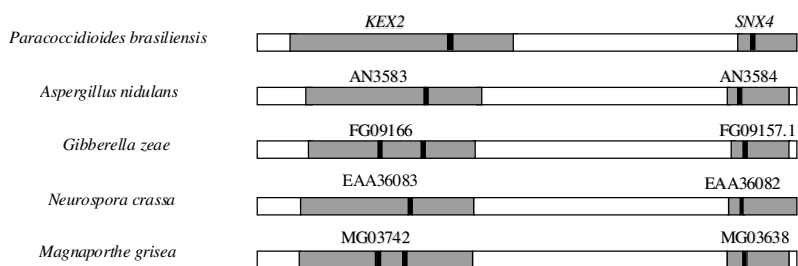


Figura 1. Região genômica contendo os genes *KEX2* e *SNX4* dos fungos *Paracoccidioides brasiliensis*, *Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa* e *Magnaporthe grisea*. Os números de acesso para os genes *KEX2* e *SNX4* são mostrados e as regiões de introns estão indicadas em preto.

Tabela 1. Localização genômica dos prováveis genes *KEX2* e *SNX4* de *Aspergillus nidulans*, *Gibberella zeae*, *Neurospora crassa* e *Magnaporthe grisea* e os códigos de acesso do NCBI para as respectivas proteínas hipotéticas.

Organismo	Localização dos prováveis genes <i>KEX2</i> e <i>SNX4</i>	Código de Acesso NCBI	Localização Cromossômica
<i>A. nidulans</i> FGSC A4	<i>KEX2</i> : 126268 a 128777 <i>SNX4</i> : 129291 a 130836	<i>KEX2</i> : EAA59791.1 <i>SNX4</i> : EAA59792.1	cromossomo II contig: ANcontig1.61,
<i>G. zeae</i> PH-1	<i>KEX2</i> : 316733 a 319358 <i>SNX4</i> : 319692 a 321126	<i>KEX2</i> : EAA78206.1 <i>SNX4</i> : EAA78207.1	cromossomo 4 contig: FGcontig1.370
<i>N. crassa</i> OR74A	<i>KEX2</i> : 102585 a 105299 <i>SNX4</i> : 100189 a 101804	<i>KEX2</i> : EAA36083.1 <i>SNX4</i> : EAA36082.1	cromossomo I contig: cont3.167
<i>M. grisea</i> 70-15	<i>KEX2</i> : 6654546 a 6657177 <i>SNX4</i> : 6334538 a 63362201	<i>KEX2</i> : EAA52147.1 <i>SNX4</i> : EAA52043.1	cromossomo III contig: cont2.726

Padrões conservados na seqüência aminoácidos deduzida dos genes *KEX2*.

Como pode ser observado na figura 2, os domínios da proteína Kex2 apresentaram-se, em geral, conservados em *P. brasiliensis*, *A. nidulans*, *G. zeae*, *N. crassa* e *M. grisea*. Os padrões encontrados são muito similares aos obtidos anteriormente para *Aspergillus niger*, *Emericella nidulans*, *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* ⁽¹¹⁾. A região de peptídeo sinal localiza-se entre as posições 1 a 20 em todas as espécies, provavelmente é clivada na seqüência RASV (localizada na região de término do peptídeo sinal) entre os aminoácidos A e S. Entre a seqüência RASV e o sítio de clivagem (KRAP) define-se a região de propeptídeo. No domínio Peptidade_S8 estão presentes resíduos de serina e histidina em todos os organismos e muito importantes para a função catalítica desse domínio. No domínio P encontra-se a seqüência RGD, uma seqüência para o reconhecimento de integrinas e que foi observada em *A. nidulans*, *G. Zeae* e *N. crassa*, mas não em *M. grisea*. Todos os organismos possuem

domínio transmembrana e seqüências de permanência no Complexo de Golgi (YEFMI), o que indica uma localização subcelular comum entre os organismos estudados.

