

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

*Caracterização funcional de fatores de transcrição envolvidos
na regulação do metabolismo de glicogênio de
Neurospora crassa*

Fernanda Barbosa Cupertino

2011

FERNANDA BARBOSA CUPERTINO

Caracterização funcional de fatores de transcrição envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio de *Neurospora crassa*

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Maria Célia Bertolini

Araraquara

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

C974c Cupertino, Fernanda Barbosa
Caracterização funcional de fatores de transcrição envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio de *Neurospora crassa* / Fernanda Barbosa Cupertino. – Araraquara : [s.n], 2011
184 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Célia Bertolini

1. Biotecnologia. 2. Fatores de transcrição. 3. Regulação gênica. I. Título.

FERNANDA BARBOSA CUPERTINO

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Biotecnologia.

Araraquara, 09 de dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Maria Célia Bertolini
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



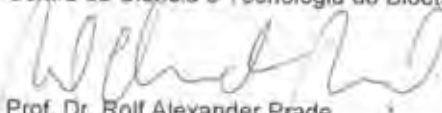
Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal



Profª Drª Ana Paula Ulian de Araujo
Instituto de Física – USP, São Carlos



Dr. Fábio Marcio Squina
Centro de Ciência e Tecnologia do Bioetanol– ABTLuS, Campinas



Prof. Dr. Rolf Alexander Prade
Oklahoma State University – OKSTATE, Stillwater – Estados Unidos

DADOS CURRICULARES

Fernanda Barbosa Cupertino

1. Dados Pessoais

Nascimento: 20 de outubro de 1981

Nacionalidade: brasileira

Naturalidade: São Paulo –SP

Estado Civil: casada

Filiação: Manoel Matias Cupertino e Eunice Barbosa Cupertino

Endereço Residencial: Av. Armando Biagioni, 1007

Jardim das Estações – Araraquara-SP

CEP: 14810-250

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, 55

Quitandinha– Araraquara-SP

CEP: 14800-900

2. Formação Acadêmica

Doutorado em Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, concluído em dezembro de 2011.

Mestrado em Genética e Biologia Molecular, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, área de concentração Genética Molecular, Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus, BA, concluído em abril de 2007.

Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase Biomédica, Universidade Estadual de Santa Cruz, UESC, Ilhéus, BA, concluído em março de 2004.

3. Publicações

MELO, S. C. O.; GAIOTTO, F. A.; CUPERTINO, F. B.; CORRÊA, R. X.; REIS, A. M.; GRATTAPAGLIA, D.; BRONDANI, R. P. V. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), a tree that named a country. *Conservation Genetics*, v.8, p.1269-1271, 2007.

CUPERTINO, F. B.; LEAL, J. B.; VIDAL, P. O.; GAIOTTO, F. A. Parentage testing of hybrid full-sib families of *Eucalyptus* with microsatellites. *Scandinavian Journal of Forest Research*, v.24, p.2-7, 2009.

CUPERTINO, F. B.; LEAL, J. B.; CORRÊA, R. X.; GAIOTTO, F. A. Genetic diversity of *Eucalyptus* hybrids estimated by genomic and EST microsatellite markers. *Biologia Plantarum*, Praha, v.55, p. 379-382, 2011.

GONCALVES, R. D.; CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; LUCHESSI, A. D.; BERTOLINI, M. C. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Molecular Cellular Proteomics*, in press, 2011. doi: 10.1074/mcp.M111.007963.

CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; DE PAULA, R. M. BERTOLINI, M. C. Ambient pH controls glycogen levels by regulating the glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway. *Molecular Microbiology*. (submetido à publicação).

4. Trabalhos apresentados em Congressos

Cupertino, F. B., Virgilio, S., Freitas, F. Z., de Paula, R. M., Bertolini, M. C. In *Neurospora crassa* the PACC pH regulator transcription factor has a role in growth, development and glycogen metabolism regulation In: 26. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **Microbiologia in foco**. São Paulo: SBM, 2011, v.16, p.175.

Virgilio, S., Cupertino, F. B., Gonçalves, R. D., Bertolini, M. C. Functional characterization of the *Neurospora crassa* RCO-1 corepressor transcription factor, the *Saccharomyces cerevisiae* Tup1 homologue In: 26. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu. **Microbiologia in foco**. São Paulo: SBM, 2011, v.16, p. 175.

Corrocher, F. A., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Bertolini, M. C. Cloning and Expression of Genes Encoding Hypothetical Proteins In: XL Annual Meeting of SBBQ 2011, Foz do Iguaçu. **XL Annual Meeting of SBBQ 2011**. p. 55.

Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. The *Neurospora crassa* PacC transcription factor binds to gsn promoter and modulates the gene expression under extracellular pH changes In: 26th Fungal Genetics Conference at Asilomar 2011, Asilomar, Pacific Grove CA. **Fungal Genetics Reports - Supplement**, 2011, v.58, p.159

Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. Involvement of the CRE-1 Protein in the *gsn* Transcriptional Regulation in *Neurospora crassa* In: XXXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - SBBq, 2010, Foz do Iguaçu. **XXXIX Annual Meeting of SBBQ 2010**, 2010.

Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Luchessi, A. D., Bertolini, M. C. *Neurospora crassa* transcription factors involved in glycogen metabolism regulation and cellular development In: Neurospora 2010 Meeting, 2010, Asilomar, Pacific Grove. **Fungal Genetics Reports - Neurospora 2010**, 2010, v.57, p.28.

Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. The *Neurospora crassa* *gsn* gene expression is modulated by extracellular pH changes In: Neurospora 2010 Meeting, 2010, Asilomar, Pacific Grove. **Fungal Genetics Reports - Neurospora 2010**, 2010, v.57, p.28.

Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism In: Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 2009, Cold Spring Harbor. **Abstracts of papers presented at the 2009 meeting on Mechanisms of Eukaryotic Transcription**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 2009, p.82.

Cupertino, F. B., Bertolini, M. C. Identification of *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia. **XXXVIII Annual Meeting of SBBq**, 2009.

Cupertino, F. B., Gonçalves, R. D., Bertolini, M. C. A systematic search for *Neurospora crassa* transcription factors involved in glycogen metabolism regulation In: XI Congress of the PABMB; XXXVII Annual Meeting of SBBq, 2008, Aguas de Lindóia. **XI Congress of the PABMB; XXXVII Annual Meeting of SBBq**, 2008.

Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Bertolini, M. C. Neurospora crassa transcription factors that might be involved in glycogen metabolism regulation In: XI Congress of the PABMB; XXXVII Annual Meeting of SBBq, 2008, Aguas de Lindóia. **XI Congress of the PABMB; XXXVII Annual Meeting of SBBq**, 2008.

5. Participação em Reuniões

Workshop 2009 dos Programas de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Instituto de Química de Araraquara, UNESP. Araraquara, Novembro 2009.

Neurospora 2010 Meeting, Asilomar, Pacific Grove, CA. Abril 2010.

XXXIX Annual Meeting of SBBQ, Foz do Iguaçu. Maio 2010.

Workshop on Second Generation Bioethanol: enzymatic hydrolysis by fungi. Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol, CTBE. Campinas, Outubro 2010.

Protein Day (GE Healthcare). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP Araraquara, Setembro 2011.

26. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Foz do Iguaçu. Outubro 2011.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Manoel e Eunice, aos meus filhos Daniel e
Isabela, e ao meu esposo Anderson, por todo amor, suporte e
apoio, os quais me fizeram ter sempre força de vontade, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu bom Deus, por sempre me agraciar com saúde, paz, fé e determinação.

Ao Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

A FAPESP, pela bolsa de doutorado e reserva técnica concedidas.

A Prof. Dr. Maria Célia Bertolini, minha orientadora e conselheira. Obrigada pela oportunidade e pela confiança em aceitar orientar “uma desconhecida” formada na Bahia!

A Fernanda Zanolli, minha amiga e parceira de laboratório. Obrigada pelos ensinamentos e pelos pensamentos inspiradores, os quais resultaram em um projeto tão bacana quanto foi o da PACC.

A minha amiga Ana Paula Felício, pela amizade e companheirismo, e pelos bons momentos que passamos, desde quando estávamos “barrigudas”, obrigada.

Aos meus colegas de laboratório Rodrigo, Amanda, Mônica, Eliane, Flávia, Thiago, Carol, Stela, Susi, Messias, Vivia, Erick, pela prazerosa convivência e união, pelas boas risadas, e por muitas vezes terem me auxiliado na bancada do laboratório.

Aos Drs. Renato M. de Paula e Eduardo Hilário, pelo suporte técnico e científico que contribuíram muito, mesmo que à distância.

Ao Tarcísio, pela imensa ajuda técnica ao longo destes quatro anos, e aos demais técnicos do Departamento de Bioquímica.

Muito Obrigada!

RESUMO

Este trabalho descreve a caracterização funcional de alguns fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio no fungo filamentoso *Neurospora crassa*. Em uma análise sistemática realizada com 69 linhagens mutantes em genes codificadores para fatores de transcrição, foram identificadas e selecionadas sete linhagens que apresentaram perfis diferentes de acúmulo de glicogênio, em relação à linhagem selvagem, tanto durante o crescimento vegetativo (30°C) como no estresse térmico (45°C). Com o objetivo de verificar o envolvimento dos fatores de transcrição selecionados na expressão dos genes *gsn* (glicogênio sintase) e *gpn* (glicogênio fosforilase), experimentos de *Northern blot* foram realizados e revelaram variações ao nível transcricional em algumas linhagens. A análise por Blast revelou que alguns fatores de transcrição haviam sido previamente estudados em *N. crassa* (CSP-1, RCO-1, NIT2) ou em outros organismos (PacC, FlbC, Fkh1) e participam na regulação de diferentes processos biológicos. O fator de transcrição PACC e a influência do pH externo sobre a regulação do metabolismo do glicogênio foram investigados mais detalhadamente neste trabalho. Os resultados mostraram que na linhagem selvagem o acúmulo de glicogênio e a expressão do gene *gsn* foram reprimidos em condições de pH alcalino, enquanto que o gene *pacC* foi super-expresso nesta condição. A linhagem mutante *pacC*^{KO} mostrou perder a regulação sobre o acúmulo de glicogênio e expressão do gene *gsn*, tanto durante o crescimento em pH fisiológico (5,8) como alcalino (7,8). A análise de ligação DNA-proteína mostrou que a proteína PACC de *N. crassa* recombinante produzida em *E. coli* foi capaz de se ligar ao *motif* de DNA para a proteína PACC, presente na região promotora do gene *gsn*. A especificidade da ligação foi comprovada através de ensaios de competição utilizando um oligonucleotídeo contendo o *motif* de DNA e pela ligação a um fragmento contendo o *motif* mutado por mutagênese sítio-dirigida. A capacidade de ligação também foi verificada utilizando extrato celular obtido a partir de micélio crescido tanto em pH alcalino como no pH normal de crescimento (5,8). Ensaio de *Western blot* revelou que a proteína PACC apresentou a mesma massa molecular em ambos os pH, indicando que a proteína possa estar processada mesmo no pH normal de crescimento. Isto nos levou a sugerir que a via de sinalização mediada por pH em *N. crassa*, a qual resulta na ativação do fator de transcrição PACC, possa ser diferente do modelo proposto para *Aspergillus nidulans*. Os fatores de transcrição NIT2 e CRE-1 também foram caracterizados preliminarmente neste trabalho devido à presença de *motifs* de DNA para as duas proteínas na região promotora dos genes *gsn* e *gpn*. A proteína NIT2 recombinante e a presente no extrato celular bruto de células crescidas em condições fisiológicas normais foram capazes de reconhecer e se ligar ao *motif nit2* da região promotora do gene *gsn*. Por outro lado, a análise da expressão gênica em células crescidas em diferentes fontes de carbono mostrou que a proteína CRE-1 participa no controle do metabolismo de glicogênio em *N. crassa*, mais especificamente ao nível da regulação do gene *gpn*.

Palavras-chave: fatores de transcrição, glicogênio, PACC, NIT2, CRE-1.

ABSTRACT

This work describes the functional characterization of transcription factors likely involved in glycogen metabolism regulation in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. In a systematic analysis performed with 69 strains knocked-out in genes encoding transcription factors, seven strains were identified and selected by presenting profiles of glycogen accumulation different from that existent in the wild-type strain during vegetative growth (30°C) and under heat stress (45°C). In order to verify the involvement of the selected transcription factors in regulation of *gsn* (codes for glycogen synthase) and *gpn* (codes for glycogen phosphorylase) genes, Northern blot assays were performed. Differences in gene expression were observed in some strains compared to the wild-type strain. Blast analysis showed that transcription factors have been previously studied either in *N. crassa* (CSP-1, RCO-1, NIT2) or in other organisms (PacC, FlbC, Fkh1) participating in the regulation of different biological processes. The transcription factor PACC and the influence of the external pH under the regulation of the glycogen metabolism were further investigated. The results showed that in the wild-type strain the glycogen content and the *gsn* gene expression were repressed under alkaline conditions, while the *pacC* gene was overexpressed in this condition. The *pacC*^{KO} strain showed impairments in the glycogen accumulation and *gsn* gene expression under normal pH (5.8) and alkaline (7.8) conditions. Protein-DNA binding analysis showed that *N. crassa* PACC recombinant protein produced in *E. coli* cells was able to bind to the *pacC* motif present in the *gsn* promoter. Binding specificity was confirmed by competition assays using an oligonucleotide containing the DNA motif and by binding to a DNA fragment containing the motif mutated by site-directed mutagenesis. Binding of the PACC protein was also verified using the crude cellular extract obtained from mycelium grown under both alkaline (7.8) and physiological pH (5.8) conditions. The Western blot assay revealed that PACC protein showed the same molecular mass in both pH, suggesting that the protein would be processed even under normal growth pH. This result led us to suggest that the pH signaling pathway in *N. crassa*, which results in the activation of the PACC protein, can be different of the proposed model for *Aspergillus nidulans*. The NIT2 and CRE-1 transcription factors were also preliminarily characterized in this work due to the presence of specific DNA motifs in the *gsn* and *gpn* promoters. The recombinant NIT2 protein and that present in crude cellular extract from cells grown under normal conditions were able to recognize and binding to the NIT2 motif of the *gsn* promoter. On the other hand, gene expression analysis in cells grown under different carbon sources showed that the CRE-1 protein is involved in glycogen metabolism control in *N. crassa*, more probably at the *gpn* gene regulation expression.

Key-words: transcription factors, glycogen, PACC, NIT2, CRE-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida de <i>Neurospora</i>	19
Figura 2 - Representação tridimensional e esquemática dos domínios de ligação ao DNA do tipo <i>zinc finger</i>	25
Figura 3 - Representação tridimensional e esquemática dos domínios de ligação ao DNA	27
Figura 4 - Representação tridimensional e esquemática de domínios protéicos	30
Figura 5 - Representação esquemática do número total de linhagens mutantes utilizadas no trabalho	62
Figura 6 - Concentração de glicogênio nas linhagens selvagem e mutantes antes e depois do choque térmico	64
Figura 7 - Expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> antes e depois do choque térmico nas linhagens selvagem e mutantes selecionadas	65
Figura 8 - Representação esquemática dos domínios dos fatores de transcrição selecionados	69
Figura 9 - Alinhamento múltiplo de seqüências polipeptídicas dos fatores de transcrição F1bC	70
Figura 10 - Alinhamento múltiplo de seqüências polipeptídicas dos fatores de transcrição Fkh1	72
Figura 11 - Alinhamento múltiplo de seqüências polipeptídicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU01994 de <i>N. crassa</i> com proteínas Fcr3	73
Figura 12 - Análise de crescimento linear das linhagens mutantes em <i>race tubes</i>	74
Figura 13 - Análise de crescimento radial das linhagens mutantes	76
Figura 14 - Representação esquemática da região 5'-flanqueadora dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i>	77
Figura 15 - Confirmação dos nocautes por PCR	79
Figura 16 - Amplificação das ORFs por PCR	80
Figura 17 - Purificação da proteína His-ΔPACC produzida em <i>E. coli</i> em pequena escala	83
Figura 18 - Purificação e análise da proteína His-ΔPACC produzida em <i>E. coli</i> em maior escala	84
Figura 19 - Purificação e análise da proteína His-CRE1 produzida em <i>E. coli</i> em maior escala	86
Figura 20 - Purificação e análise da proteína His-ΔNIT2 produzida em <i>E. coli</i> em maior escala	87
Figura 21 – Análise de crescimento linear da linhagem mutante <i>pacC^{KO}</i>	89
Figura 22 – Análise de crescimento radial da linhagem mutante <i>pacC^{KO}</i>	90
Figura 23 - Análise morfológica da linhagem mutante <i>pacC^{KO}</i>	92

Figura 24 – Concentração de glicogênio durante o estresse de pH	93
Figura 25 – Expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>pacC</i> na linhagem selvagem durante o estresse de pH	95
Figura 26 – Expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> nas linhagens selvagem e <i>pacC</i> ^{KO} durante o estresse de pH	97
Figura 27 – Concentração de glicogênio da linhagem selvagem durante o estresse de pH e choque térmico combinados	98
Figura 28 – Expressão gênica durante o estresse de pH e térmico combinados nas linhagens selvagem e <i>pacC</i> ^{KO}	100
Figura 29 – Auto-radiografia dos ensaios de EMSA com a proteína His-ΔPACC	102
Figura 30 – Auto-radiografia dos ensaios de EMSA com a proteína His-ΔPACC	104
Figura 31 – Fracionamento do extrato celular bruto de micélio crescido em pH 5,8 e EMSA utilizando a sonda <i>pacC</i>	106
Figura 32 – EMSA com extrato celular bruto de micélio crescido em pH 5,8 utilizando a sonda <i>pacC</i>	107
Figura 33 – Fracionamento do extrato celular bruto de micélio submetido a estresse de pH alcalino e EMSA utilizando a sonda <i>pacC</i>	108
Figura 34 – EMSA com extrato celular bruto de micélio submetido a estresse de pH alcalino utilizando a sonda <i>pacC</i>	109
Figura 35 – Auto-radiografia do ensaio de EMSA com diferentes frações cromatográficas utilizando a sonda <i>pacC</i>	111
Figura 36 – Análise da expressão da proteína PACC de <i>N. crassa</i> por <i>Western blot</i>	112
Figura 37 – Fracionamento do extrato celular bruto de micélio crescido em condições fisiológicas e EMSA utilizando a sonda <i>nit2</i>	115
Figura 38 – EMSA com extrato celular bruto de micélio crescido em condições fisiológicas utilizando a sonda <i>nit2</i>	116
Figura 39 – Auto-radiografia do ensaio de EMSA com a proteína His-ΔNIT2	117
Figura 40 – Análise de crescimento da linhagem mutante <i>cre-1</i> ^{KO}	119
Figura 41 – Conteúdo de glicogênio e análise da expressão gênica nas linhagens selvagem e mutante <i>cre-1</i> ^{KO}	121
Figura 42 - Concentração de glicogênio durante o crescimento em diferentes fontes de carbono	123
Figura 43 - Expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> nas linhagens selvagem e <i>cre-1</i> ^{KO} crescidas em diferentes fontes de carbono	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem molecular	47
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para o preparo das sondas para EMSA	56
Tabela 3 - Dados bioquímicos obtidos por predição teórica dos fatores de transcrição selecionados	67
Tabela 4 - Classificação das linhagens selecionadas em relação às famílias de fatores de transcrição e suas anotações no banco de dados do FGSC	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Soroalbumina bovina
cDNA	DNA complementar
cpm	Cintilações por minuto
DEPC	Dietil pirocarbonato
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DO	Densidade ótica
DTT	Dietiltreitol
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GST	Glutathione-S-transferase
HEPES	Ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanossulfônico
Hyg	Higromicina
IPTG	Isopropil B-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KO	Knockout
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico
ORF	Open Reading Frame
pb	pares de base
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polimerase Chain Reaction
PKA	Proteína quinase A
PMSF	Fluoreto de metilfenilssulfonil
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAGA	Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSPE	Saline-Sodium-Phosphate-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TLCK	N-p-tosil-L-lisina clorometilcetona
UDP	Uridina difosfato
UTR	Untranslated region
VM	Meio Mínimo de Vogel

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17
1. O fungo <i>Neurospora crassa</i> como organismo modelo de estudo	18
2. Fatores de transcrição	21
2.1. Região promotora e elementos <i>cis</i> de DNA regulatórios	22
2.2. Relação da estrutura da cromatina na regulação da transcrição	23
2.3. Tipos de domínios de ligação ao DNA	24
2.3.1. Domínio <i>zinc finger</i>	24
2.3.2. Domínio <i>helix-turn-helix</i>	26
2.3.3. Domínio <i>leucine zipper</i>	28
2.3.4. Domínio <i>helix-loop-helix</i>	28
2.4. Outros domínios em fatores de transcrição	29
3. Uma visão geral sobre o glicogênio e seu metabolismo	31
3.1. Aspectos bioquímicos e estruturais	31
3.2. Aspectos bioquímicos e moleculares do metabolismo de glicogênio em <i>N. crassa</i>	33
3.2.1. O fator de transcrição PacC	35
3.2.2. O fator de transcrição NIT2	36
3.2.3. O fator de transcrição CRE-1	37
 MATERIAIS E MÉTODOS	 38
1. Linhagens	39
1.1. <i>Neurospora crassa</i>	39
1.2. <i>Escherichia coli</i>	39
2. Meios de cultura	39
2.1. <i>Neurospora crassa</i>	39
2.2. <i>Escherichia coli</i>	40
3. Propagação das linhagens e obtenção dos conídios	41
4. Ensaio de choque térmico	41
5. Ensaios de estresse térmico e de pH	41
6. Ensaio utilizando diferentes fontes de carbono	42
7. Preparo de extrato celular e determinação do conteúdo de glicogênio	42
8. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por <i>Northern blot</i>	43

9. Análise computacional dos fatores de transcrição selecionados	44
10. Análise de crescimento das linhagens mutantes	45
11. Extração de DNA genômico do fungo <i>Neurospora crassa</i>	46
12. Clonagem molecular das ORFs codificadoras dos fatores de transcrição	46
12.1. Biblioteca de cDNA	46
12.2. Amplificação das ORFs que codificam as proteínas estudadas por PCR e clonagem	47
12.3. Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes por PCR	48
13. Preparo e transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	48
14. Mini-extração de DNA plasmidial	49
15. Ensaios de produção e purificação das proteínas recombinantes	49
15.1. Subclonagem das ORFs em vetor de expressão	49
15.2. Ensaio de indução e análise de solubilidade	50
15.2.1. Confirmação por <i>Western blot</i>	51
15.3. Produção de proteínas recombinantes	51
15.4. Purificação das proteínas recombinantes	52
15.4.1. Purificação de proteína recombinante em pequena escala	52
15.4.2. Purificação em maior escala	53
16. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	53
16.1. Condições de crescimento e estresse de pH em <i>N. crassa</i>	54
16.2. Preparo do extrato bruto protéico	54
16.3. Preparo de sondas de DNA	54
16.3.1. Preparo das sondas <i>pacC</i> , <i>cre-1</i> e <i>nit2</i> para analisar os elementos de DNA presentes na região 5'-flanqueadora do gene <i>gsn</i>	55
16.3.2. Preparo da sonda <i>pcr-1</i> para analisar os elementos de DNA (<i>cre1</i>) presentes na região 5'-flanqueadora do gene <i>cre-1</i>	57
16.3.3. Preparo da sonda contendo o elemento <i>pacC</i> mutado (<i>mpacC</i>)	57
16.3.4. Competidores específicos e inespecíficos para a sonda utilizada	58
16.4. Ensaio de mobilidade em gel	58
17. Análise da expressão da proteína PACC por <i>Western blot</i>	59
RESULTADOS	60
Parte 1	
1. Identificação de fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de glicogênio	61

1.1. Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes de <i>N. crassa</i> antes e depois do choque térmico	61
1.2. Análise da expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> por <i>Northern blot</i>	63
1.3. Análise das características bioquímicas e estruturais dos fatores de transcrição selecionados	66
2. Análise morfológica das linhagens mutantes	71
2.1. Determinação da taxa de crescimento linear	71
2.2. Análise de crescimento radial	75
3. Análise da região 5'-flanqueadora dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i>	75
4. Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes por PCR	78
5. Clonagem das ORFs e subclonagem em vetores de expressão	78
6. Produção e Purificação das proteínas recombinantes	81
6.1 Ensaios de indução e análise de solubilidade das proteínas recombinantes	81
6.2. Produção e Purificação em pequena escala	82
6.3. Purificação de proteína recombinante em maior escala	82
 Parte 2	
7. Caracterização funcional do fator de transcrição PACC	88
8. Análise morfológica das linhagens selvagem e mutante <i>pacC</i> ^{KO} em diferentes condições de pH	88
8.1. Determinação da taxa de crescimento linear	88
8.2. Análise de crescimento radial	88
8.3. Análise morfológica	91
9. Determinação do conteúdo de glicogênio durante o estresse de pH	91
10. Análise da expressão dos genes <i>gsn</i> , <i>gpn</i> e <i>pacC</i> durante o estresse de pH	94
11. Determinação do conteúdo de glicogênio durante o estresse de pH e choque térmico	96
12. Análise da expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>pacC</i> durante o estresse de pH e choque térmico combinados	99
13. Análise de ligação DNA-proteína por <i>EMSA</i>	101
13.1. Ensaio de ligação com a proteína His-ΔPACC recombinante	101
13.2. Ensaio <i>EMSA</i> com extrato celular bruto	103
14. Análise da expressão da proteína PACC por <i>Western blot</i>	110

Parte 3

15. Caracterização funcional preliminar do fator de transcrição NIT2	113
16. Análise da ligação DNA-proteína (NIT2)	113
16.1. Análise da ligação com extrato celular bruto	113
16.2. Análise da ligação com a proteína His-ΔNIT2 recombinante	114
17. Caracterização funcional preliminar do fator de transcrição CRE-1	114
18. Análise morfológica da linhagem mutante <i>cre-1^{KO}</i>	118
18.1. Determinação da taxa de crescimento linear	118
18.2. Análise de crescimento radial	118
19. Ensaio de choque térmico	120
19.1. Conteúdo de glicogênio e análise de expressão gênica	120
20. Análise de crescimento em diferentes fontes de carbono	120
20.1. Determinação do conteúdo de glicogênio	122
20.2. Análise da expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> por <i>Northern blot</i>	122
21. Análise de ligação DNA-proteína (CRE-1)	124
 DISCUSSÃO	 127
REFERÊNCIAS	133
ANEXO 1	144
ANEXO 2	158

1. O fungo *Neurospora crassa* como organismo modelo de estudo

O reino dos fungos abrange uma enorme biodiversidade de microorganismos, o qual se estima incluir cerca de 1,5 milhões de espécies, sendo que menos de 5% estão descritas (HAWKSWORTH, 2001; MUELLER; SCHMIT, 2004). Os fungos, conhecidos como bolores, mofos e cogumelos, apresentam grande importância biotecnológica nos ramos alimentício e farmacêutico, pois são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos, como enzimas, antibióticos dentre outros. Além disso, os fungos são fundamentais para a decomposição de matéria orgânica e reciclagem de nutrientes (AZEVEDO, 1997).

Os fungos contribuem com uma enorme soma de conhecimento para o entendimento dos processos genéticos, bioquímicos e moleculares. Dentre os fungos filamentosos, *Neurospora crassa* se destaca como um excelente organismo modelo, não só pela sua facilidade de manipulação e desenvolvimento, como também pelos seus aspectos genéticos e sistemas bioquímicos muito bem estabelecidos (DAVIS; PERKINS, 2002). *N. crassa* é um fungo pertencente à classe dos *Eumycetes*, subclasse *Ascomyceta*, família *Sordariaceae*, subfamília *Sphaeriales* (ESSER; KUENEN, 1967) e ficou popularmente conhecido como o “bolor laranja” nas padarias francesas, em meados do século XIX, como contaminante de pães e outras substâncias ricas em carboidratos. No início do século XX, foi descoberta a tolerância dos ascósporos de *N. crassa* às altas temperaturas. No Brasil, um fungo laranja foi descrito por crescer em vegetação submetida à queimada (PERKINS, 1992).

Neurospora crassa tem nutrição simples e necessita de apenas uma única fonte de carbono, sais minerais e uma vitamina essencial: a biotina (METZENBERG, 1979). Por ser de caráter heterotrófico, utiliza variadas fontes de carbono, metabolizando rapidamente glicose, manose, frutose, xilose, sacarose, maltose, celobiose e trealose. O nitrogênio é metabolizado na forma de amônia, que pode ser obtida de maneira direta ou indireta, através da transformação de nitritos, nitratos, aminoácidos ou catabolismo de proteínas e ácidos nucleicos. Tem seu crescimento ótimo em pH 5,4, mas é bastante tolerante e consegue se desenvolver numa faixa de pH variando entre 4,0 e 7,5 (METZENBERG, 1979).

N. crassa é um fungo aeróbio restrito, não patogênico, com um tempo de duplicação de aproximadamente 150 min. É um microorganismo haplóide durante o crescimento vegetativo, onde aparecem as estruturas destinadas à propagação do fungo (macroconídios e microconídios) e diplóide durante a fase sexual de reprodução, quando ocorre a fusão de dois núcleos haplóides e a formação de núcleos zigóticos (METZENBERG, 1979) (figura 1). Sendo um fungo heterotático, *N. crassa* possui indivíduos sexualmente compatíveis de dois tipos designados A e a. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer duas linhagens de tipos sexuais opostos são

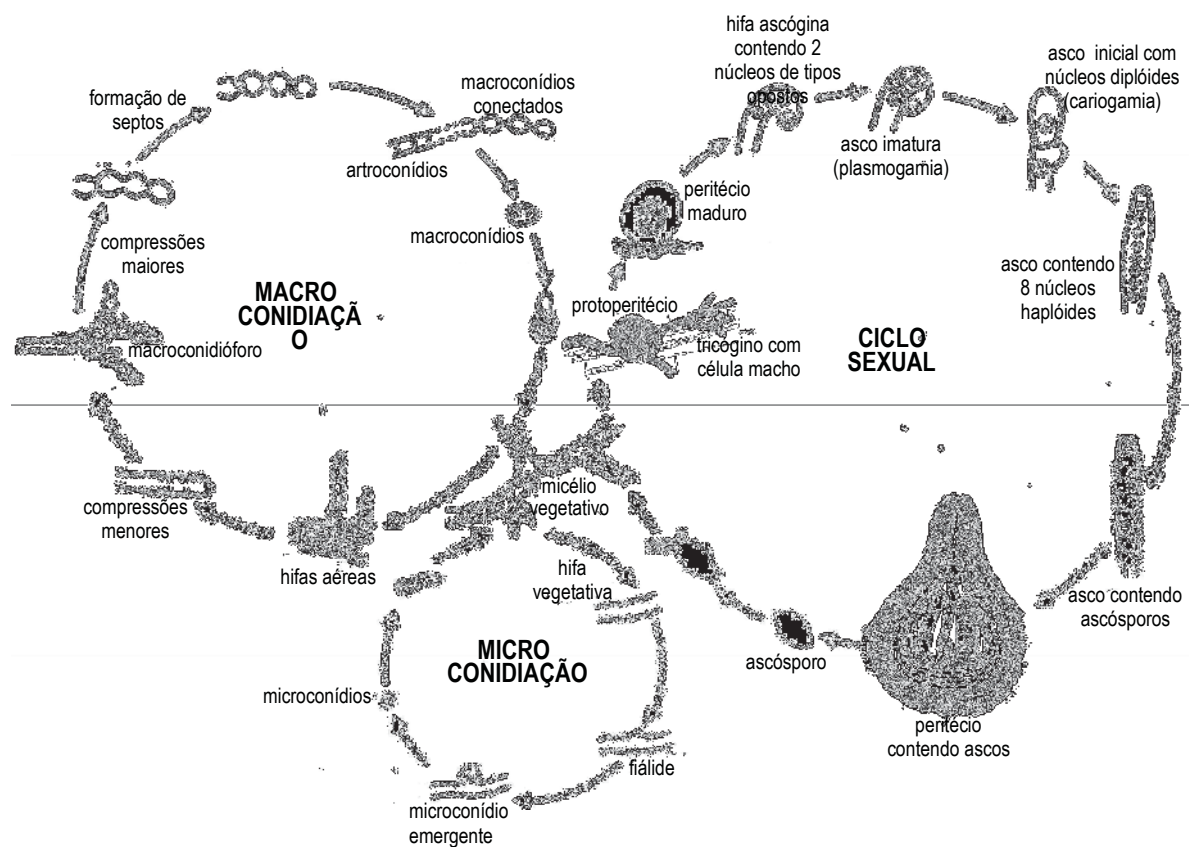


Figura 1. Ciclo de vida de *Neurospora*. (BORKOVICH et al., 2004).

competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto o outro pode se comportar como “macho” (doador de núcleo) ou “fêmea” (receptora de núcleo) (FINCHAN; DAY; RADFORD, 1979). Resumidamente, a doação de núcleo ocorre por um macroconídeo, microconídeo, ou pedaço de hifa que entra em contato com o protoperitécio, a qual se trata de uma estrutura reprodutora feminina receptora de núcleo, que somente é formada em resposta à privação de nitrogênio (FINCHAN; DAY; RADFORD, 1979; METZENBERG, 1979).

N. crassa possui um genoma haplóide de aproximadamente 40 Mb, sendo maior que os genomas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (ambos com cerca de 12 Mb). Em 2003, sua seqüência genômica foi determinada, alavancando as pesquisas a cerca dos fungos filamentosos (GALAGAN et al., 2003). O genoma de *N. crassa* está organizado em 7 cromossomos, onde estão distribuídos 10.082 genes. Na época do sequenciamento do genoma, somente 13% dos genes codificavam proteínas conhecidas em bancos de dados; 46% dos genes codificavam proteínas hipotéticas, e 41% deles codificavam proteínas que não possuíam ortólogos funcionais conhecidos, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. Outra característica interessante revelada é de que 57% das proteínas não correspondiam às proteínas de leveduras, enquanto que 14% delas eram ortólogas a proteínas de animais e plantas (GALAGAN et al., 2003). Além disso, *N. crassa* compartilha genes com uma variedade de grupos taxonômicos e o grau de complexidade do seu genoma se aproxima ao de *Drosophila melanogaster* (DUNLAP et al., 2007), sugerindo que esse fungo se relacione melhor com organismos eucariotos superiores do que com as leveduras.

Após a finalização do sequenciamento do genoma de *N. crassa*, uma série de abordagens experimentais foi proposta pela comunidade científica, a qual foi dividida em quatro grande projetos: (1) a criação de um banco de linhagens mutantes (*knockout*), permitindo a caracterização de genes desconhecidos; (2) a anotação funcional desses genes; (3) a montagem de um perfil transcricional baseado na criação de *microarrays* de DNA, e (4) a geração de um mapa da SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) de alta densidade (DUNLAP et al., 2007). A inativação de genes de interesse e a caracterização funcional, bem como a análise fenotípica das linhagens mutantes, vem permitindo expandir o conhecimento do genoma funcional em fungos, por meio da comparação de importantes processos biológicos entre organismos modelos distintos.

Em *N. crassa*, dois processos de geração de linhagem mutantes estão bem descritas: a mutação por RIP (*Repeat Induced Point Mutation*) e a técnica de *knockout*. A inativação por RIP baseia-se na introdução de uma cópia extra do gene alvo no fungo. Os transformantes, contendo uma cópia adicional do gene, introduzem mutações pontuais na seqüência genômica quando submetidos ao cruzamento seguido de meiose (SELKER,

1990). Esta técnica foi bastante utilizada na década passada e, embora seja um método útil e eficaz, demanda muito tempo para ser desenvolvido (NINOMIYA et al., 2004). Além disso, nem todas as seqüências de DNA são suscetíveis ao RIP (SELKER, 1990).

O procedimento de *knockout* é mais rápido e baseia-se no mecanismo de recombinação homóloga, onde ocorre a troca do gene alvo por outro a partir das extremidades de seqüências homólogas (NINOMIYA et al., 2004). A recombinação homóloga é um fenômeno extremamente raro em *N. crassa*, porém freqüente em *S. cerevisiae*. Na recombinação não-homóloga, o DNA exógeno é integrado em qualquer região do genoma, sendo um mecanismo conservado evolutivamente em humanos, plantas e insetos. Dentre as proteínas envolvidas nesse processo, destacam-se as proteínas Ku70 e Ku80, as quais formam um heterodímero que se liga nas extremidades do DNA, compondo um complexo de reparação das fitas (WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001). As proteínas Ku70 e Ku80 são conservadas tanto em leveduras quanto em humanos, e em *N. crassa*, seus homólogos foram nomeados como *mus-51* e *mus-52*, respectivamente. Dessa forma, Ninomiya et al. (2004) desenvolveram um procedimento, baseado em PCR, para a inativação desses genes e, desta maneira, construir linhagens de *N. crassa* nas quais o processo de recombinação não-homóloga é bloqueado, favorecendo a recombinação homóloga. A técnica de *knockout* permitiu a construção de um banco de linhagens mutantes de *N. crassa* nos genes codificadores de proteínas e, assim, alavancar a genômica funcional. Atualmente, tais linhagens encontram-se depositadas no *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA), e estão disponíveis para a comunidade científica. Em 2006, Colot et al. publicaram os primeiros resultados de morfologia relacionados às linhagens mutantes nos 103 genes codificadores de fatores de transcrição. Estas linhagens mutantes se tornaram um material interessante para o início dos estudos acerca dos mecanismos regulatórios de controle da expressão gênica ao nível transcricional (GONÇALVES et al., 2011; TIAN; LI; GLASS, 2011).

2. Fatores de transcrição

Nos organismos vivos, com exceção de alguns vírus, a informação genética de todas as células está depositada na seqüência de nucleotídeos de seu DNA. Essa informação é codificada e transmitida para moléculas de RNA e proteínas. A regulação da expressão gênica permite que a célula exerça um controle sobre a sua estrutura e função, que é a base da diferenciação celular, da morfogênese e da versatilidade e adaptabilidade de qualquer organismo (GRIFFITHS et al. 2001). Para a maioria dos genes de organismos eucarióticos, o controle transcricional ocorre de forma predominante, o qual envolve a participação de

uma grande quantidade de proteínas que se associam e se ligam especificamente nas sequências regulatórias dos genes, modulando a atividade da RNA polimerase (COOPER, 2000).

Algumas proteínas regulatórias são denominadas **fatores de transcrição**, as quais, no geral, possuem dois domínios protéicos: um de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*), que permite o ancoramento da proteína às sequências nucleotídicas específicas, e outro, de ativação transcricional (AD, *activation domain*), o qual permite a interação com outros componentes da maquinaria de transcrição (COOPER, 2000). É importante ressaltar que alguns fatores de transcrição não possuem o domínio de ativação AD ou o domínio de ligação DBD. Neste caso, o DBD e o AD estão localizados em diferentes proteínas no complexo de ligação ao DNA, sendo necessária a interação das mesmas para que possa ocorrer a transcrição (LATCHMAN, 2003). As proteínas que somente têm o domínio de ativação AD são chamadas de co-fatores transcricionais.

Os fatores de transcrição ainda podem ser classificados em dois tipos: fatores gerais de transcrição e ativadores/repressores transcricionais. Os fatores gerais de transcrição estão envolvidos na modulação da transcrição de todos os promotores coordenados pelas RNAs polimerases, sendo parte constituinte da maquinaria básica da transcrição. Alguns desses fatores se associam a regiões específicas do DNA permitindo que sequencialmente outros fatores gerais se liguem e recrutem a RNA polimerase na região promotora. Estando completa a formação do complexo de iniciação da transcrição, a RNA polimerase inicia o processo de transcrição do RNA. Os ativadores/repressores transcricionais são proteínas regulatórias específicas que modulam a expressão de determinados genes. Estas proteínas podem influenciar a transcrição de genes mesmo que estejam ligadas a milhares de nucleotídeos do promotor (ALBERTS et al., 2004). É importante enfatizar que a maioria das proteínas regulatórias atuam como parte de complexos compostos por outras proteínas, e dificilmente elas trabalham sozinhas.

2.1. Região promotora e elementos *cis* de DNA regulatórios

A região de controle gênico é aquela que normalmente está posicionada *upstream* à sequência codificadora do gene (ORF) e é responsável pela regulação da taxa de transcrição. Estão presentes nesta região o promotor do gene, onde se ligam os fatores gerais de transcrição e a RNA polimerase, e os elementos *cis* regulatórios, aos quais se ligam uma variedade de proteínas regulatórias, contribuindo para a indução ou repressão da expressão gênica. Alguns elementos ativadores são chamados de *enhancers*, pois aumentam a transcrição de genes, os quais podem estar localizados a poucos nucleotídeos

da região promotora, como também distantes, tanto *upstream* como *downstream* do promotor. Essa “ação à distância” é explicada pela capacidade do DNA em formar alças ou voltas, permitindo que o fator de transcrição ligado ao *enhancer* interaja diretamente com os fatores gerais da transcrição ou com a própria RNA polimerase (BRADEN; TOOZE, 1999; COOPER, 2000).