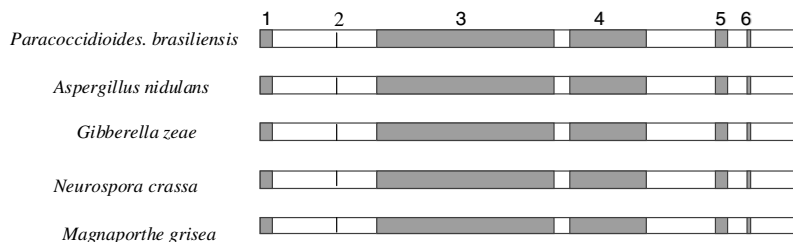


Figura 2. Padrões Funcionais da proteína Kex2. Os números correspondem a 1 – Peptídeo Sinal; 2 – Sítio de Clivagem (região KRAP); 3 – Domínio Peptidase_S8 (domínio catalítico); 4 – Domínio P; 5 – Região Transmembrana e 6 – Região YEFMI (provável região de retenção da proteína no Golgi).

Padrões conservados na seqüência aminoácidos deduzida dos genes *SNX4*

O domínio PX da proteína Snx4 é muito conservado em todas as espécies analisadas, tendo aproximadamente 120 aa (Figura 3). Dados prévios obtidos em banco de dados mostram que as *snx4* em fungos podem ter de 1 a 2 *coiled coils* ⁽²³⁾. Nos fungos analisados, encontrou-se apenas 1 *coil*, com exceção do *N. crassa* em que não foi o motivo *coiled coils* não foi encontrado (Figura 3). Isso pode ser explicado como falhas nas ferramentas computacionais, visto que a seqüência compreendida entre o local previsto como região conservada das *coiled coils* possui uma identidade muito alta com a seqüência de *G. zeae* (dado não mostrado).

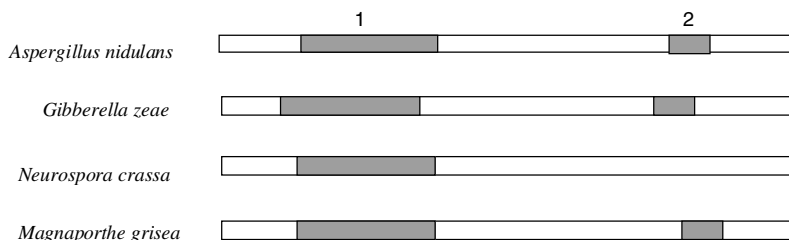


Figura 3. Padrões Funcionais da proteína Snx4. Os números correspondem a: 1 – Domínio PX; 2 – Coiled coils.

Elementos Regulatórios

Na Tabela 2 são mostrados os motivos para fatores de transcrição encontrados nas regiões 5'UTR das seqüências analisadas.

Tabela 2. Motivos para fatores de transcrição encontrados observados na região 5'UTR dos genes *KEX2* e *SNX4* de fungos: *Paracoccidioides brasiliensis* (PABR), *Aspergillus nidulans* (ASNI), *Gibberella zeae* (GIZE), *Neurospora crassa* (NECR) e *Magnaporthe grisea* (MAGR) nos dois programas utilizados: SignalScan (SigScan) e MatInspector (MatI) para a região *upstream* do mRNA de *KEX2* e *SNX4*. NE, nenhum motivo encontrado.

PROGRAMA	GENE	PABR	ASNI	GIZE	NECR	MAGR
SigScan	<i>KEX2</i>	GAL4	GAL4 GCN4	GAL4 GCN4	GAL4 GCN4	GAL4
	<i>SNX4</i>	GAL4 GCN4	GAL4 GCN4	GAL4 GCN4	GAL4 GCN4	NE
MatI	<i>KEX2</i>	HSF REB1 XHOI	HSF REB1	GAL4	NE	XHOI
	<i>SNX4</i>	HSF	GCN4 REB1	GCN4	HSF REB1	HSF

Em geral, na região 5' UTR do mRNA são encontrados elementos importantes para a regulação da transcrição. Neste trabalho, buscamos identificar os elementos semelhantes as

regiões promotoras, aos elementos *TATA box* e motivos para fatores putativos da transcrição.