A ação inibitória de proteínas regulatórias repressoras na transcrição pode ocorrer da mesma forma que nas proteínas ativadoras, ou seja, pela ligação direta a sítios regulatórios específicos. Outra forma de controle transcricional é a competição do fator de transcrição repressor com proteínas ativadoras pela ligação a um sítio de DNA específico. Como consequência, a ligação do repressor ao promotor ou a um *enhancer* bloqueado leva à inibição da transcrição (ALBERTS, et al., 2004; COOPER, 2000).

2.2. Relação da estrutura da cromatina na regulação da transcrição

A estrutura da cromatina está relacionada com a modulação da transcrição de genes. Nas células eucarióticas, a cromatina é constituída por DNA associado a uma grande quantidade de proteínas histonas e não-histônicas, que interagem de forma dinâmica com a cadeia nucleotídica, sendo responsáveis pela compartimentalização da cromatina no núcleo, bem como pelo controle da expressão gênica (LUGER et al., 1997). Uma unidade de nucleossomo é composta por um fragmento de DNA de 147 pares de nucleotídeos que dão quase duas voltas em um octâmero de histonas, o qual é constituído por dois pares das histonas H2A, H2B, H3 e H4 (LI; CAREY; WORKMAN, 2007). Unidades de nucleossomos condensados formam uma estrutura altamente organizada e empacotada, sendo importante para regular o acesso de proteínas regulatórias ao DNA. As histonas nos nucleossomos estão sujeitas a um grande número de modificações pós-traducionais, como por exemplo, acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação, dentre outras, as quais provocam alterações na estrutura da cromatina. O DNA pode se tornar mais compactado ou mais relaxado, modulando a acessibilidade de fatores de transcrição e da RNA polimerase no DNA (LI; CAREY; WORKMAN, 2007).

Alguns reguladores transcricionais bem estudados fazem parte deste tipo de regulação, também chamada de “remodelagem da cromatina”, como por exemplo, o complexo SAGA em *S. cerevisiae*, em que a acetiltransferase (Gcn5p) transfere o grupo acetil para resíduos de lisina presente nas caudas das histonas H3 e H2B, levando a uma menor interação com DNA (BROWN et al., 2000); e o complexo SWI/SNF, com capacidade de desestabilizar os dímeros H2A/H2B em uma reação dependente de ATP, liberando os elementos *cis* de DNA bloqueados pelos nucleossomos (BRUNO et al., 2003).

2.3. Tipos de domínios de ligação ao DNA

Como mencionado anteriormente, em geral, os fatores de transcrição possuem um domínio de ligação ao DNA, o qual é complementar às características superficiais da dupla-hélice. A interação proteína-DNA envolve ligações de hidrogênio, iônicas e interações hidrofóbicas, as quais asseguram uma associação forte e específica. Estudos de cristalografia por difração de raios-X e de RMN têm revelado que nos domínios de ligação ao DNA, tanto α -hélices como folhas- β se ligam ao sulco maior da dupla-hélice em um ajuste tão perfeito, sendo capazes de distinguir diferentes sequências nucleotídicas (ALBERTS et al., 2004). Dessa forma, os fatores de transcrição são classificados em diferentes famílias de acordo com o tipo de domínio de ligação ao DNA. A maioria dos fatores de transcrição faz parte das famílias dos domínios *zinc finger* (dedo de zinco), zíper de leucina e *helix-turn-helix* (hélice-volta-hélice) (BRADEN; TOOZE, 1999).

2.3.1. Domínio *zinc finger*

Os fatores pertencentes à família dedo de zinco fazem parte de uma das maiores famílias de fatores de transcrição em eucariotos, possuindo uma grande quantidade de estruturas secundárias distintas. O domínio dedo de zinco é composto de uma cadeia polipeptídica contendo resíduos de cisteína e/ou histidina que interagem entre si por meio da ligação com átomos de zinco, na qual é formada uma estrutura em forma de “dedo”. Essa estrutura é estável e interage diretamente com o sulco de DNA. Uma proteína pode conter mais de uma repetição do domínio *zinc finger*, permitindo um aumento na especificidade de reconhecimento dos sítios de ligação ao DNA, como é o caso do fator geral de transcrição TFIIIA, o qual contém 30 repetições (BRADEN; TOOZE, 1999; LUSCOMBE et al., 2000).

Os domínios do tipo *zinc finger* podem ser divididos em classes, conforme a variação do número de resíduos de cisteína e histidina. O domínio *zinc finger* clássico corresponde ao domínio C_2H_2 (-Cys-Cys-His-His-), constituído por duas estruturas de folhas- β antiparalelas, seguidas de um *hairpin* e uma estrutura em α -hélice com três voltas e meia (figura 2A). A interação com o átomo de zinco ocorre entre os resíduos Cys3, Cys6 (extremidade N-terminal), e His19 e His23 (extremidade C-terminal) (BRADEN; TOOZE, 1999; LUSCOMBE et al., 2000). Em *N. crassa*, tem-se como exemplo de fator de transcrição do tipo *zinc finger* clássico a proteína CRE-1, a qual está envolvida na regulação do catabolismo de fontes de carbono (SUN; GLASS, 2011).

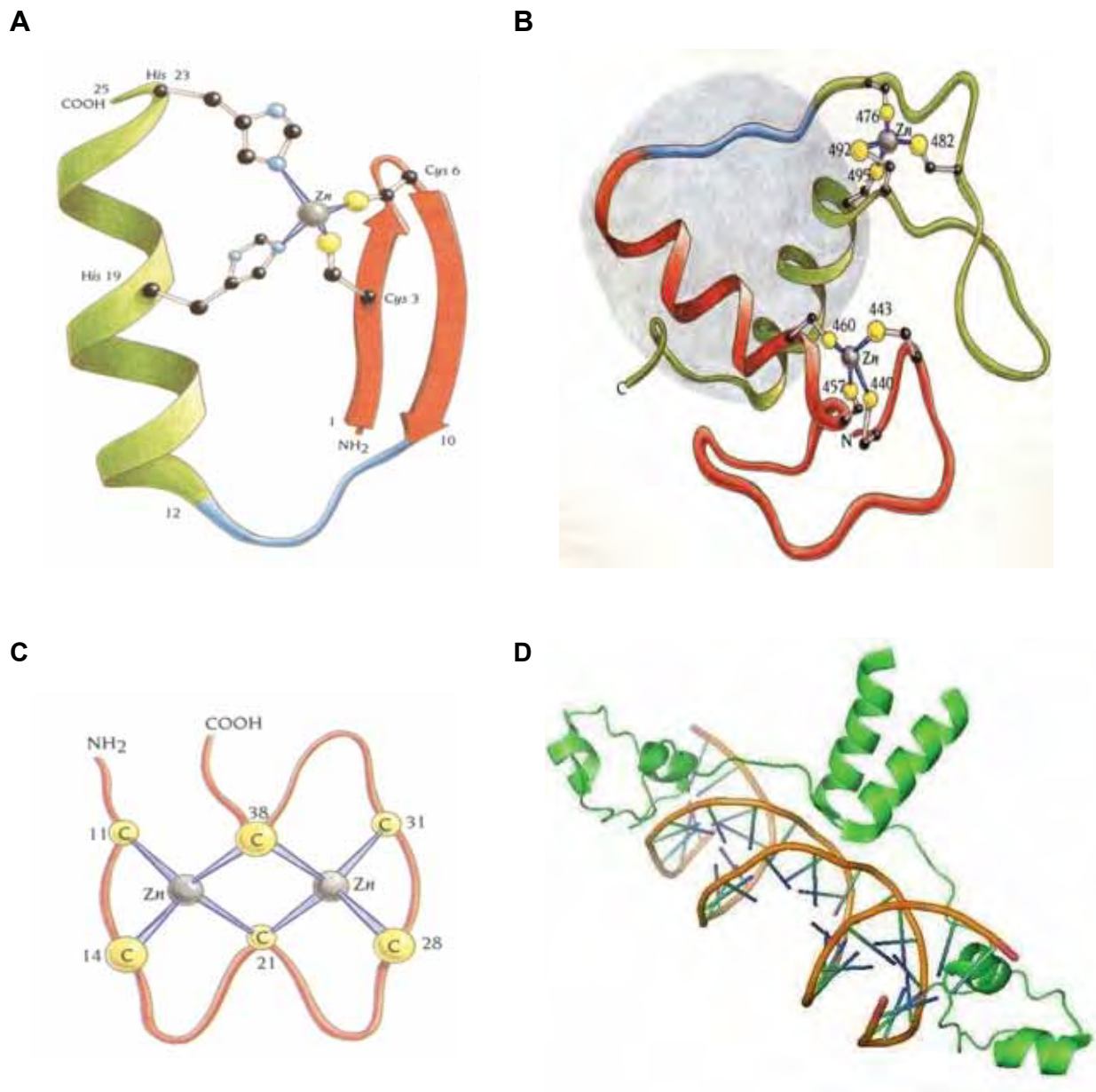


Figura 2 – Representação tridimensional e esquemática dos domínios de ligação ao DNA do tipo *zinc finger*. **(A)** Estrutura tridimensional do domínio Cys₂His₂ da proteína embrionária *Xfin* de *Xenopus laevis*. **(B)** Estrutura tridimensional do domínio Cys₄ do receptor de glicocorticoide. **(C)** Esquema da estrutura do domínio Zn₂Cys₆ da proteína GAL4 de *S. cerevisiae*. **(D)** Estrutura tridimensional dos domínios Zn₂Cys₆ da proteína Gal4 ligada ao DNA (PDB 1D66). (BRADEN; TOOZE, 1999; <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Outra classe do domínio *zinc finger* é a do tipo Cys₄ (-Cys-Cys-Cys-Cys-) ou GATA, assim chamado por se ligar ao *motif* de DNA 5'-GATA-3'. Nesse domínio, duas α -hélices são mantidas juntas por dois átomos de zinco (figura 2B), nas quais as proteínas costumam formar dímeros. Nestes, as primeiras α -hélices interagem com o sulco maior do DNA, e as segundas são responsáveis pela manutenção do dímero. Um clássico exemplo de fatores do tipo Cys₄ são os receptores de glicocorticóides (ALBERTS et al., 2004; BRADEN; TOOZE, 1999) e em *N. crassa*, o fator de transcrição NIT2, envolvido na regulação do metabolismo de nitrogênio (FU; MARZLUF, 1987).

A família do domínio *zinc finger* ainda possui outra classe denominada Zn₂Cys₆ (-Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-X₆-Cys-X₂-Cys-X₆-Cys-) ou *binuclear zinc cluster*, em que dois átomos de zinco são coordenados por um par de α -hélices através de seis resíduos de cisteína (figura 2C). Uma α -hélice se liga ao DNA pelo sulco maior e a segunda interage com o esqueleto de fosfato (LUSCOMBE et al., 2000). Um exemplo dessa classe de fator de transcrição é a proteína Gal4 de *S. cerevisiae*, a qual se liga ao DNA na forma de dímero (figura 2D), ativando a transcrição de genes requeridos para a metabolização da galactose (BRADEN; TOOZE, 1999). Em *N. crassa*, o fator de transcrição NIT4 pertence à classe Zn₂Cys₆ e regula, juntamente com NIT2, genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio (FENG; MARZLUF, 1998).

A última classe dos domínios *zinc finger* descrita é aquela que envolve três resíduos de cisteína e um de histidina (-Cys-X₂-Cys-X₄-His-X₄-Cys-). A estrutura desse domínio é parecida com a do *zinc finger* clássico, porém não há formação da α -hélice por causa do *harpin* curto (figura 3A). A interação com o átomo de zinco ocorre entre os resíduos Cys3, Cys6, His11 e Cys16 (BRADEN; TOOZE, 1999). Um exemplo clássico deste tipo de domínio é o presente na proteína gag do retrovírus HIV, a qual forma um complexo com o RNA viral (BRADEN; TOOZE, 1999).

2.3.2. Domínio *helix-turn-helix*

Os domínios de fatores de transcrição pertencentes à família *helix-turn-helix* ou HTH são comuns tanto em procariotos como em eucariotos. O domínio HTH é composto de duas α -hélices ligadas por poucos resíduos de aminoácidos que formam uma “volta” ou *turn*. A segunda α -hélice, chamada de hélice de reconhecimento, é capaz de se ligar em sequências específicas no sulco maior do DNA (ALBERTS et al., 2004). As estruturas externas ao domínio HTH variam muito em proteínas de procariotos, os quais estão inseridos em diferentes contextos estruturais. Em eucariotos, o domínio HTH está sempre rodeado pela mesma estrutura, chamada de homeodomínio, o qual é composto de três

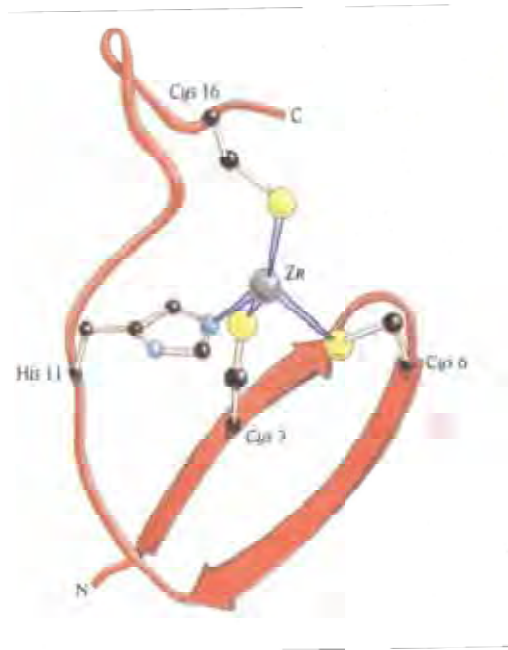
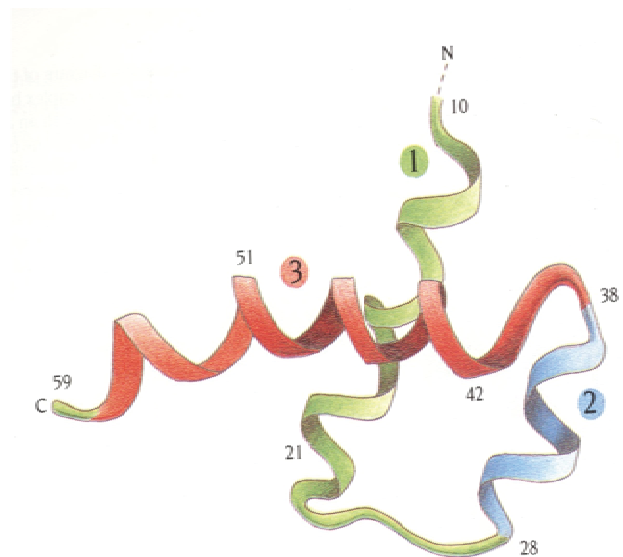
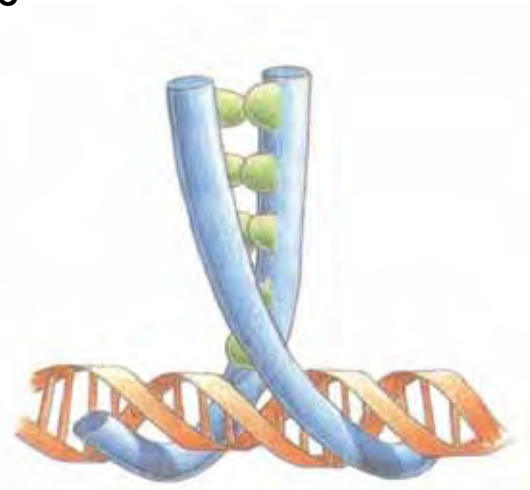
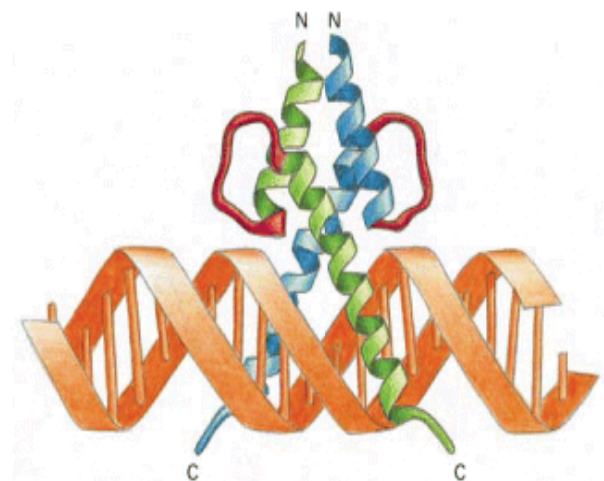
A**B****C****D**

Figura 3 – Representação tridimensional e esquemática de domínios de ligação ao DNA. (A) Estrutura tridimensional do domínio *zinc finger* Cys₃His da proteína gag do retrovírus HIV. (B) Representação da estrutura de um homeodomínio contendo o domínio *helix-turn-helix*. (C) Esquema da estrutura do domínio zíper de leucina da proteína Gcn4 de *S. cerevisiae*. (D) Representação tridimensional de um dímero bHLH ligado ao DNA (ALBERTS et al., 2004; BRADEN; TOOZE, 1999).

α -hélices conectadas por “voltas”, sendo que as hélices 2 e 3 fazem parte do domínio HTH (figura 3B). Nesse caso, a terceira α -hélice se encaixa no sulco do DNA e as outras duas se deitam sobre ela, assegurando a ligação no DNA (ALBERTS et al., 2004; BRADEN; TOOZE, 1999).

2.3.3. Domínio *leucine zipper*

Os fatores de transcrição que contêm domínios regulatórios da família zíper de leucina ou bZIP (*basic leucine zipper*) reconhecem o DNA na forma de dímeros (homo ou heterodímeros), os quais podem desempenhar múltiplas funções (BORKOVICH et al., 2004). No domínio bZIP, duas α -hélices, uma de cada dímero, são reunidas antiparalelamente para formar uma pequena região helicoidal hidrofóbica (figura 3C). A hidrofobicidade ocorre entre as cadeias laterais de aminoácidos apolares, freqüentemente leucina. Seguindo a região de dimerização, as duas α -hélices se separam, formando a região de ligação ao DNA, a qual se encaixa no sulco maior da dupla hélice, como se fosse um prendedor de roupas em um varal. Um bom exemplo do domínio bZIP é o presente na proteína Gcn4 de levedura, envolvido na regulação de genes em resposta ao estresse de aminoácidos (BRADEN; TOOZE, 1999; LUSCOMBE et al., 2000). Em *N. crassa*, a proteína CPC-1 é ortóloga à Gcn4p e parece exercer a mesma função que a proteína de *S. cerevisiae* (TIAN et al., 2007).

2.3.4. Domínio *helix-loop-helix*

Os fatores de transcrição da família do domínio *basic helix-loop-helix* ou bHLH existem somente em organismos eucarióticos. O domínio bHLH é constituído de duas α -hélices anfipáticas, conectadas por uma região espaçadora em forma de alça (*loop*), que pode variar de 5 a 23 resíduos de aminoácidos (BRADEN; TOOZE, 1999). Diferente das proteínas com domínio HTH, os fatores de transcrição com domínio bHLH não possuem uma porção de α -hélice específica responsável pela ligação ao DNA, porém se ligam à dupla fita por meio da formação de dímeros (figura 3D), sejam eles homo ou heterodímeros (ALBERTS et al., 2004). Os dímeros são estabilizados por uma série de interações hidrofóbicas e eletrostáticas entre as α -hélices, devido à formação de um feixe de 4 hélices que mantém os monômeros unidos, constituindo uma interface de ligação ao DNA. É importante ressaltar que as proteínas que apresentam domínios de ligação bHLH não possuem a capacidade de diferenciar os sítios de ligação ao DNA sob a forma de monômeros. Assim, o mecanismo de dimerização tem a função de converter moléculas monoméricas inativas em complexos

diméricos ativos (BRADEN; TOOZE, 1999). Um bom exemplo de domínio bHLH é a proteína Pho4 de *S. cerevisiae*, a qual regula genes envolvidos na resposta ao fosfato e se liga a sequência consenso 5'-CANNTG-3' (SHAO; CREASY; BERGMAN, 1998).

2.4. Outros domínios em fatores de transcrição

Existem outros tipos de domínios de ligação ao DNA que não são tão comuns quantos aos citados acima. Borkovich et al. (2004) classifica os fatores de transcrição de *N. crassa* contendo esses domínios “não-clássicos” como *miscellaneous factors*, os quais incluem as proteínas com o domínio *forkhead*, *ringer finger*, *WD-repeats*, dentre outros.

O domínio ***forkhead***, anteriormente denominado *winged helix*, teve a sua nomenclatura padronizada em 1998, em que a simbologia FOX (*Forkhead Box*) foi adotada, dividindo-se os domínios em subclasses baseado em análises filogenéticas (KAESTNER; KNOCHEL; MARTÍNEZ, 2000). A primeira proteína *forkhead* descrita foi a de *D. melanogaster*, envolvida no desenvolvimento embrionário. Logo após, a proteína HNF3 (*hepatocyte nuclear fator 3*) foi descrita em roedores como membro da família *winged helix* (KAUFMANN; KNOCHEL, 1996). O domínio *forkhead* é formado por um grupo de 3 ou 4 α -hélices (H1, H2, H3, H4), em que um *loop* ou uma pequena α -hélice (H4) está localizado entre as hélices H2 e H3 (figuras 4A e 4B). Uma folha- β (S1) se forma entre H1 e H2, e duas outras folhas- β (S2 e S3) são separadas por uma grande região em forma de asa (*wing*, W1). Já na região C-terminal, encontra-se outra estrutura em forma de asa (W2), logo atrás da hélice H3 (KAUFMANN; KNOCHEL, 1996; OBSIL; OBSILOVA, 2008). A interação da proteína *forkhead* com o DNA ocorre por meio do encaixe da hélice H3 no sulco maior da dupla-hélice, sendo que a sequência *core* 5'-RYMAAYA-3' (R= A ou G, Y= C ou T, M= A ou C) é específica para proteínas com este tipo de domínio, as quais exercem funções variadas nas células, tais como no desenvolvimento, diferenciação e progressão do ciclo celular (KAUFMANN; MULLER, KNOCHEL, 1995).

O domínio ***WD-repeats*** está presente em proteínas de todas as espécies eucarióticas, as quais exercem funções variadas que vão da transdução de sinais até o controle do ciclo celular (LI; ROBERTS, 2001). Esse domínio compreende sequências conservadas de 40 a 60 resíduos de aminoácidos, as quais iniciam com glicina-histidina (GH) e terminam com triptofano-ácido aspártico (WD), por isso também tem sido referido como domínio WD40 ou GH-WD *repeats* (NEER et al., 1994). Estas repetições permitem que o domínio tenha uma estrutura circularizada de folhas- β antiparalelas, a qual apresenta três superfícies de interação: a do topo, a do fundo e a do interior (túnel) (figura 4C). O domínio *WD-repeats* não interage diretamente com o DNA, porém com outras proteínas regulatórias. Um exemplo de *WD-repeats* melhor caracterizado é o presente na subunidade G β da proteína G

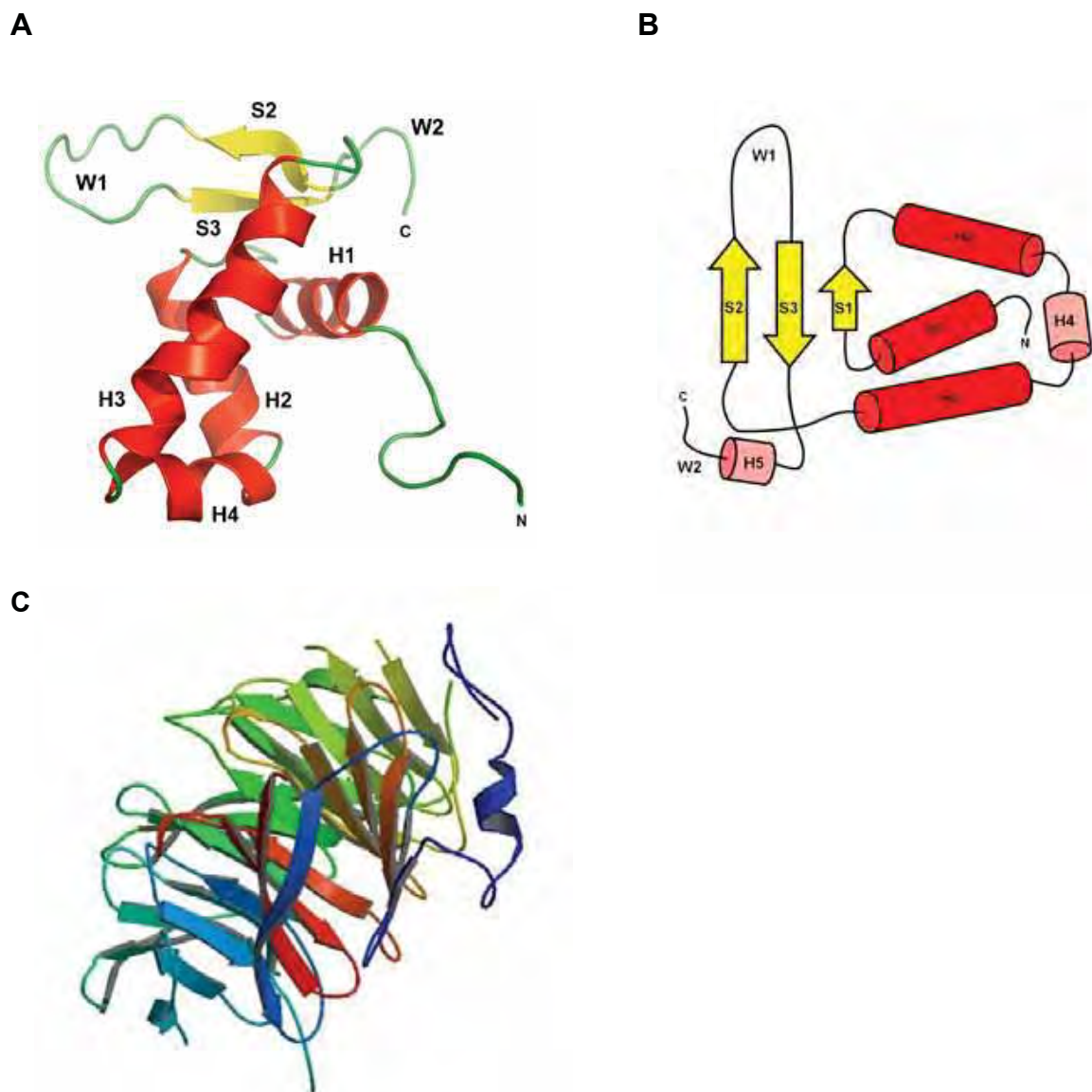


Figura 4 – Representação tridimensional e esquemática de domínios protéicos **(A)** Estrutura tridimensional do domínio *forkhead* FOXO4 de humanos. **(B)** Representação esquemática da estrutura do domínio *forkhead*. **(C)** Estrutura do domínio WD40 da proteína Tup1 de *S. cerevisiae*. (OBSIL & OBSILOVA, 2008; SPRAGUE et al., 2000).

heterotrimérica, a qual compõe a maquinaria de sinalização transmembrana (SMITH et al., 1999). Outro exemplo é a proteína Tup1, de *S. cerevisiae*, que está envolvida na formação de complexos protéicos repressores, regulando genes em resposta a vias de sinalização (SMITH; JOHNSON, 2000; TREITEL; CARLSON, 1995).

3. Uma visão geral sobre o glicogênio e seu metabolismo

3.1. Aspectos bioquímicos e estruturais

O glicogênio é um polímero ramificado formado por moléculas glicose, o qual é uma das reservas de energia armazenada dentro de células eucarióticas (BASKARAN et al., 2010). Este polissacarídeo encontra-se amplamente distribuído na natureza e possui função de reserva de carbono e energia entre os diferentes organismos, desde bactérias até o ser humano (NELSON; COX, 2005; ROACH; SKURAT; HARRIS, 2001). O glicogênio é uma molécula uniforme e compacta, onde os resíduos de glicose são unidos covalentemente por meio de ligações glicosídicas α -1,4, as quais são responsáveis pela formação de sua cadeia linear; e por ligações glicosídicas α -1,6, que formam as ramificações do polímero. Outros constituintes, como por exemplo, proteínas, glucosaminas e fosfato estão associados à molécula de glicogênio (ROACH; SKURAT; HARRIS, 2001; ROACH, 2002).

O metabolismo do glicogênio é um processo conservado entre os diferentes organismos eucarióticos. De um modo geral, a biossíntese deste polissacarídeo envolve a ação de três enzimas: (i) a glicogenina, uma proteína autoglicosilável que funciona como uma molécula iniciadora para o início da biossíntese do glicogênio; (ii) a glicogênio sintase que catalisa a extensão da cadeia pela formação das ligações α -1,4 lineares da molécula, e (iii) a glicosil-(4 \rightarrow 6)-transferase que catalisa as ligações α -1,6 das ramificações (ROACH; SKURAT; HARRIS, 2001; ROACH, 2002).

A glicose entra na célula por meio de proteínas transportadoras e após a entrada é convertida em glicose-6-fosfato (G6P) numa reação catalisada pela hexoquinase. Na síntese do glicogênio, G6P é primeiramente transformada em glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase, a qual serve como substrato para a produção de UDP-glicose pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. Dessa forma, as moléculas de UDP-glicose se tornam doadoras diretas de resíduos de glicose para a síntese inicial do glicogênio, a qual envolve a ação da enzima glicogenina, assim como para o processo de alongação, efetuado pela enzima glicogênio sintase. A síntese global se completa pela atuação da enzima ramificadora, a qual transfere um fragmento de seis a sete resíduos de glicose da cadeia nascente para pontos de ramificação (ROACH, 2002).

O processo contrário à biossíntese, ou seja, a degradação do glicogênio é realizado pela enzima glicogênio fosforilase que desfaz as ligações glicosídicas α -1,4 lineares por meio de uma reação de fosforólise, a qual leva ao encurtamento do polímero e o resíduo terminal de glicose é removido da molécula como G1P. A “desramificação” é catalisada pela enzima oligo (1,6) \rightarrow (1,4) glicotransferase (ou enzima desramificadora) que remove o resíduo de glicose α (1 \rightarrow 6), resultando num polímero linear que será novamente substrato para a enzima fosforilase. Os resíduos de G1P, produtos finais da degradação do glicogênio, são novamente convertidos em G6P que podem ser usados na glicólise (NELSON; COX, 2000; ROACH, 2002).

A regulação da enzima **glicogênio sintase** vem sendo alvo de estudo por mais de 50 anos (BASKARAN et al., 2010). A glicogênio sintase ou “GS” existe em duas formas distintas as quais diferem entre si pelo seu estado de fosforilação e pela sua dependência ao ativador alostérico glicose-6-fosfato. A forma *a* (desfosforilada e ativa) apresenta atividade completa e pouca dependência de G6P. A forma *b* (fosforilada e pouca ativa) apresenta completa atividade somente na presença do modulador G6P. Desse modo, a razão entre a atividade GS na ausência/presença de G6P tem sido usada como índice cinético do grau de fosforilação da enzima (HARDY; ROACH, 1993; HUANG; CABIB, 1974).

Na última década, o isolamento de cDNAs e genes codificando para a glicogênio sintase de mamíferos e microrganismos tem ajudado a elucidar importantes aspectos da regulação dessa enzima. O alinhamento das sequências polipeptídicas de diversas proteínas glicogênio sintase demonstrou que, de um modo geral, existe uma região central conservada e dentro dessa, três segmentos menores definidos por inserções e deleções (PEDERSON et al., 2000). As regiões N-terminal e C-terminal da enzima são constituídas de sequências mais variáveis, as quais estão envolvidas no controle por fosforilação.

Embora numerosos trabalhos envolvendo o controle da atividade GS por fosforilação reversível tenham sido publicados, os mecanismos que controlam o metabolismo de glicogênio em geral e a enzima glicogênio sintase, em particular, estão longe de serem esclarecidos. A atividade desta enzima em mamíferos está sob um rigoroso controle hormonal e diversas proteínas quinases parecem estar envolvidas nesse processo (ROACH, 1990). A enzima de músculo esquelético de coelho possui nove sítios de fosforilação localizados nas extremidades N-terminal e C-terminal da molécula, os quais constituem substratos para, no mínimo, 10 proteínas quinases diferentes *in vitro* (SKURAT; WANG; ROACH, 1994). Alguns sítios de fosforilação na região N-terminal estão ausentes na glicogênio sintase de fígado humano (NUTTALL et al., 1994), assim como nas enzimas de levedura.

Em microorganismos, as enzimas glicogênio sintase de *S. cerevisiae* (Gsy1p e Gsy2p) são bem estudadas, sendo que a proteína Gsy2p representa a forma predominante,

explicando para 90% da atividade GS na fase estacionária (FARKAS et al., 1990, 1991). A regulação da expressão da Gsy2p parece estar ligada à limitação de nutrientes e condições de estresse, tais como o choque térmico e estresse salino (FARKAS et al., 1991; NI; LAPORTE, 1995; PARROU; TESTE; FRANÇOIS, 1997). Recentemente, a estrutura tridimensional da enzima Gsy2 foi resolvida, tanto no seu estado basal, como no estado ativado pela glicose-6-fosfato (BASKARAN et al., 2010).

A enzima **glicogênio fosforilase**, semelhante a glicogênio sintase, também é regulada por modificação covalente (fosforilação) e alosterismo. Entretanto, apenas um resíduo de aminoácido é fosforilado (Ser14) e a enzima é modulada de forma inversa a glicogênio sintase, pois a fosforilação torna-a ativa e a G6P leva à sua inatividade (FRANÇOIS; PARROU, 2001; ROACH; SKURAT; HARRIS, 2001).

3.2. Aspectos bioquímicos e moleculares do metabolismo de glicogênio em *N. crassa*

Alguns aspectos bioquímicos e moleculares do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* vem sendo estudados em nosso laboratório, dando ênfase às enzimas que participam da biossíntese desse polímero. Os cDNAs que codificam para as enzimas glicogenina e glicogênio sintase de *N. crassa* foram isolados e as sequências de aminoácidos dessas duas proteínas foram deduzidas (DE PAULA et al., 2002, 2005a, 2005b). A enzima glicogênio sintase de *N. crassa* possui 66% e 67% de identidade com as proteínas Gsy1p e Gsy2p de *S. cerevisiae*, respectivamente (DE PAULA et al., 2002), e 56% e 58% de identidade com as enzimas de músculo de coelho e de músculo humano, respectivamente. O grau de identidade entre a proteína do fungo e as proteínas de fígado humano e de rato é de 53% e 52%, respectivamente. Quatro potenciais sítios de fosforilação na região C-terminal foram identificados na sequência polipeptídica da enzima glicogênio sintase de *N. crassa*, os quais foram demonstrados serem fosforilados *in vitro* (BARBOSA, 2007; DE PAULA, 2004). Mais recentemente, foi demonstrado que a proteína quinase A (PKA) influencia na fosforilação desta enzima (FREITAS et al., 2010).

Em *N. crassa* o glicogênio é acumulado no final da fase exponencial de crescimento e é degradado no início da fase estacionária. Além dos mecanismos de regulação pós-traducional da enzima glicogênio sintase, o metabolismo de glicogênio também pode ser regulado sob diferentes mecanismos, como por exemplo, privação de carbono, situações de estresse, tal como o choque térmico, e indução da conidiação (DE PAULA et al., 2002; NOVENTA-JORDÃO et al., 1996). Sob condição de choque térmico (transferência de 30 para 45°C), o nível do transcrito *gsn* (codificador para a glicogênio sintase) sofre uma

acentuada redução e retorna ao nível normal após o restabelecimento da temperatura fisiológica de crescimento da cultura (30°C) (DE PAULA et al., 2002; FREITAS; BERTOLINI, 2004). O inverso ocorre em *S. cerevisiae*, pois, sob condição de estresse térmico, a transcrição do gene *GSY2*, que codifica uma das enzimas glicogênio sintase neste microorganismo, é aumentada com o consequente acúmulo de glicogênio (NI; LAPORTE, 1995). O aumento na expressão do gene *GSY2* durante o choque térmico foi demonstrado ser decorrente da presença de dois elementos regulatórios de DNA presentes na região promotora do gene, os STREs (Stress Responsive Elements) que são elementos de transcrição *cis* presentes nos promotores de genes responsivos a várias condições estressantes (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996).

Freitas e Bertolini (2004) realizaram a caracterização molecular da região promotora do gene *gsn* de *N. crassa* e identificaram vários elementos regulatórios de DNA na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*. Uma grande quantidade de HSEs (Heat-Shock Elements) e dois elementos STREs foram localizados, um deles no promotor do gene e outro dentro de um intron na região 5'-UTR. É importante salientar que a sequência codificadora é interrompida por quatro pequenos introns e um grande, com aproximadamente 500 pb, posicionado na região 5'-UTR. Os HSEs são elementos regulatórios de DNA encontrados em múltiplas cópias nos promotores de genes responsivos ao choque térmico (BIENZ; PELHAM, 1987) e, em geral, conferem uma forte indução frente ao estresse térmico, podendo agir tanto como elementos proximais ao TATA Box quanto como *enhancers* (BIENZ; PELHAM, 1986). Através de ensaios de retardamento em gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) utilizando fragmentos de DNA do promotor *gsn*, contendo elementos HSE e STRE, bandas de DNA-proteína de mobilidade reduzida foram observadas com extratos nucleares de células do fungo *N. crassa* submetidas ao choque térmico (FREITAS; BERTOLINI, 2004). Estes resultados demonstraram fortemente o envolvimento das regiões estudadas na regulação da expressão do gene *gsn* durante a condição de estresse mencionada. Utilizando uma abordagem bioquímica acoplada à espectrometria de massas foi possível a identificação de várias proteínas potencialmente capazes de se ligar ao elemento STRE, provavelmente envolvidas na regulação do gene *gsn* durante o choque térmico (FREITAS et al., 2008).

Como mencionado anteriormente, a finalização do sequenciamento do genoma de *N. crassa* abriu novas fronteiras para a realização de estudos funcionais. Uma coleção de linhagens mutantes contendo genes que codificam fatores de transcrição individualmente nocauteados pelo FGSC foi disponibilizada para a comunidade científica. A utilização de algumas dessas linhagens mutantes de *N. crassa* contribuiu enormemente para a identificação de proteínas possivelmente envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio em uma situação de estresse, tal como o choque térmico (GONÇALVES et al.,

2011). Em um estudo sistemático de *screening* foram identificados, ao todo, 17 fatores de transcrição, dentre eles as proteínas PACC, NIT2 e XLNR. No presente trabalho, foi realizada uma caracterização funcional mais detalhada dos fatores de transcrição PACC, NIT2 e CRE-1.

3.2.1. O fator de transcrição PacC

O fator de transcrição PacC é a proteína mais bem estudada na regulação de genes que respondem à alteração do pH do meio extracelular. O modelo para o sistema regulatório de pH foi primeiramente descrito em *Aspergillus nidulans*, microrganismo capaz de crescer em uma ampla faixa de pH (CADDICK; BROWNLEE; ARST, 1986). A regulação por pH é mediada pela proteína PacC, o qual é ativado depois de duas etapas proteolíticas: a primeira, sinalizada por seis produtos dos genes da via *pal* (PEÑALVA; ARST, 2004), e a segunda, por uma protease pH-independente (HERVÁZ-AGUILAR et al., 2007), quando o pH do meio é alterado de ácido para alcalino. A forma ativa da PacC (27 kDa) contém apenas a região N-terminal da proteína não processada (72 kDa), onde está localizado o domínio de ligação ao DNA formado por três C_2H_2 *zinc fingers* que se ligam à sequência consenso de DNA 5'-GCCARG-3' (R= A ou G) presente nos promotores de genes, regulando-os. Dessa forma, PacC²⁷ ativa a transcrição de genes específicos de pH alcalino e reprime aqueles de pH ácido (TILBURN et al., 1995; ESPESO et al., 1997).