A identificação de elementos regulatórios é um desafio ainda maior do que para genes. Tais elementos são tipicamente pequenos (6 – 15 bp), apresentam alguns graus de variação na seqüência e seguem poucas regras conhecidas. A maioria dos métodos computacionais é baseada na hipótese de que genes co-expressos dividem motivos regulatórios conservados no curso da evolução.

Seqüências *TATA box* geralmente estão localizadas de 25 a 30 pares de bases do sítio de iniciação do mRNA nos eucariontes superiores, embora a distância seja muito mais variável na levedura. No presente trabalho encontramos poucos elementos semelhantes a *TATA box* em comum e as posições apresentaram bastante variação. De maneira significativa, encontramos em *P. brasiliensis* elementos TATA-like apenas no gene *KEX2*. Já em *A. nidulans* foram encontrados os mesmos elementos (quatro – CTTATTCATA, CATATATCCC, CTAATAAATT e TGTATTTGAC) tanto para a *KEX2* como para a *SNX4* distribuídos por toda a região *upstream*.

Quanto à região promotora não encontramos nenhum padrão em comum entre as espécies.

Com relação aos motivos para fatores de transcrição foi observado a presença do motivo para o fator Gal4 na região 5'UTR dos genes *KEX2* e *SNX4* de todos os fungos analisados, com exceção da região 5'UTR do gene *SNX4* de *M. grisea*. O motivo para o fator de transcrição Gcn4 foi observado na região 5'UTR do gene *KEX2* de *A. nidulans*, *G. zeae* e *N. crassa* e na região 5'UTR do gene *SNX4* de *P. brasiliensis*, *A. nidulans*, *G. zeae* e *N. crassa*. Outros motivos para fatores de transcrição foram observados (Hsf e Reb1), porém não estavam presentes em ao menos três diferentes espécies fúngicas, o que poderia sugerir uma conservação do motivo.

Encontram-se descritas na literatura as funções dos fatores Gal4 (fator de transcrição em resposta a indução pela galactose)⁽²⁴⁾, Gcn4 (fator de dimerização de leucina)⁽²⁵⁾ e Hsf (fator indutivo para proteínas *heat shock*)⁽²⁶⁾. Todos estes fatores estão envolvidos na resposta ao estresse e podem estar envolvidos no processo de dimórfico^(2, 24, 25,26).

Finalmente, o gene para *SNX4* de *P. brasiliensis* ainda não foi totalmente sequenciado. Porém, as proteínas Snx4 apresentam uma alta conservação. Portanto, acredita-se que o padrão estrutural e funcional da Snx4 de *P. brasiliensis* seja bem próximo ao das proteínas aqui estudadas.

A análise realizada nesse trabalho foi feita para a detecção de padrões regulatórios de interesse em nível gênico e a correspondente predição de função a partir das estruturas das sequências de aminoácidos relativas aos genes de interesse.

Entre os elementos observados em nossas análises, encontramos possíveis fatores que remetem a uma adaptação ambiental. Dessa forma, é de grande relevância encontrar motivos para fatores transcricionais como o Hsf, indutivos de proteínas *heat shock*, previamente relacionadas com o dimorfismo⁽²⁾ tanto nas regiões 5' upstream dos genes da *KEX2* e *SNX4* de *P. brasiliensis* quanto na região de 5' upstream do gene similar da *KEX2* de *A. nidulans*, e da *SNX4* de *N. crassa* e *M. grisea*. Além disso, motivos para os fatores de transcrição Gcn4 e Gal4 foram encontrados por ambos softwares utilizados para a maioria das espécies analisadas. Finalmente, pode-se inferir que a existência desses fatores em mais de uma espécie, bem como a proximidade genômica entre os genes de *KEX2* e *SNX4* indica a possibilidade de uma regulação conjunta ou mesmo um possível mecanismo pós-transcricional em comum.