A proteína PacC ortóloga em *S. cerevisiae* é a Rim101p, sendo primeiramente descrita como um regulador transcricional positivo no processo de meiose e esporulação. A linhagem de levedura mutante no gene *rim101* é sensível a íons Na^+ ou Li^+ e tem o crescimento afetado quando crescida em baixas temperaturas (SU; MITCHELL, 1993). Assim, a proteína Rim101p parece estar envolvida em outros processos celulares além da resposta dependente de pH e difere, em alguns aspectos, da proteína PacC de *A. nidulans*: sofre apenas um único processamento proteolítico para se tornar ativo e está associado à repressão de genes induzidos por alcalinidade (LAMB; MITCHELL, 2003; LI; MITCHELL, 1997). Em *S. cerevisiae*, várias vias de sinalização estão ativadas em resposta ao pH alcalino, tais como as vias da calcineurina, da MAP quinase, do estresse oxidativo, dentre outras (ARINO, 2010). A proteína Rim101p atua como repressor, se ligando diretamente a sítios existentes em promotores de genes, ou reprimindo fatores regulatórios repressores que controlam negativamente outros genes que são ativados por pH (LAMB; MITCHELL, 2003).

Os fatores de transcrição PacC/Rim101p tem sido largamente estudados em fungos e leveduras. Alguns estudos mostram o envolvimento da PacC na regulação de genes de

diferentes processos celulares como a produção de antibióticos, antifúngicos e toxinas (ESPESO; PEÑALVA, 1996; KELLER et al., 1997; MEYER; STAHL, 2002; MORENO-MATEOS et al., 2007). Alguns trabalhos mostram o envolvimento da proteína PacC na patogenicidade de fungos (ROLLINS; DICKMAN, 2001; ZOU et al., 2010), na regulação da expressão de enzimas extracelulares (MACCABE et al., 1998), proteínas transportadoras (CARACUEL et al., 2003; EISENDLE et al., 2004; VANKUYK et al., 2004) e proteínas de choque térmico (SQUINA et al., 2010).

3.2.2. O fator de transcrição NIT2

A proteína NIT2 é um fator de transcrição global envolvido na regulação do metabolismo de nitrogênio e, em *N. crassa*, atua como ativador da expressão de genes estruturais, como por exemplos, os genes *nit-3* e *nit-6* (codificadores da nitrato e nitrito redutase, respectivamente), quando há limitação de fonte primária de compostos nitrogenados e/ou indução por nitrato (MARZLUF, 2001). Entretanto, sabe-se que para a total ativação do gene *nit-3* é necessária a interação das proteínas NIT2 e NIT4, sendo esta última uma proteína regulatória de controle específico nas vias de regulação do metabolismo do nitrogênio (CHIANG; MARZLUF, 1995; FENG; MARZLUF, 1998).

O fator de transcrição NIT2 foi inicialmente caracterizado em *N. crassa* por Fu e Marzluf (1987), apresenta 1036 resíduos de aminoácidos e um *motif* de ligação ao DNA do tipo “GATA” *zinc finger* (Cys4) na porção C-terminal que se liga especificamente a sítios existentes nos promotores de genes relacionados ao metabolismo de nitrogênio. A proteína NIT4 pertence à família GAL4 de fatores de transcrição com domínio Zn₂Cys₆ (FU; MARZLUF, 1990a; MO; MARZLUF, 2003). Ensaios de mutagênese sítio-dirigida revelaram que a funcionalidade da proteína NIT2 se deve ao domínio GATA *zinc finger*, mostrando que a porção N-terminal da NIT2 é dispensável para a ativação de genes (FENG; MARZLUF, 1998; FU; MARZLUF, 1990a, 1990b). Entretanto, nem sempre a especificidade de ligação dos fatores GATA a elementos GATA de DNA está relacionada com a especificidade funcional da proteína, como já foi demonstrado em um estudo reportado por Feng e Marzluf (1998). Fatores GATA de *N. crassa* WC1 e WC2 (*white collar*), SRE (modulador da homeostase de ferro) e NGR1 foram capazes de se ligar a *motifs* GATA existentes no promotor *nit-3*, sem estarem relacionados diretamente ao metabolismo de nitrogênio (FENG; MARZLUF, 1998).

3.2.3. O fator de transcrição CRE-1

O fator transcricional CreA (*A. nidulans*), CRE-1 (*N. crassa*) ou Mig1 (*S. cerevisiae*) vem sendo descrito como um repressor transcricional que age em resposta ao mecanismo do catabolismo de carbono, conhecido como CCR (Carbon Catabolite Repression), o qual é conservado entre diferentes espécies de fungos (RUIJTER; VISSER, 1997; ZIV; GOROVITS; YARDEN, 2008). Esse mecanismo controla o uso preferencial de fontes de carbono de fácil metabolização (glicose e frutose, por exemplo) quando presentes no meio, reprimindo vários outros genes de utilização de fontes de carbono alternativos, tais como galactose, maltose, xilose, arabinose, glicerol, dentre outros (ARO; PAKULLA; PENTILLA, 2005; RUIJTER; VISSER, 1997).

A proteína CreA possui um domínio de ligação ao DNA do tipo C_2H_2 *zinc finger* que se liga à sequência consenso de DNA 5'-SYGGRG-3' (S= G ou C, Y= T ou C, R= A ou G) (STRAUSS et al., 1999) presente nos promotores de genes. Alguns trabalhos mostram que CreA também pode ser auto-regulada transcricionalmente por possuir, na região promotora do gene *creA*, sítios para ela mesma (STRAUSS et al., 1999). Além da regulação transcricional, tanto CreA como Mig1p podem ser reguladas negativamente por meio de modificações pós-traducionais, tal como por fosforilação por proteínas quinases dependente de AMP cíclico (AMPK) (VAUTARD-MEY; FEVRE, 2000) e Snf1p (OSTLING; RONNE, 1998), respectivamente. Em *N. crassa*, um estudo mostrou que CRE-1 está envolvida na polaridade celular das hifas, dependente de PKA (ZIV; GOROVITS; YARDEN, 2008).

1. Linhagens

1.1. *Neurospora crassa*

Linhagem FGSC#9718 (a, *mus-51::* Hyg^r): utilizada como selvagem neste trabalho

Linhagens mutantes: Uma coleção de 69 linhagens mutantes de *N. crassa*, contendo genes que codificam fatores de transcrição individualmente nocauteados foi adquirida pelo laboratório. Das 69 linhagens, 21 correspondem a linhagens nocauteadas no mesmo gene, mas com fator de acasalamento distinto (A ou a), portanto 48 fatores de transcrição foram analisados neste trabalho. Todas as linhagens utilizadas foram adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center*, Kansas City, MO, USA. As linhagens foram recebidas em placas de 96 wells e foram nomeadas de acordo com o padrão da placa (A1 até F9).

Linhagem mutante *cre-1^{KO}*: FGSC#10372 (a, *cre-1::* Hyg^r)

Linhagem mutante *pacC^{KO}*. Essa linhagem foi mutada através da técnica de *knockout* (NINOMIYA et al. 2004), realizada pelo Dr. Renato Magalhães de Paula (Texas A&M University, College Station, TX, USA). Resumidamente, a sequência codificadora da ORF NCU00090 foi trocada, por recombinação homóloga, pela ORF do gene *bar* que codifica uma proteína de resistência ao herbicida BASTA/Ignita/Fosfotricina/Glufosinato.

1.2. *Escherichia coli*

DH10 β

BL21(DE3)pLysS

Rosetta(DE3)pLysS

2. Meios de cultura

2.1. *N. crassa*

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens do fungo *N. crassa* foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956). Esse meio foi preparado contendo sacarose, sais de Vogel e biotina. A solução de sais de Vogel foi preparada 50X concentrada, a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 mL de água destilada:

510 g de citrato de sódio.H₂O

250 g de KH₂PO₄

100 g de NH_4NO_3

10 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (pré-dissolvido em água destilada)

5 mL de solução de elementos traços

O volume foi completado para 1 L com água destilada e 300 μL de clorofórmio foi adicionado como agente conservante. A solução estoque de sais de Vogel foi armazenada a 4°C. A solução de elementos traços foi feita pela dissolução dos seguintes compostos em 90 mL de água:

5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5 g de ácido cítrico. H_2O

5 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1 g de $\text{F}(\text{NH}_4)_2 \cdot (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,25 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,05 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,05 g de H_3BO_3

0,05 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

O meio mínimo de Vogel foi preparado contendo uma fonte de carbono (2% e 0,5% de sacarose, para o crescimento de 24 horas e para o estresse térmico e de pH, respectivamente; 2% frutose, 2% glicose, 2% xilose ou 2% glicerol, para o ensaio de crescimento em diferentes fontes de carbono), sais de Vogel 1X, biotina 0,1 mg/mL preparada em 50% etanol e 2% de ágar para culturas de meio sólido.

O pH do meio mínimo de Vogel é 5,8. Para os ensaios de estresse de pH, o meio foi aferido para 4,2 com solução concentrada de HCl; e para 7,8, com solução concentrada de NaOH.

2.2. *E. coli*

2YT + 0,2% Glicose

1,6% triptona

1,0% extrato de levedura

0,5% NaCl

0,2% glicose

Para culturas sólidas, foi adicionado ao meio 2% de ágar

3. Propagação das linhagens e obtenção dos conídios

Para a obtenção dos micélios utilizados nos experimentos de choque térmico, o inóculo foi feito em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio sólido e deixado a 30°C na estufa por 48 h e, em seguida, expostos à luz até um total de 9 a 10 dias para indução da conidiação. Após esse período os conídios foram coletados pela adição de aproximadamente 10 mL de água destilada estéril à garrafa, seguida de filtração em gaze estéril para retenção das hifas. Os conídios foram contados em câmara de Neubauer.

4. Ensaio de choque térmico

Uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^7 células/mL) de todas as linhagens utilizadas neste trabalho foi inoculada em 60 mL de meio VM líquido e colocada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, e rapidamente dividido em duas amostras: uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, não submetida a choque térmico). A outra amostra foi transferida para outro frasco contendo meio VM líquido, pré-aquecido a 45°C, e deixada nesta temperatura por 30 minutos. Em seguida essa segunda amostra foi coletada por filtração, rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra submetida a choque térmico).

5. Ensaios de estresse térmico e de pH

Conídios das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* foram utilizados em experimentos de estresse de pH e em experimentos de estresse de pH e temperatura combinados. Uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^9 células/mL) foi inoculada em 2 L de meio VM líquido (pH 5,8) e colocada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, e rapidamente dividido em seis amostras. Uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, não submetida a estresse térmico e de pH) e duas outras amostras foram transferidas para outros frascos contendo meio VM líquido nos pHs 4,2, e 7,8, a 30°C (estresse de pH). Amostras foram retiradas após 15, 30, 45 e 60 min de estresse. Outras três amostras de micélio foram transferidas para frascos contendo meio VM líquido nos pHs 4,2, 5,8 e 7,8, pré-aquecido a 45°C (estresse térmico e de pH). Amostras foram coletadas após 30 min de estresse.

Em ambos os experimentos as amostras da linhagem selvagem foram submetidas a condições de recuperação. Para isto, os micélios restantes do estresse de pH foram

transferidos para meio VM líquido a pH 5,8 e amostras foram retiradas nos tempos de 30, 60 e 120 min de incubação. Para a recuperação dos micélios submetidos a estresse de pH e temperatura combinados, os micélios restantes foram transferidos para meio VM, mantendo os diferentes pHs analisados, porém na temperatura de 30°C. Amostras foram removidas após 30, 60 e 120 min de incubação. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

6. Ensaio utilizando diferentes fontes de carbono

Conídios das linhagens selvagem e mutante *cre-1^{KO}* foram utilizados em um experimento de crescimento em diferentes fontes de carbono. Uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^9 células/mL) foi inoculada em 1 L de meio VM líquido contendo 2% de frutose e colocada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, e rapidamente dividido em quatro amostras. Uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, FRU) e as três outras amostras foram transferidas para outros frascos contendo 250 mL de meio VM líquido com 2% de glicose, xilose e glicerol e incubadas a 30°C. Amostras foram coletadas após 2, 4 e 8 h de incubação. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C.

7. Preparo de extrato celular e determinação do conteúdo de glicogênio

Uma pequena quantidade do micélio congelado foi pulverizada em nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de solução tampão gelada (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, TLCK 2 mM, aprotinina 1 µg/mL e pepstatina A 1 µg/mL). A mistura foi homogeneizada em *vortex* e, em seguida, centrifugada a $10.000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi recolhido em um tubo eppendorf novo. Uma alíquota foi utilizada para a determinação das proteínas totais do extrato celular pelo método de Hartree modificado utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (HARTREE, 1972).

O conteúdo de glicogênio foi determinado pela digestão do glicogênio com amiloglicosidase e α -amilase, após precipitação com etanol absoluto, como descrito por Hardy e Roach (1993), com algumas modificações. Primeiramente, foram coletados 100 µL do extrato celular bruto e adicionado 25 µL de TCA 50%. Em seguida, o material foi centrifugado a $5.000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf limpo, adicionado 500 µL de etanol absoluto e deixado 30 min a -80°C para a precipitação do glicogênio presente na fração solúvel. Finalmente, a solução foi centrifugada a $17000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min para a coleta do glicogênio, o qual foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 66%, rapidamente seco ao ar, e

ressuspenso em 400 μ L de solução acetato (acetato de sódio 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 5,2). O glicogênio foi digerido com as enzimas α -amilase (1 μ L de uma solução 10 mg/mL) e amiloglicosidase (1 μ L de uma solução de 30 mg/mL) durante 12 a 15 horas. O conteúdo de glicose livre foi determinado pelo kit *Glicose PAP Liquiform* (Labtest) segundo as instruções do fabricante. O conteúdo de glicogênio presente em cada amostra foi calculado de acordo com uma curva padrão de glicogênio e expresso em relação à quantidade de proteína total de cada amostra.

A curva padrão de glicogênio foi preparada a partir de uma solução de glicogênio puro (Sigma) em solução acetato (acetato de sódio 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 5,2) na concentração de 10 mg/mL.

8. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por *Northern blot*

O RNA total das linhagens selecionadas foi extraído pelo método de cloreto de lítio (SOKOLOVSKY et al., 1990), com algumas modificações. Para isto, uma pequena quantidade do micélio congelado foi pulverizada em nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para tubos eppendorf contendo uma mistura de 750 μ L de tampão de lise (Tris-HCl 0,1M, NaCl 0,6M, EDTA 10 mM, pH 8,0 e SDS 4%) e 750 μ L de fenol saturado em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. A suspensão foi agitada em vortex durante 5 minutos e centrifugada a 14.000 rpm/4°C/10 min em centrífuga de bancada. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 750 μ L de clorofórmio e agitado em vortex rapidamente para homogeneização. Foi feita uma nova centrifugação a 14.000 rpm/4°C/10 min. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M e mantido a 4°C por 2 horas. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 14.000 rpm/4°C/10 min. O precipitado foi ressuspenso em 300 μ L de água tratada com DEPC e novamente precipitado com 30 μ L acetato de sódio 3M pH 5,2 e 750 μ L de etanol absoluto gelado, durante 10 minutos no gelo. O RNA total foi coletado a 14.000 rpm/4°C/15 min, lavado duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada, seco e solubilizado em 50-100 μ L de água previamente tratada com DEPC. A concentração do RNA foi determinada por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640 e sua pureza analisada através da relação de absorbâncias 260/280 nm.

A análise por *Northern blot* foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Para isto, aproximadamente 15 μ g de cada amostra de RNA total foi previamente desnaturada em tampão de desnaturação (MOPS 1X, formamida deionizada 50%, formaldeído 20 %, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,025%, brometo de etídeo 0,05 μ g/mL) a 65°C durante 10 minutos. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído 0,6 M a 65 V por aproximadamente 4 horas em tampão

MOPS 1X. O RNA total, após eletroforese, foi transferido por capilaridade para membrana de nylon neutra (Hybond N, Amersham) utilizando solução tampão SSC 2X (NaCl 0,3 M e citrato de sódio 3 mM, pH 7,0) durante a noite. Após esta etapa, os RNAs foram fixados na membrana por *crosslinking* (Ultraviolet Crosslinker UVP mod. CL1000) durante 2 min e, em seguida, a membrana foi lavada com solução tampão SSC 2X durante 1 h. Após a lavagem, a membrana foi pré-hibridizada a 42°C, durante 4 h com 5 mL da solução *ULTRAhyb*TM (Ambion) em forno de hibridização Hybaid. As sondas utilizadas corresponderam a fragmentos de DNA dos genes *gsn* (1350 pb), *gpn* (798 pb) e *pacC* (639 pb). As sondas foram marcadas radiativamente com α [³²P]dATP por *random priming* utilizando o kit *NEBlot*TM (Biolabs) e, em seguida, purificadas por filtração em resina Sephadex G-50 (Sigma) equilibrada em tampão NT (Tris-HCl 1 mM, pH 8,0, NaCl 1 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0) a fim de eliminar os nucleotídeos não incorporados. Em seguida, a sonda foi desnaturada a 100°C durante 10 minutos e adicionada à solução de pré-hibridização *ULTRAhyb*TM (Ambion) (10⁷ cpm). A hibridização foi realizada a 42°C durante a noite. Após a hibridização a membrana foi lavada em diferentes condições de estringência antes de ser exposta a filmes radiográficos (Kodak T-Mat G/RA).

Condições de lavagem:

- SSPE 2x - 20 min/42°C
- SSPE 0,5x; SDS 0,1% - 20 min/42°C
- SSPE 0,1x; SDS 0,1% - 20 min/42°C

A normalização da expressão gênica (*blots*) foi feita em relação ao rRNA, utilizando-se o programa Image J (ABRAMAFF; MAGALHÃES, RAM, 2004).

9. Análise computacional dos fatores de transcrição selecionados

As sequências nucleotídicas das ORFs que codificam os fatores de transcrição das linhagens mutantes selecionadas foram identificadas no genoma de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) e as sequências polipeptídicas deduzidas. Para a estimativa teórica das propriedades físico-químicas dos fatores de transcrição foi utilizado a ferramenta ProtParam no site do servidor ExPASy (www.expasy.org/tools/protpar-ref.html). A detecção de domínios conhecidos presentes nos fatores de transcrição foi feita por meio das informações disponíveis no genoma do fungo (<http://www.fgsc.net/scripts/strainsearchform.asp>), pelo SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) e pelo Pfam 22.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk>). A presença de sinais de localização nuclear clássicos (NLS) foram determinadas pelo PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>).

As sequências polipeptídicas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Para o alinhamento múltiplo das sequências de proteínas que apresentaram similaridades relevantes com a análise do Blastp, foram utilizados os seguintes programas: ClustalW, no site do *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>) e o *Boxshade*, no site *Box Shade Server* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

A identificação de sítios de ligação de fatores de transcrição à sequências de DNA dos promotores dos genes *gsn*, *gpn*, e *pacC* também foram realizadas, utilizando-se o programa *MatInspector* no site Genomatix (<http://www.genomatix.de>).

10. Análise de crescimento das linhagens mutantes

A taxa de crescimento linear das linhagens selvagem e mutantes selecionadas foi determinada através do crescimento em *race tubes*, que são tubos de vidro (50 cm de comprimento x 2 cm de diâmetro) contendo as duas extremidades curvadas num ângulo de aproximadamente 45° e parcialmente preenchidos com meio VM sólido. As linhagens foram rejuvenescidas e as hifas foram inoculadas em uma das extremidades dos tubos, os quais foram incubados no escuro a 30°C por 96 horas. O crescimento do fungo foi monitorado a cada 24 h, por meio da marcação da frente do crescimento micelial, em centímetros (cm).

Para a análise de crescimento linear em diferentes condições de pH, conídios (10^7 cel/mL) das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* foram inoculados em meio VM sólido nos pHs 4,2, 5,8 e 7,8, e incubados no escuro em temperatura ambiente por 120 h. O crescimento do fungo foi monitorado a cada 24 h, por meio da marcação da frente do crescimento micelial, em centímetros (cm).

A análise de crescimento radial foi feita em placas contendo meio VM e VM suplementado com 2% de extrato de levedo (YE). Para isto, conídios (10^7 cel/mL) das linhagens selvagem e mutantes ou massa micelial (das linhagens doentes) foram inoculadas no centro das placas e incubadas no claro/escuro, a 30 °C durante 24 h.

Para a análise de crescimento radial em diferentes condições de pH, conídios (10^7 cel/mL) das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* foram inoculados no centro do meio VM sólido e VM suplementado com 2% de extrato de levedo (YE) nos pH 4,2, 5,8 e 7,8, e incubados no claro/escuro a 30°C por 24 h. As pontas das hifas foram observadas em esteromicroscópio trinocular Zeiss, modelo Discovery V8, em aumento de 80X, e fotografadas (AxioCam ICc 3 Zeiss).