A predição da função através da estrutura de sequências de aminoácidos é de grande importância não apenas na situação

biológica de interesse, mas também como modelo para estudo em demais organismos. Neste trabalho foi observado um alto grau de conservação entre as seqüências analisadas. As seqüências de aminoácidos deduzidas dos genes *KEX2* mostram uma região transmembrana na região de peptídio sinal, além de uma região característica de proteínas retidas no golgi (seqüência YEFMI) em todas as espécies analisadas. Acredita-se que essa proteína fique retida na região do trans-Golgi (TGN) passando por ciclos de transporte entre compartimentos endocíticos onde exerça sua função de endoprotease sendo devolvida em seus compartimentos específicos por diversas proteínas ⁽²⁷⁾. A fusão de vesículas endocíticas com vesículas do TGN na via de transporte requer algumas proteínas, entre elas a Vps1, uma *sorting nexinas* ⁽²⁸⁾. O papel das *sorting nexinas* nesse processo é complexo e ainda não elucidado. O que identifica a família das *sorting nexinas* é a presença do domínio PX e das regiões *coiled coils*. Nas seqüências de aminoácidos dos genes *SNX4* foram encontrados os domínios PX e *coiled coils* em todas as espécies analisadas com exceção de *N. crassa* em que não foi detectada nenhuma região *coiled coil*. Acredita-se que a proteína Snx4 tenha um papel semelhante ao da proteína Vps1 na superfície das vesículas endocíticas que formarão futuros endossomos com a finalidade de regular o tráfego intracelular ⁽²⁹⁾, e apesar de identificarmos como uma proteína solúvel, elas tendem a formar complexos conhecidos como retrômeros, podendo ser lançadas em uma via de sinalização do PtdIns3P de reciclagem celular ⁽³⁰⁾.

Neste trabalho foi possível identificar que genes *KEX2* e *SNX4* de espécies diferentes estão na mesma ordem e possuem motivos para fatores de transcrição em comum sugerindo a presença de uma relação funcional entre eles.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Van Burik JA, Magee PT. Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu. Rev. Microbiol.*, 55:743-772, 2001.
2. San-blas G, Nino-vega G, Iturriaga T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. *Medical Mycology*, 40:225-242, 2002.
3. Andrade RV, Da Silva SP, Torres FAG, Poças-Fonseca MJ, Silva-Pereira I, Maranhão, AQ, Campos ÉG, Moraes LMP, Jesuino RSA, Pereira M, Soares CMA, Walter MEMT, Carvalho MJA, Almeida NF, Brígido MM, Felipe MSS. Overview and perspectives on the transcriptome of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Iberoam. Micol.*, 22: 203-212, 2005. 203
4. Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.*, 16:1982-1991, 1997.
5. Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*, 90:939-949, 1997.
6. Chang YC, Penoyer LA, Kwon-Chung KJ. The second STE12 homologue of *Cryptococcus neoformans* is MATa-specific and plays an important role in virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 98:3258-3263, 2001.
7. Dujon B, Sherman D, Fischer G, Durrens P, Casaregola S, Lafontaine I, De Montigny J, Marck C, Neuveglise C, Talla E, Goffard N, Frangeul L, Aigle M, Anthouard V, Babour A, Barbe V, Barnay S, Blanchin S, Beckerich JM, Beyne E, Bleykasten C, Boisrame A, Boyer J, Cattolico L, Confaniolieri F, De Daruvar A, Despons L, Fabre E, Fairhead C, Ferry-Dumazet H, Groppi A, Hantraye F, Hennequin C, Jauniaux N, Joyet P, Kachouri R, Kerrest A, Koszul R, Lemaire M, Lesur I, Ma L, Muller H, Nicaud JM, Nikolski M, Oztas S, Ozier-Kalogeropoulos O, Pellenz S, Potier S, Richard GF, Straub ML, Suleau A, Swennen D, Tekaiia F, Wesolowski-Louvel M, Westhof E, Wirth B, Zeniou-Meyer M, Zivanovic I, Bolotin-Fukuhara M,

Thierry A, Bouchier C, Caudron B, Scarpelli C, Gaillardin C, Weissenbach J, Wincker P, Souciet JL. Genome evolution in yeasts. *Nature*, 430:35-44, 2004.