11. Extração de DNA genômico do fungo *Neurospora crassa*

O DNA genômico das linhagens selvagem e mutantes de *N. crassa* foi preparado segundo o protocolo de Weiland (1997). Para isso, o micélio congelado foi pulverizado com nitrogênio líquido e transferido para tubos eppendorf de 2 mL contendo 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0 e SDS 1%) e 500 µL de fenol saturado. Os tubos foram homogeneizados por aproximadamente 5 min em *vortex* e, em seguida, centrifugados a 16.000 x g/4°C/10 min. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e o DNA precipitado com 80 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram deixados a -20°C por aproximadamente 3 h e, posteriormente, centrifugados a 16.000 x g/4°C/10 min. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água e acrescentou-se igual volume de fenol saturado para a desproteinização das amostras. Os tubos novamente foram centrifugados (16.000 x g/4°C/10 min) e a fase aquosa transferida para tubo eppendorf limpo, e o DNA foi precipitado com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram deixados a -80°C por 15 min. Em seguida, os tubos foram centrifugados (16.000 x g/4°C/10 min) e o precipitado obtido foi lavado com 700 µL de etanol 70% por duas vezes. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água contendo 2 µL de RNase A (10 mg/mL) e incubado a 37°C por 30 min. A concentração do DNA foi determinada por absorbância a 260 nm e a sua pureza foi analisada pela relação das absorbâncias 260/280nm em espectrofotômetro Beckman.

12. Clonagem molecular das ORFs codificadoras dos fatores de transcrição

12.1. Biblioteca de cDNA

A biblioteca de cDNA de *N. crassa* (YpADE5) utilizada neste trabalho foi preparada anteriormente em nosso laboratório a partir da biblioteca em vetor λ (λADE5) através de excisão plasmidial. Para isso uma cultura de células de bactéria *E. coli* BNN132 foi infectada com a biblioteca, as células infectadas foram plaqueadas em meio contendo ampicilina e todas as colônias resistentes à ampicilina foram transferidas para frascos erlenmeyers com meio contendo ampicilina. Posteriormente a biblioteca foi obtida por maxi-extração de DNA plasmidial (DE PAULA et al., 2002).

12.2. Amplificação das ORFs que codificam as proteínas estudadas por PCR e Clonagem

Sequências de oligonucleotídeos foram desenhadas para a amplificação das ORFs NCU00090 (*pacC*), NCU03043 (*flbC*), NCU06205 (*rco-1*), NCU08807 (*cre-1*) e NCU09068 (*nit2*), como especificado na Tabela 1. Nas sequências dos oligonucleotídeos os códons de iniciação (AUG) e de término (UAA e UGA) da síntese protéica estão salientados em negrito. Os sítios correspondentes às enzimas de restrição (sublinhados) foram adicionados para facilitar a posterior subclonagem no vetor de expressão pET28a.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem molecular.

ORF	Proteína	Oligonucleotídeos	Sítio de restrição	Tamanho esperado
NCU03043	FlbC	3043-F: 5'- <u>CATATg</u> TCTTATCAATCgAgCCAg-3' 3043-R: 5'- <u>ggATCC</u> TT ATTCCgAgTgTTggCC-3'	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	1101 pb
NCU00090	PACC	90-F: 5'- <u>CATATg</u> TCgTCCACACCAgCCCAg-3' 90-R2*: 5'- <u>ggATCC</u> TT ACTTgTgAACTggAgCCTg-3'	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	639 pb
NCU06205	RCO-1	6205-F: 5'- <u>CATATg</u> TCCATgTATCCgCACCG-3' 6205-R: 5'- <u>CTCgAg</u> CT ATATCCgAgAgTAAgACC-3'	<i>NdeI</i> <i>XhoI</i>	1815 pb
NCU09068	NIT2	9068-F*: 5'- <u>CATATg</u> CAgggCgCAgCTggAAAC-3' 9068-R: 5'- <u>ggATCC</u> TT AgAgACTCATTgTgAgCC-3'	<i>NdeI</i> <i>BamHI</i>	927 pb
NCU08807	CRE-1	8807-F: 5'- <u>CATATg</u> CAACgCgTACAgTCAgCAg-3' 8807-R: 5'- <u>gAATTCTT</u> ACAACCggTCCATCATCTC -3'	<i>NdeI</i> <i>EcoRI</i>	1293 pb

*oligonucleotídeos desenhados para a produção da proteína truncada. Os nucleotídeos em negrito indicam o códon de iniciação (ATG) e término da transcrição (UAA e UGA).

Combinações dos oligonucleotídeos F e R foram usadas em reações de PCR, utilizando como molde a biblioteca de cDNA plasmidial YpADE5. As reações de amplificação foram realizadas com 1,5 µg da biblioteca de cDNA, 0,5 µL (1,25 U) da enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (Invitrogen), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão de PCR 10x, 1 µL de MgSO₄ 50 mM, 2 µL de dNTP (10 mM) e de *enhancer* 10x (Invitrogen). Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96°C/1 min), anelamento (52-62°C/1 min) e extensão (68°C/1,5 min), por 30 ciclos, num volume final de 50 µL de reação.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X (Tris 0,4 M, ácido acético glacial 0,2 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0)

contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL). Os fragmentos de tamanhos esperados foram excisados do gel e purificados com kit de resina (GeneClean II, MPBio). Após a purificação, foi feita a inserção dos fragmentos no vetor de clonagem pMOS-Blue (*Blunt Ended PCR Cloning* kit, GE Healthcare) e os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* DH10B. A seleção dos transformantes foi feita através do plaqueamento em meio de cultura 2YT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e cultivados a 37°C durante a noite. As colônias resultantes do crescimento foram submetidas à extração do DNA plasmidial. As construções plasmidiais foram confirmadas inicialmente por análise de restrição. Células dos clones positivos foram armazenadas à -80°C como cultura permanente em glicerol 16%.

12.3. Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes por PCR

Para a confirmação de que o nocaute das ORFs foi realmente realizado no genoma das linhagens mutantes, reações de amplificação por PCR foram feitas utilizando-se como molde o DNA genômico das linhagens selvagem (controle) e mutantes. Combinações dos mesmos oligonucleotídeos F e R específicos para cada ORF (Tabela 1) foram utilizadas. As condições das reações de PCR foram as mesmas descritas no subitem anterior, utilizando-se como molde cerca de 1 µg de DNA genômico. Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1%, e a imagem capturada pelo sistema de foto-documentação.

13. Preparo e transformação das células competentes de *E. coli*

Para o preparo das células competentes da linhagem DH10B de *E. coli*, células não competentes foram rejuvenescidas em 5 mL de meio 2YT e incubadas a 37°C/250 rpm, durante a noite. Após a obtenção de células jovens, 500 µL da cultura foi inoculada em 100 mL de meio 2YT e incubada a 37°C/250 rpm até uma densidade ótica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) estéreis a 700 x g/4°C/15 min. em microcentrífuga de mesa. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de CaCl₂ 100 mM gelada e estéril e dissolvidos em 8 mL de CaCl₂ 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas para as reações de transformação.

Para a transformação das células competentes, 5 ou 10 µL da reação de ligação de cada uma das construções no vetor pMOS (pMOS-Δ90, pMOS-3043, pMOS-6205, pMOS-8807 e pMOS-Δ9068) foram incubados em gelo por 30 min com 100 µL de células competentes. Em seguida, as suspensões foram submetidas ao choque térmico pela transferência para um

banho a 42°C por 2 minutos. Após o choque térmico, as suspensões foram adicionadas de 400 µL de meio 2YT e novamente incubadas a 37°C/60 min. Após este período as células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

14. Mini-extração de DNA plasmidial

Células de colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + 0,2% glicose e crescidas a 37°C durante a noite. O DNA plasmidial foi extraído pelo método de *boiling prep* descrito por Holmes e Quigley (1981), no qual cerca de 1,5 mL da cultura de células foram transferidos para tubos eppendorf de 1,5 mL, centrifugados a 14.000 rpm/1min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspensionado em 350 µL de solução STET (Tris 10 mM, pH 8,0, sacarose 8%, Triton X-100 0,5%, EDTA 50 mM, pH 8,0 e contendo 30 mg de lisozima). A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 40 seg, e imediatamente resfriada em freezer -20°C por 10 min. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 14.000 rpm/10 min/4°C.

Com uso de palitos de dente, o precipitado foi retirado e descartado, sendo que os ácidos nucleicos presentes no sobrenadante foram precipitados com 40 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 420 µL de isopropanol. A seguir, o material foi centrifugado a 14.000 rpm/15 min/4°C. O precipitado foi dissolvido em 100 µL de água pura e 100 µL de fenol saturado com tampão foi adicionado. Essa mistura foi vigorosamente agitada em *vortex* por 20 seg e, posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm/10min/4°C. Um volume de 80 µL da fase aquosa foi transferido para um tubo eppendorf novo e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 700 µL de etanol 70% gelado. O DNA foi dissolvido em 20 µL de água após secagem por aproximadamente 15 min ao ar.

15. Ensaios de produção e purificação das proteínas recombinantes

15.1. Subclonagem das ORFs em vetor de expressão

Os vetores de expressão utilizados foram o pET-28a (Novagen), o qual produz a proteína fusionada a uma cauda de seis resíduos de histidina e o vetor pGEX-4T1 (Amersham), o qual produz a proteína recombinante fusionada a GST. Os insertos existentes nas construções plasmidiais pMOS-Δ90 (produção da proteína truncada a partir do resíduo de aminoácido 213, portanto contém apenas a região N-terminal da proteína), pMOS-9068 (produção da proteína

truncada até o resíduo de aminoácido 727, portanto contém apenas a região C-terminal da proteína) e pMOS-8807 (proteína inteira) foram transferidos para os vetores de expressão da seguinte maneira: cassetes de DNA das ORFs NCU00090 (639 pb) e NCU09068 (927 pb) foram retirados do vetor pMOS-Blue por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e transferidos para o vetor de expressão pET28a, previamente digerido com as mesmas enzimas. Esses mesmos insertos também foram retirados do vetor pMOS-Blue por digestão com a enzima *BamHI* e transferidos para o vetor de expressão pGEX-4T1. O inserto NCU08807 (1.293 pb) foi retirado do vetor pMOS-Blue por digestão com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* e transferido para o vetor de expressão pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas. As construções plasmidiais pMOS-3043 e pMOS-6205 passaram a ser utilizadas por outros alunos de Mestrado.

Os produtos de ligação foram usados para transformar células de *E. coli*, conforme descrito no item 13. A seleção dos transformantes foi realizada através do plaqueamento em meio de cultura 2YT + 0,2% glicose, suplementado com 100 µg/mL de canamicina (construção pET28a) e 100 µg/mL de ampicilina (construção pGEX-4T1). Os clones positivos foram submetidos a uma análise de restrição prévia e escolhidos para a transformação da linhagem de *E. coli* BL21 e/ou Rosetta produtora. As construções plasmidiais resultantes (pET-Δ90, pET-Δ9068, pET-8807, pGEX-Δ90 e pGEX-Δ9068) foram confirmadas por sequenciamento automático de DNA no Serviço de Sequenciamento de DNA existente no IQ, USP, SP.

15.2. Ensaio de indução e análise de solubilidade

Células de *E. coli* BL21 e/ou Rosetta competentes foram transformadas separadamente com 1 µL das construções plasmidiais pET28a (controle), pET-Δ90, pET-Δ9068, pET-8807, pGEX-4T1 (controle), pGEX-Δ90 e pGEX-Δ9068, e posteriormente plaqueadas em meio 2YT + 0,2% glicose suplementado com o respectivo antibiótico. Colônias isoladas de cada transformação foram utilizadas nos ensaios de produção das proteínas recombinantes. Inicialmente, as células foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + 0,2% glicose contendo o antibiótico adequado, e incubadas a 37°C/200 rpm/16 h. Esta cultura foi usada como pré-inóculo e 1 mL dele foi inoculado em 50 mL de meio 2YT + 0,2% glicose, nas mesmas condições acima até atingir uma DO_{600nm} = 0,6-0,8. Uma alíquota de 2 mL de amostra não-induzida (NI) foi retirada e as células coletadas a 14.000 rpm/4°C/2 min. Posteriormente, a produção das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM. As células foram incubadas a 37°C/250 rpm/4 h e ao final da indução, as células foram coletadas por centrifugação (20.000 rpm/4°C/2 min).

O precipitado de células foi ressuspenso em 10 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 20 mM; glicerol 5%; 0,5% Tween-20; 0,5% Triton x-100, acrescido de EDTA 5 mM,

PMSF 1 mM e benzamidina 10 mM) e armazenadas a -20°C. Posteriormente as células foram lisadas em sonicador (SONICS, Vibra Cell) com 3 pulsos de 10 seg e intervalos de 30 seg no gelo (potência 30%). O lisado celular foi centrifugado a 30.000 x g/10 min/4°C e o sobrenadante recolhido em tubo limpo. O precipitado foi ressuspenso em 3 mL do mesmo tampão de lise, assim como também as células não-induzidas (NI) (200 µL).

Aproximadamente 15 µL do extrato total das amostras NI (não-induzida), S (sobrenadante) e P (precipitado) foram separados por SDS-PAGE em gel 12% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 100 V durante 2-3 horas, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

15.2.1. Confirmação por *Western blot*

Para a confirmação da produção das proteínas recombinantes, ensaios de *Western blot* foram realizados. Após o fracionamento por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um sistema Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell (BioRad) usando um tampão de transferência (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicina 150 mM, metanol 20%) durante 2 h a 100 V/250 mA. A membrana foi então incubada com uma solução de 5% de leite em pó desnatado em tampão 1X TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, tween-20 0,05%) durante 16 h para permitir o bloqueio da mesma. Após esse período, a membrana foi lavada com 1X TBST (3 vezes/5 min) e incubada com anticorpo monoclonal anti-poli-histidina conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1:10.000 em 1X TBST + 3% leite) durante 2 h à temperatura ambiente, para a detecção de proteínas fusionadas à poli-His (construções baseadas no vetor pET28a).

Para a detecção das proteínas fusionadas à GST, a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-GST (IgG coelho) (diluição 1:5.000 em 1X TBST + 3% leite) durante 2 h a temperatura ambiente, lavada com 1X TBST três vezes (5 min cada lavagem) e incubada com anticorpo secundário anti-IgG (coelho) conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1:30.000 em 1X TBST + 3% leite) por 2 h à temperatura ambiente.

As membranas foram reveladas em 10 mL de tampão bicarbonato (NaHCO₃ 100 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 9,8) adicionado de 100 µL NBT (cloreto p-nitrozul de tetrazólio) (30 mg/mL em 70% DMF) e 100 µL BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina) (15 mg/mL em DMF).

15.3. Produção de proteínas recombinantes

As células de *E. coli* BL21 expressando a proteína His-ΔPACC foram crescidas em 200 mL de meio 2YT + 0,2% glicose suplementado com canamicina (100 µg/µL) e cloranfenicol (34 µg/µL) para a produção da proteína em pequena escala. As células de *E. coli* Rosetta

expressando as proteínas His- Δ NIT2 e His-CRE-1 (e também His- Δ PACC) foram crescidas em 1 L de meio 2YT + 0,2% glicose suplementado com canamicina (100 μ g/ μ L) e cloranfenicol (34 μ g/ μ L) para a produção de proteínas em maior escala. A produção das proteínas recombinantes foi induzida (após as células atingirem uma DO_{600nm} = 0,6-0,8) pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM. As células foram incubadas a 37°C/250 rpm/4 h. Após indução as células foram coletadas a 20.000 rpm/4 °C/2 min.

15.4. Purificação das proteínas recombinantes

Diferentes procedimentos cromatográficos foram usados para a purificação das proteínas recombinantes, os quais são descritos a seguir:

15.4.1. Purificação de proteína recombinante em pequena escala

Para a purificação da proteína recombinante His- Δ PACC em pequena escala, o precipitado de células foi ressuspenso em 2 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,01%) acrescentado de uma mistura de inibidores de protease (PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM, antipaína, pepstatina A, leupeptina e benzamidina 5 μ g/mL cada). As células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N₂ líquido e banho de água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonicador (5 ciclos de 10 seg, com intervalos de 1 min em banho de gelo) e o sobrenadante recolhido após centrifugação (14.000 rpm/4 °C/20 min). A proteína recombinante contida no sobrenadante foi purificada por cromatografia de afinidade em resina de Ni-NTA-agarose (200 μ L) (Qiagen) na bancada. Inicialmente, a resina foi condicionada através de sucessivas lavagens em tampão de lavagem gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10% v/v, contendo inibidores de protease). Posteriormente, a resina condicionada foi adicionada a todo o conteúdo do sobrenadante (aproximadamente 2 mL), o qual foi homogeneizado manualmente e incubado a 4°C durante 1 h, sob agitação suave. Após o tempo, a resina foi sedimentada e o sobrenadante separado (amostra FT1 – *flow through*). A resina foi lavada quatro vezes com tampão de lavagem e todas as frações das lavagens foram reservadas em um só tubo (FT2 – *flow through*). As proteínas ligadas à resina foram eluídas em 100 e 300 mM de imidazol preparado em tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 0,1-0,3 M, glicerol 10% v/v, contendo inibidores de protease) e dialisadas contra 1 L de tampão de diálise (Tris-HCl 10 mM, pH 7,9, KCl 100 mM, glicerol 20% v/v, EDTA 1 mM e DTT 0,5 mM) por 16 h, com duas trocas do tampão de diálise, utilizando-se o sistema de diálise Slide-A-Lyser Dialysis Cassete (PIERCE). As proteínas dialisadas foram centrifugadas (14.000 rpm/20 min/4°C) para a remoção de eventuais precipitados. As frações da cromatografia foram

quantificadas em seus conteúdos protéicos através do método descrito por Hartree (1972). As frações puras foram aliquotadas e armazenadas a -80°C.

15.4.2. Purificação em maior escala

Para a purificação de His- Δ PACC, His-CRE-1 e His- Δ NIT2 o precipitado de células foi ressuspenso em 30-60 mL de tampão de lise Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 50 mM, glicerol 10%, Triton X-100, 0,1%) ou tampão de lise PBS (PBS 2X, NaCl 500 mM, imidazol 80 mM, glicerol 5%, tween-20 0,5%, triton x-100 0,5%) acrescentado de uma mistura de inibidores de protease (PMSF 0,5 mM, benzamidina 25 mM e NaF 50 mM). As células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N₂ líquido e banho de água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonicador (5 ciclos de 30 seg, com intervalos de 30 seg em banho de gelo) e o sobrenadante recolhido após centrifugação (30.000 x g/4 °C/30 min). As proteínas recombinantes contidas no sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de Niquel His-Trap (1 mL) (GE Healthcare) em aparelho de purificação AKTA Prime (Amersham). As proteínas foram eluídas em um gradiente linear de 0,5 a 1,5 M de imidazol preparado no mesmo tampão de homogeneização sem os detergentes, e analisadas em géis de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 200 V durante 1 hora, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

Para a síntese de anticorpos, as proteínas foram dialisadas contra 1L de tampão (Tris-HCl 10 mM, pH 7,0, NaCl 10 mM), por 48 h com cinco trocas do tampão de diálise. Para os ensaios de EMSA, as proteínas recombinantes foram dializadas em tampão de diálise (Tris-HCl 10 mM (ou PBS 1X), pH 7,9, KCl 100 mM, glicerol 20% v/v, EDTA 1 mM e DTT 0,5 mM) por 16 h, com duas trocas desse tampão. As proteínas dialisadas foram centrifugadas (14.000 rpm/4°C/20 min) para a remoção de eventuais precipitados. Todas as frações da cromatografia foram quantificadas em seus conteúdos protéicos através do método descrito por Hartree (1972). As frações puras foram aliquotadas e armazenadas a -80°C.

16. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Também conhecido como ensaio de mobilidade em gel, os ensaios de EMSA foram realizados com as proteínas recombinantes His- Δ PACC, His-CRE-1 e His- Δ NIT2 de *N. crassa*. Além disso, proteínas presentes em extrato bruto de micélios crescidos em condições fisiológicas normais e submetidos ao estresse de pH alcalino (7,8) foram utilizadas nos ensaios

de EMSA. Fragmentos de DNA marcados (sondas) contendo os motifs de DNA para as proteínas PacC, Mig1/CRE-1 e NIT2 foram testados.

16.1. Condições de crescimento e estresse de pH em *N. crassa*

Uma suspensão de conídios da linhagem selvagem (aproximadamente 10^9 células/mL) foi inoculada em 2 L de meio VM líquido (pH 5,8) e colocada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, e rapidamente dividido em duas amostras. Uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, pH 5,8) e a outra amostra foi transferida para um frasco contendo 500 mL de meio VM líquido nos pH 7,8 e incubada por 1 h a 30°C (estresse de pH). Os micélios foram armazenados a -80°C.

16.2. Preparo do extrato bruto protéico e fracionamento

Cerca de 10 g do micélio crescido em condições fisiológicas normais (pH 5,8, controle) e submetido a estresse de pH alcalino (pH 7,8, 1 h) foram macerados em nitrogênio líquido. Em seguida, o pó foi transferido para um tubo falcon de 15 mL contendo 10 mL de tampão de lise (HEPES 15 mM, pH 7,9; KCl 500 mM; EDTA 0,5 mM pH 8,0; $MgCl_2$ 5 mM; benzamidina 25 mM, DTT 1 mM; PMSF 0,5 mM; NaF 50 mM; antipain e pepstatina A 10 $\mu g/\mu L$ de; glicerol 10% (v/v)) e homogeneizado com *glass beads* em *vortex* (8 pulsos de 30 seg x 30 seg no gelo). A solução protéica foi separada das *glass beads* por centrifugação (4.000 rpm/4°C/2 min), transferida para tubos eppendorfs limpos de 2 mL e centrifugada a 14.000 rpm/4°C/15 min. O sobrenadante foi dialisado contra tampão D (HEPES 15 mM, pH 7.9, KCl 100 mM, EDTA 1 mM, glicerol 15%) por 2 h e submetido a uma purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Heparina-Sepharose (5 mL) (GE Healthcare) em aparelho de purificação AKTA Prime (Amersham). As proteínas foram eluídas em um gradiente linear de 0,1 a 1,5 M de KCl preparado em tampão D de coluna gelado. As frações coletadas foram dializadas duas vezes em tampão D, e reservadas para serem testadas quanto à capacidade de ligação com sonda de DNA específica.

16.3. Preparo de sondas de DNA

Como sondas de DNA, foram utilizados segmentos da região 5'-flanqueadora dos genes *gsn* e *cre-1*, contendo elementos regulatórios de DNA específicos para ligação de fatores de transcrição. As sondas foram obtidas por PCR e/ou digestão com endonucleases de restrição.

16.3.1. Preparo das sondas *pacC*, *cre-1* e *nit2* para analisar os elementos de DNA presentes na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*

Para o preparo da sonda *pacC* contendo o *motif* 5'-GCCARG-3' (PacC), um fragmento de DNA de 146 pb foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos PacC-F e GSN-RP3, descritos na Tabela 2. Para o preparo da sonda *cre-1*, contendo o *motif* 5'-SYGGRG-3', um fragmento de DNA de 134 pb foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos XLNR-FP2 e XLNR-RP2 (Tabela 2). Para o preparo da sonda *nit2* contendo o *motif* 5'-GATA-3' (*nit2*) e dois *motifs* 5'-SYGGRG-3' (CreA), um fragmento de DNA de 377 pb foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos GSN-FP4 e GSN-RP2 (Tabela 2) e digerido com a enzima *Bam*HI, liberando um fragmento de 134 pb, o qual foi utilizado como sonda.

Para todas as sondas, foi utilizado como molde, o clone plasmidial IV9A-1 (*GenBank* # AF417205) que contém a sequência 5'-flanqueadora do gene *gsn*, disponível no laboratório. As reações de amplificação foram realizadas na presença de 0,5 µL de α -[³²P]dATP (10⁴ cpm), 1,0 µg de DNA, 0,5 µL enzima *Taq* Polimerase (*Invitrogen*), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão de PCR 10x, 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP (10 mM). Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96°C/1 min), anelamento (50-55°C/1 min) e extensão (72°C/1 min), por 39 ciclos, num volume final de 50 µL de reação.

Para a purificação das sondas de DNA, as reações de PCR foram inicialmente precipitadas com 1/10 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e 500 µL etanol absoluto gelado, e purificadas após eletroforese em gel de agarose 2% *low melting point* (Sigma) em TAE 1X. Para isto, os fragmentos específicos foram excisados dos géis e transferidos para tubos eppendorf de 1,5 mL, os quais foram aquecidos a 70°C por 15 min para o derretimento do gel. Adicionou-se ao tubo cerca de 200 µL de fenol, o qual foi rapidamente homogeneizado em *vortex* por 30 seg. Os tubos foram centrifugados a 13.000 rpm/5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado de 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Os tubos foram novamente centrifugados a 13.000 rpm/5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o fragmento de DNA precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e 500 µL etanol absoluto gelado. Os tubos foram deixados a -80°C durante a noite e centrifugados (14.000 x g/4°C/30 min). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuspenso em 50 µL de água. Após total ressusensão, a radioatividade incorporada às sondas foi medida por cintilação líquida em um cintilador Beckman LS6500. A concentração do DNA foi determinada por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para o preparo das sondas para EMSA.

Oligonucleotídeo	Seqüência	Fonte	Nome	Posição
PacC-F	5'-GACCCAACAGCCCAACTT-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>pacC</i>	-1918 ao -1901
GSN-RP3	5'-GCAACGAATACTCCCATG-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>pacC</i>	-1789 ao -1806
XLNR-F2	5'-TGAGGGTGAGAAAGTTGC-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>cre-1</i>	-2173 ao -2156
XLNR-R2	5'-TATTCTGCAACGGAAGTCC-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>cre-1</i>	-2034 ao -2053
GSN-FP4	5'-CTGATTGGGAAAGTCCAGA-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>nit2</i>	-1645 ao -1626
GSN-RP2	5'-CTGTTGACCTGCGTTAAC-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>nit2</i>	-1269 ao -1286
pCRE1-F	5'-GCAACGGAGTCTGAACCC-3'	Promotor <i>cre1</i>	sonda <i>pcre-1</i>	-1226 ao -1209
pCRE1-R	5'-CAATACAATACGCAGCAC-3'	Promotor <i>cre1</i>	sonda <i>pcre-1</i>	-1056 ao -1073
mPacC-F	5'-GCCGTCTTTGGGCCAG AAATT ACGTGAGATCGGGCCCGC-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>mpacC</i>	-1828 ao -1790
mPacC-R	5'-GCGGGCCCGATCTCACGT AATTT CTGGCCCAAAGACGGC-3'	Promotor <i>gsn</i>	sonda <i>mpacC</i>	-1790 ao -1828
pGSN-F	5'-TTGGAAGACGGGACC-3'	Promotor <i>gsn</i>	–	-2386 ao -2370
HSE-F	5'-GGGGAATTTGTGGCTGA-3'	Promotor <i>gsn</i>	–	-2087 ao -2071
OligoPacC-F	5'-CTTTGGGCCAGCTTGCCGTGAGATCG-3'	Promotor <i>gsn</i>	Oligo <i>pacC</i>	-1823 ao -1797
OligoPacC-R	5'-CGATCTCACGGCCAAGCTGGCCCAAAG-3'	Promotor <i>gsn</i>	Oligo <i>pacC</i>	-1797 ao -1823
OligoNIT2-F	5'-GAGGACCCTCCGTAGATAATACTTAC-3'	Promotor <i>gsn</i>	Oligo <i>nit2</i>	-1575 ao -1548
OligoNIT2-R	5'-GTAAGTATATTATCTACGGAGGGTCTC-5'	Promotor <i>gsn</i>	Oligo <i>nit2</i>	-1548 ao -1575

A posição de cada oligonucleotídeo na região promotora dos genes é dada de acordo com a numeração do primeiro códon de tradução (ATG). Os nucleotídeos mutados no *motif pacC* estão em negrito.

16.3.2. Preparo da sonda *pcre-1* para analisar os elementos de DNA (*cre-1*) presentes na região 5'-flanqueadora do gene *cre-1*

Para o preparo da sonda *pcre-1* contendo três *motifs* 5'- SYGGRG -3' presentes na região 5'-flanqueadora do gene *cre-1*, um fragmento de DNA de 171 pb foi amplificado utilizando-se os oligonucleotídeos pCRE1-F e pCRE1-R (Tabela 2). Utilizou-se como molde o DNA genômico da linhagem selvagem de *N. crassa*. A reação de PCR e a purificação da sonda foram realizadas nas mesmas condições descritas no subitem anterior.

16.3.3. Preparo da sonda contendo o elemento PacC mutado (*mpacC*)

A especificidade da ligação DNA-proteína para o elemento PacC também foi analisada utilizando-se uma sonda de DNA carregando o *motif* PacC mutado (sonda *mpacC*), na qual foi alterada a sequência 5'-CTTGGC-3' contida no promotor *gsn* pela sequência 5'-AAATTA-3', através da técnica de mutagênese sítio-dirigida, utilizando PCR em duas etapas (AUSUBEL et al., 1996).

Na primeira etapa (PCR 1) foram usados os oligonucleotídeos mPacC-F e mPacC-R para introduzir as mutações (Tabela 2, nucleotídeos em negrito). Um fragmento de DNA de 560 bp foi amplificado a partir do clone IV9A-1 utilizando os oligonucleotídeos mPacC-F e GSN-RP2. Outro fragmento de DNA, contendo aproximadamente 600 bp também foi amplificado, utilizando-se os oligonucleotídeos pGSN-F e mPacC-R. As reações de PCR foram realizadas utilizando 1,5 µg de DNA, 0,5 µL (1,25U) da enzima *Taq DNA Polimerase* (Invitrogen), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão de PCR 10x, 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP (10 mM). Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96°C/1 min), anelamento (62°C/1 min) e extensão (72°C/1,5 min), por 39 ciclos, num volume final de 50 µL de reação. Os fragmentos amplificados foram isolados, purificados, dosados e misturados em quantidades equimolares em tubo eppendorf limpo. A mistura de fragmentos de DNA foi desnaturada a 95°C/5 min e deixada esfriar a temperatura ambiente, a fim de favorecer o anelamento das fitas de DNA complementares. As fitas aneladas carregando o elemento PacC mutado foram estendidas a 72°C/5 min, adicionando-se previamente à reação uma mistura de dNTPs e a enzima *Taq DNA polimerase* (Invitrogen). Na segunda etapa (PCR 2), os oligonucleotídeos HSE-F e GSN-RP3, localizados internamente ao fragmento de DNA amplificado no PCR1, foram usados para amplificar um fragmento de 315 bp, o qual foi subclonado no vetor pMOSBlue (pMOS-mPacC) e posteriormente, seqüenciado. A sonda *mpacC* de 146 bp foi isolada do plasmídeo pMOS-mPacC após amplificação com os oligonucleotídeos PacC-F e GSN-RP3, do mesmo modo que o procedimento descrito no item 16.3.1.

16.3.4. Competidores específicos e inespecíficos para a sonda utilizada

Competidores específicos para as sondas acima mencionadas (exceto para a sonda *mpacC*) foram preparados da mesma maneira, porém sem sofrer marcação radiativa. Os mesmos oligonucleotídeos descritos para cada sonda foram utilizados para a amplificação dos respectivos competidores específicos (CE). Como competidor inespecífico, foi utilizado o copolímero poli(dI-dC)•(dI-dC) (GE Healthcare).

Oligonucleotídeos OligoPacC e OligoNIT2 complementares (27 e 28 pb, respectivamente) também foram usados para preparar competidores específicos para os elementos PacC e NIT2, após terem sido anelados por meio da desnaturação e renaturação gradativa dos oligonucleotídeos OligoPacC-F/OligoPacC-R e OligoNIT2-F/OligoNIT2-R (Tabela 2). A verificação do anelamento foi feita por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não-desnaturante 15%, em tampão TBE 1X. Após eletroforese, o gel foi corado com azul de metileno (100 mg/mL). Tanto os competidores específicos como os oligonucleotídeos dupla-fita anelados foram quantificados através da absorbância a 260 nm antes de serem usados como competidores nos ensaios de EMSA.

16.4. Ensaio de mobilidade em gel

A interação DNA-proteína foi realizada em 30-100 µL de uma mistura de reação contendo tampão de ligação 1X (HEPES 125 mM, pH 7,9, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0, glicerol 50% (v/v)) contendo uma mistura de inibidores de protease (DTT 0,05 mM, PMSF 0,025 mM, benzamidina 5 µg/mL, antipaina A 5 µg/mL, pepstatina 5 µg/mL, NaF 5 µg/mL), 2 µg/reação de poli(dI-dC)•(dI-dC) e de 2,0-10,0 µg das proteínas recombinantes ou 20-60 µg do extrato proteico bruto. Numa primeira etapa da reação, diferentes concentrações de proteína foram testadas em tampão de ligação à temperatura ambiente adicionadas de 0,6 ng de sonda marcada (10⁴cpm) durante 20 min. Para os ensaios de competição, o competidor específico ou o oligonucleotídeo dupla fita foi adicionado à reação de ligação 10 minutos antes da adição da sonda marcada. O competidor específico foi adicionado em um excesso molar de 10 a 40X superior à concentração de sonda, enquanto que o oligonucleotídeo dupla-fita foi adicionado em um excesso molar de 1 a 30X. Para o ensaio de *supershift*, 5 a 20 µL do anticorpo policlonal α-PACC (IgG coelho) (Proteimax, Cotia-SP) (titulação 1:2000) foi misturado à proteína PACC recombinante 10 minutos antes da adição da sonda *pacC*. Após incubação com a sonda, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 4-5% (29:1) não desnaturante, em tampão TBE 0,5X (300 V, 10 mA, 12°C). O gel foi seco e autoradiografado em filme Kodak T-Mat G/RA.

17. Análise da expressão da proteína PACC por *Western blot*

Conídios da linhagem selvagem foram utilizados em experimentos de estresse de pH alcalino para avaliação da expressão da proteína PACC em *N. crassa*. Uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^9 células/mL) foi inoculada em 1 L de meio VM líquido (pH 5,8) e colocada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, e rapidamente dividido em duas amostras. Uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, não submetida a estresse de pH) e a outra amostra foi transferida para um frasco contendo 500 mL de meio VM líquido no pH 7,8 e incubada a 30°C (estresse de pH). Amostras de micélio foram retiradas após 1, 2, 3 e 4 h de incubação. Cerca de 10 g de micélio foram pulverizados em nitrogênio líquido. Em seguida, o material foi transferido para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de solução tampão gelada (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, TLCK 2 mM, aprotinina 1 µg/mL e pepstatina A 1 µg/mL). A mistura foi fortemente agitada em *vortex* e, em seguida, centrifugada a $10.000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi recolhido em um tubo eppendorf novo. Uma alíquota foi utilizada para a determinação das proteínas totais do extrato celular pelo método de Hartree modificado (HARTREE, 1972).

Para a análise da expressão da proteína PACC ensaios de *Western blot* foram realizados. Aproximadamente 100 µg do extrato protéico foram fracionados por eletroforese e transferidos para membrana de nitrocelulose nas mesmas condições descritas no subitem 15.2.1. A membrana foi incubada com anticorpo primário policlonal α -PACC (IgG coelho) na diluição 1:500 em 1X TBST + 3% leite, por 2 h em temperatura ambiente. Após lavagem da membrana em 1X TBST, adicionou-se um anticorpo secundário anti-IgG (coelho) conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:15.000 em 1X TBST + 3% leite) por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada em 1X TBST.

As membranas foram deixadas durante 40 seg em contato com 5 mL de solução reveladora (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5, ácido p-cumárico 0,2 mM) contendo 1,2 mM de luminol (Sigma) e 1,5 µL de H_2O_2 , e rapidamente expostas ao filme de raio X (20 seg).

Para facilitar a descrição dos resultados obtidos, a seção Resultados foi dividida em três partes: a que relata a seleção e a identificação de fatores de transcrição possivelmente envolvidos no metabolismo do glicogênio em *N. crassa* (Parte1); a que descreve a caracterização funcional do fator de transcrição PACC (Parte 2); e a caracterização funcional preliminar dos fatores de transcrição NIT2 e CRE-1 (Parte 3).

Resultados - Parte 1

1. Identificação de fatores de transcrição envolvidos no metabolismo de glicogênio

Visando estudar o modo pelo qual o processo de regulação do metabolismo de glicogênio é desencadeado no fungo *N. crassa*, experimentos foram iniciados com o objetivo de identificar fatores de transcrição que estariam participando, de forma direta ou indireta, no controle do metabolismo desse carboidrato na condição normal de crescimento e na condição de choque térmico. Assim uma coleção de linhagens mutantes em fatores de transcrição foi analisada sistematicamente nas duas situações. O total de famílias dos fatores de transcrição trabalhados, juntamente com o total de linhagens pertencentes a elas está representado na figura 5.

1.1. Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes de *N. crassa* antes e depois do choque térmico

Todas as linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem foram analisadas durante o crescimento vegetativo na temperatura normal (30°C) e após submissão ao choque térmico (transferência de 30°C para 45°C). Os micélios obtidos de cada linhagem, nas diferentes condições, foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio. A dosagem de glicogênio presente nos extratos celulares foi feita por meio da determinação da glicose liberada pela digestão com α -amilase e amiloglicosidase em relação à quantidade de proteína presente no extrato protéico. Essa relação foi dada em μ g de glicogênio por mg de proteínas.

Das 69 linhagens analisadas, 62 apresentaram o conteúdo de glicogênio semelhante ao perfil já conhecido da linhagem selvagem, ou seja, uma redução do conteúdo de glicogênio quando a amostra é submetida ao choque térmico (DE PAULA et al., 2002) e 7 linhagens apresentaram um perfil de conteúdo de glicogênio diferente da linhagem selvagem, tanto na condição normal de crescimento quanto após choque térmico. Estas

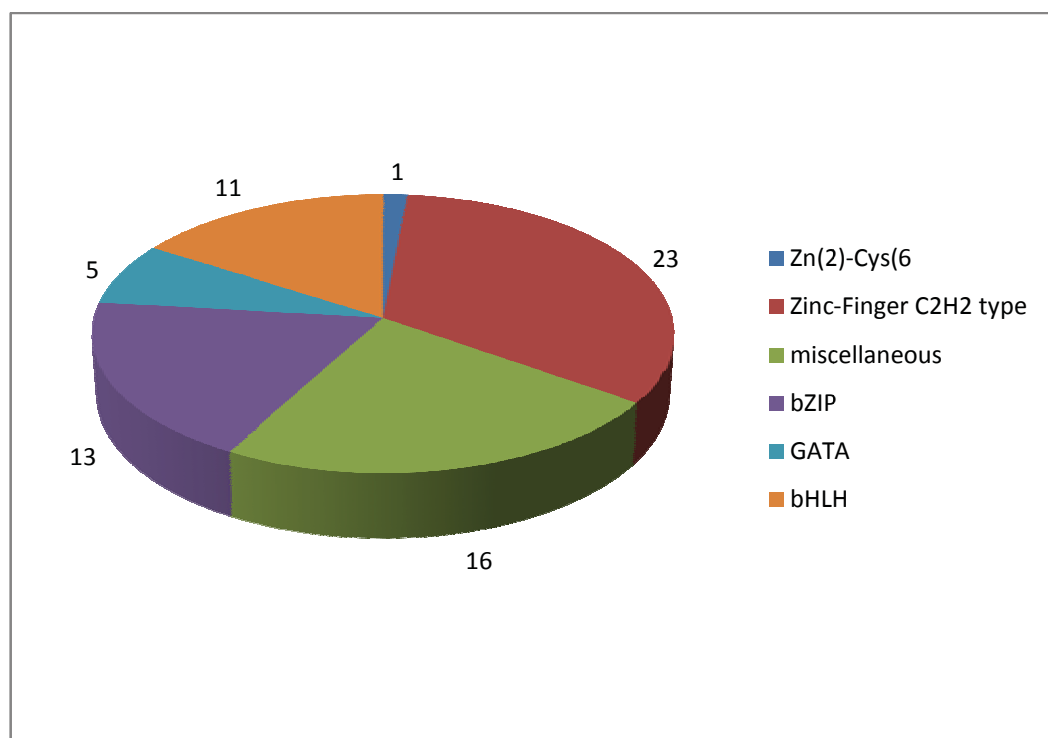


Figura 5 – Representação esquemática do número total de linhagens mutantes utilizadas no trabalho, divididas de acordo com a família do fator de transcrição cuja ORF foi nocauteada.

foram submetidas a mais duas repetições adicionais do experimento (obtenção de novos micélios e novo experimento de choque térmico) para a confirmação dos resultados. As médias dos valores de conteúdo de glicogênio das linhagens selecionadas estão representadas na figura 6. Analisando os perfis obtidos verificamos os seguintes resultados:

- uma linhagem (FGSC#11392) apresentou um conteúdo de glicogênio muito acima ao acumulado pela linhagem selvagem, tanto antes quanto após o choque térmico;
- uma linhagem (FGSC#11397) apresentou conteúdos de glicogênio iguais antes e após choque térmico;
- uma linhagem (FGSC#11371) apresentou o conteúdo de glicogênio após choque térmico levemente reduzido;
- uma linhagem (FGSC#11342) mostrou uma redução bastante acentuada do conteúdo de glicogênio após choque térmico;
- três linhagens (FGSC#11355, FGSC#11437 e FGSC#11348) mostraram o mesmo perfil da linhagem selvagem, porém os valores absolutos do conteúdo de glicogênio foram muito superiores a ela.