8. Zelter A, Bencina M, Bowman BJ, Yarden O, Read ND. A comparative genomic analysis of the calcium signaling machinery in *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genetics and Biology*, 41: 827-841, 2004.

9. Odds FC, Brown AJP, Gow NAR. *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biology*, 5:230, 2004.

10. Venancio EJ. Expressão diferencial e caracterização de genes no dimorfismo do fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. Tese de doutorado, Brasília, 2002.

11. Venancio EJ, Daher BS, Andrade RV, Soares CMA, Silva-Pereira I, Felipe MSS. The *kex2* gene from the dimorphic and human pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Yeast*, 19:1221-1231, 2002.

12. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 5:403-410, 1990.

13. Reese MG. Application of a time-delay neural network to promoter annotation in the *Drosophila melanogaster* genome. *Comput. Chem.*, 26:51-56, 2001.

14. Milanesi L, Arrigo P, Muselli M. Recognition of Poly-A signals with Hamming Clustering. In: "Proceedings of the Third International Conference on Bioinformatics, Supercomputing and Complex Genome Analysis" (H.A. Lim, J.W. Fickett, C.R. Cantor and R.J. Robbins, eds.), World Scientific Publishing, Singapore, p . 461-466.

15. Quandt K, French K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acid Res.*, 23:4878-4884, 1995.

16. Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics*. 21: 2933-2942, 2005.

17. Prestridge DS. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements. *CABIOS*, 7:203-206, 1991.
18. Bendtsen JD, Nielsen H, Von Heijne G, Brunak S. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340:783-795, 2004.
19. Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics*. 14(4):378-379, 1998.
20. Kyte J, Doolittle RF. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, 157:105-132, 1982.
21. Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95:5857-5864, 1998.
22. Zheng XH, Lu F, Wang Z, Zhong F, Hoover J, Mural R. Using shared genomic synteny and shared protein functions to enhance the identification of orthologous gene pairs. *Bioinformatics*, 21: 703-710, 2005.
23. Teasdale RD, Loci D, Houghton F, Karlsson L, Gleeson PA. A large family of endosome-localized proteins related to sorting nexin 1. *Biochem. J.*, 358:7-16, 2001.
24. Griggs DW, Johnston M. Regulated expression of the GAL4 activator gene in yeast provides a sensitive genetic switch for glucose repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88:8597-8601, 1991.
25. Braus GH. Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol. Rev.*, 5:349-370, 1991.
26. Sorger PK. Heat shock factor and the heat shock response. *Cell*, 65(3):363-366, 1991.
27. Blanchette JM, Abazeed ME, Fuller RS. Cell-free Reconstitution of Transport from the *trans*-Golgi Network to the Late Endosome/Prevacuolar Compartment. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(47):48767-73, 2004.

28. Sipos G, Brickner JH, Brace EJ, Chen L, Rambourg R, Kepes R, Fuller RS. *Soi3p/Rav1p* Functions at the Early Endosome to Regulate Endocytic Trafficking to the Vacuole and Localization of *Trans*-Golgi Network Transmembrane Proteins. *Molecular Biology of the Cell*, 2004 Jul;15(7):3196-209.
29. Hettema EH, Lewis MJ, Black MW, Pelham HRB. Retromer and the sorting nexus Snx4/41/42 mediate distinct retrieval pathways from yeast endosomes. *EMBO J.*, 22(3):548-57, 2003.
30. Carlton JG, Cullen PJ. Sortin nexins. *Current Biology*,15(20): R819-20, 2005.