1.2. Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* por *Northern blot*

As sete linhagens selecionadas pelo acúmulo de glicogênio diferenciado em relação à linhagem selvagem foram submetidas à análise da expressão dos genes que codificam a glicogênio sintase (*gsn*) e a glicogênio fosforilase (*gpn*) por meio da técnica de *Northern blot*, utilizando-se o RNA ribossômico 18S como controle endógeno. O objetivo desse experimento foi verificar se o padrão de acúmulo de glicogênio antes e depois do choque térmico apresentado pelas linhagens mutantes poderia ser correlacionado à expressão diferenciada dos genes *gsn* e *gpn*, bem como levantar hipóteses se o fator de transcrição ausente em cada linhagem poderia estar envolvido com a regulação da expressão dos mesmos.

Pelo menos quatro experimentos independentes foram realizados com as linhagens selecionadas para a confirmação dos dados. A figura 7A mostra o padrão de expressão dos genes *gsn* e *gpn* nessas linhagens, tendo-se a linhagem selvagem (WT) como controle. Apenas uma única banda de hibridização de aproximadamente 3,0 kb foi observada para cada transcrito, correspondendo aos tamanhos esperados dos mRNAs da glicogênio sintase e da glicogênio fosforilase. A figura mostra, para a linhagem selvagem, uma redução acentuada na transcrição dos genes *gsn* e *gpn* após o choque térmico. Analisando os perfis de expressão das diferentes linhagens podemos notar que o perfil transcricional do gene *gsn* em seis linhagens mutantes (FGSC#11348, FGSC#11397, FGSC#11437,

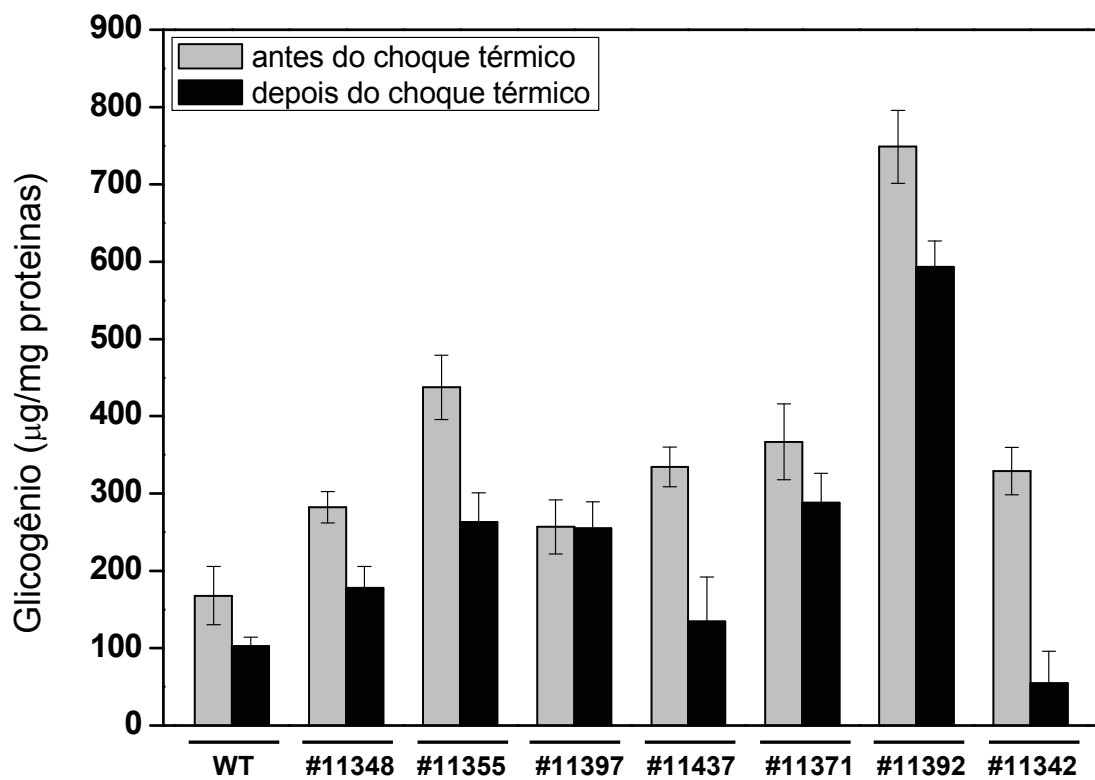
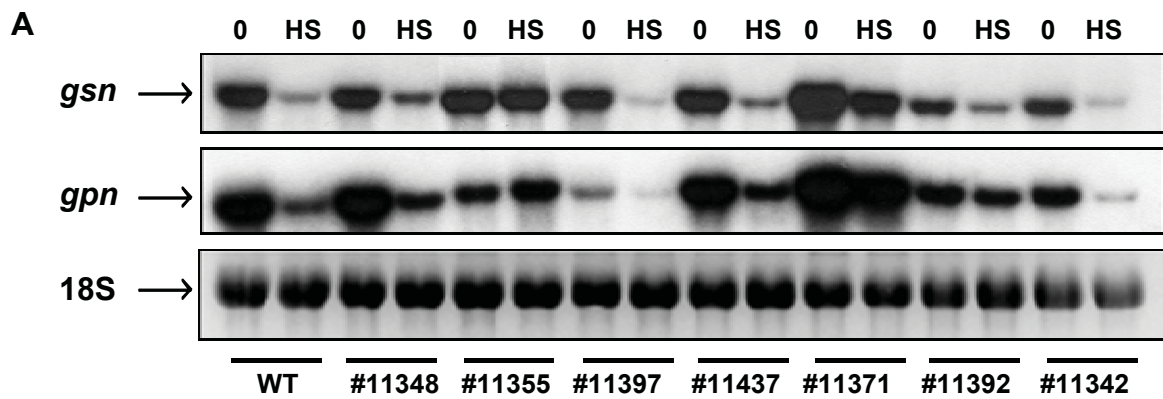
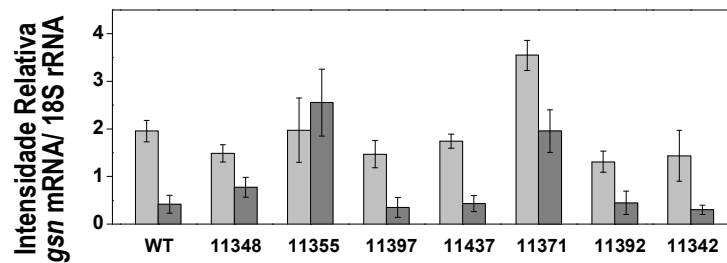


Figura 6 – Concentração de glicogênio nas linhagens selvagem (WT) e mutantes selecionadas. As amostras foram crescidas em meio VM a 30°C durante 24 h e transferidas para meio VM pré-aquecido a 45°C. O conteúdo de glicogênio foi quantificado antes e após choque térmico, como descrito em Materiais e Métodos.



B



C

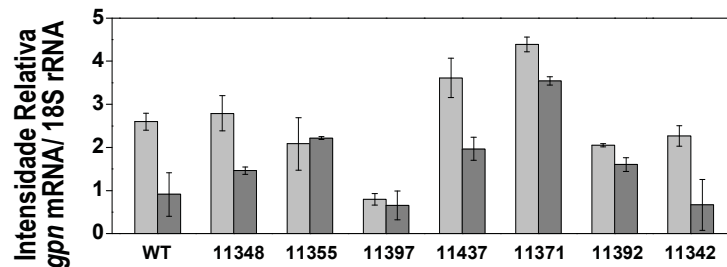


Figura 7 – Expressão dos genes *gsn* e *gpn* antes e depois do choque térmico nas linhagens selvagem e mutantes selecionadas. Os micélios foram crescidos em meio VM a 30°C/24 h (0, antes do choque térmico) e transferidas para meio a 45°C/30 min (HS, *heat shock*). Amostras de RNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído e transferidas a uma membrana de nylon neutra. Fragmentos dos genes *gsn* e *gpn*, marcados radiativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP foram utilizados como sonda. **(A)** Autoradiografia das membranas. Bandas de hibridização, antes e depois do choque térmico, respectivamente, de cada linhagem identificada com seu respectivo número do FGSC. O perfil do rRNA 18S foi visualizado com brometo de etídio. **(B)** Normalização da expressão do gene *gsn* utilizando o software ImageJ. **(C)** Normalização da expressão do gene *gpn* utilizando o software ImageJ.

FGSC#11371, FGSC#11392 e FGSC#11342) foi aproximadamente semelhante ao apresentado pela linhagem selvagem, ou seja, redução do transcrito *gsn* quando o micélio foi submetido ao choque térmico, porém, com alguma variação na intensidade. A transcrição do gene *gpn* também diminuiu consideravelmente, após choque térmico, nas linhagens selvagem e mutantes FGSC#11348, FGSC#11437, FGSC#11371 e FGSC#11342, cada qual com uma variação diferente na expressão do gene.

Algumas linhagens se destacaram nessa análise: a linhagem FGSC#11397 não apresentou diferenças no conteúdo de glicogênio nas duas condições (figura 5), mas mostrou a expressão do gene *gsn* reduzida após choque térmico e uma baixa expressão do gene *gpn* nas duas situações. A linhagem FGSC#11392 apresentou hiper acúmulo de glicogênio (cerca de quatro vezes mais que na linhagem selvagem) tanto antes quanto após choque térmico, entretanto o nível de expressão dos dois genes foi reduzido nas duas situações. A linhagem FGSC#11355 foi a que apresentou os resultados mais interessantes na análise de expressão gênica. Os níveis de glicogênio acumulados foram superiores à linhagem selvagem, mas houve uma redução após choque térmico, como na linhagem selvagem. Entretanto, não houve redução do nível transcripcional de ambos os genes *gsn* e *gpn* após o choque térmico, ou seja, o nível de expressão foi o mesmo tanto antes quanto após o estresse térmico. Chama atenção os altos níveis de expressão mostrados pela linhagem FGSC#11371.

1.3. Análise das características bioquímicas e estruturais dos fatores de transcrição selecionados

Após a seleção das linhagens mutantes pelo perfil de acúmulo de glicogênio diferenciado, as sequências nucleotídicas, assim como as sequências polipeptídicas deduzidas dos fatores de transcrição nocauteados nessas linhagens foram obtidas no banco de dados do genoma de *N. crassa*. Foram utilizadas ferramentas de bioinformática disponíveis na internet para a caracterização bioquímica e estrutural dessas proteínas regulatórias, tais como o ponto isoelétrico (pI), massa molecular teórica (MM), presença de domínios protéicos conhecidos e sinais de localização nuclear clássicos (NLS).

A Tabela 3 mostra os dados bioquímicos obtidos por predição teórica das proteínas selecionadas. Em linhas gerais, o número de resíduos de aminoácidos dos fatores de transcrição varia de 287 a 1036, portanto uma massa molecular (MM) variando de 31,2 a 109,3 kDa. Já o ponto isoelétrico (pI) dessas proteínas varia de 5,26 a 8,99. Utilizando a ferramenta PSORTII, uma série de sinais de localização clássicos (NLS – Nuclear Localization Signal) foi encontrada nos fatores de transcrição selecionados, tanto

monopartidos quanto bipartidos. Dentre os fatores de transcrição estudados no presente trabalho, podemos perceber que apenas a proteína codificada pela ORF NCU06205 (FGSC#11371) não apresentou nenhum NLS clássico. Entretanto, isto não significa que esta proteína não possua outros NLS não clássicos, os quais vêm sendo descritos, atualmente, na literatura (KOSUGI et al., 2009; LEE et al., 2006). Além disso, a falta de NLS não afasta a possibilidade de que a proteína não seja transportada para o núcleo, pois ela pode ser transportada na forma de complexos protéicos.

Tabela 3 - Dados bioquímicos obtidos por predição teórica dos fatores de transcrição selecionados*.

FGSC#	ORF	aa	MM (kDa)	pI	NLS**
11348	NCU02713	287	31,2	8,99	107-KRPR (M)
11355	NCU03043	366	41,73	8,57	293- KKHK (M) 341- RRHKK (M)
11397	NCU00090	621	67,3	7,19	280-PFDARKR (M) 285- KRQFDDLNDFFGSVKRR (B)
11437	NCU00019	688	74,61	7,86	33-PSKRRKK (M) 454- PASSRKRK (M)
11371	NCU06205	304	66,08	6,42	NI
11392	NCU09068	1036	109,29	8,89	287-PIKARKD (M) 325-RKTSIDETSKRNPNRKR (B)
11342	NCU01994	328	36,01	5,26	140-PAQSRRK (M) 144- RRKAQNRAAQRAFRERKE (B)

aa, número de resíduos de aminoácidos. MM, massa molecular. pI, ponto isoelétrico. NLS, *Nuclear Localization Signal*, NI, não identificado

*A estimativa teórica das propriedades físico-químicas dos fatores de transcrição bem como a determinação de NLS clássicos foi realizada por meio das ferramentas ProtParam e PsortII, respectivamente.

**M e B correspondem ao sinal de localização nuclear (NLS) monopartido (M) e bipartido (B).

Na Tabela 4 é mostrada a classificação das linhagens selecionadas de acordo com as famílias de fatores de transcrição, bem como a forma de como estas proteínas foram anotadas pelo banco de dados do genoma de *N. crassa*. Cinco fatores de transcrição possuem domínios de ligação ao DNA “clássicos”, enquanto que dois deles (codificados pelas ORFs NCU06205 e NCU00019) apresentam domínios não clássicos, os quais fazem parte do grupo de *miscellaneous factors* (BORKOVICH et al., 2004). A figura 8 mostra uma representação esquemática dos domínios estruturais presentes nos fatores de transcrição selecionados.

Quanto à anotação dessas proteínas, algumas das ORFs codificam proteínas funcionalmente caracterizadas em *N. crassa* (NIT2 e RCO-1) e em outros organismos (PacC, FlbC e Fkh1) e uma outra está apenas anotada como hipotética. As sequências polipeptídicas foram analisadas por Blastp e os alinhamentos múltiplos de algumas proteínas foram realizados.

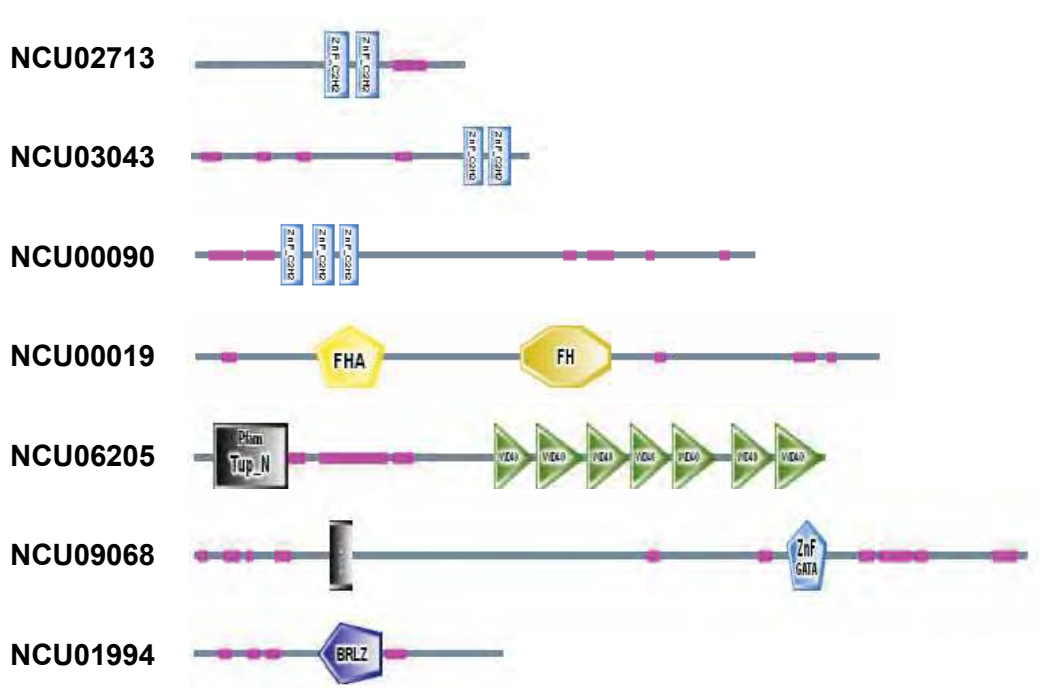
A linhagem mutante na ORF NCU02713 corresponde a uma linhagem de *N. crassa* mutante no gene *csp-1* (*conidial separation-1*) previamente isolada por Selitrennikoff, Lelson e Siegel (1974), a qual mostra uma separação ineficiente do conídio com a hifa. O gene *csp-1* foi caracterizado por codificar um fator de transcrição do tipo C₂H₂ *zinc finger* envolvido na regulação do ciclo circadiano e relógio biológico (LAMBREGHTS et al., 2009).

O fator de transcrição codificado pela ORF NCU03043 está anotado como C₂H₂ *finger domain-containing protein* FlbC. O alinhamento da sua sequência polipeptídica está mostrado na figura 9. Os traços lineares indicam onde estão situadas as regiões do domínio de ligação C₂H₂ *zinc finger*, bastante conservadas. A proteína FLBC de *N. crassa* possui uma identidade de 68% com a proteína FLE1 do fungo filamentoso *Podospora anserina* (COPPIN, 2002), e de 66%, 63% e 51% com as proteínas FlbC de *A. clavatus*, *A. fumigatus* e *A. nidulans*, respectivamente. FLE-1 é um fator que atua como repressor da via da diferenciação sexual feminina de *P. anserina* (COPPIN, 2002), enquanto que FlbC atua como um regulador positivo, ativando outros reguladores transcricionais ligados ao desenvolvimento e à ativação da conidiação do fungo *A. nidulans* (ADAMS; WIESER; YU, 1998; KWON et al., 2010).

A proteína codificada pela ORF NCU00090, PACC, como mencionada anteriormente, participa na resposta à alteração do pH do ambiente. A análise por Blastp realizada revelou que a proteína PACC de *N. crassa* possui identidade elevada com as proteínas PacC de *Magnaporthe grisea* (54%), *Gibberella fujikuroi* (51%), *G. moniliformis* (51%), *Fusarium oxysporum* (51%), *Trichophyton rubrum* (50%), *Acremonium chrysogenum* (48%), *A. niger* (41%) e *A. nidulans* (40%), todos fungos filamentosos. Na região N-terminal da PACC estão situados os três domínios C₂H₂ *zinc finger*, conservados entre os microorganismos.

Tabela 4 - Classificação das linhagens selecionadas em relação às famílias de fatores de transcrição e suas anotações no banco de dados do FGSC.

ORF	Mating type	Famílias de fatores de transcrição	Anotação da proteína
NCU02713	a	Zinc finger C ₂ H ₂ type	Conidial separation 1 (csp-1)
NCU03043	A	Zinc finger C ₂ H ₂ type	C ₂ H ₂ finger domain-containing protein FlbC
NCU00090	A	Zinc finger C ₂ H ₂ type	pH response transcription factor pacC/RIM101 (pacC)
NCU00019	a	Forkhead domain	FKH1
NCU06205	A	Tup-N-Terminal e WD-repeats	Regulator of conidiation-1(rco-1)
NCU09068	a	GATA zinc finger	Nitrate nonutilizer-2 (nit-2)
NCU01994	a	bZIP	Hipotética

**Figura 8** – Representação esquemática dos domínios dos fatores de transcrição selecionados, feita pelo servidor EMBL-SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). Barras em azul claro representam domínios C₂H₂ zinc finger; regiões em amarelo representam domínios do tipo forkhead, também conhecidos como “winged helix”; em quadrado preto, domínio específico (Tup-N); barra preta, domínio específico de fungos; regiões em verde representam repetições do domínio WD40; pentágono azul claro representa domínio GATA zinc finger; pentágono azul escuro representa domínio bZIP. As barras em rosa representam seqüências com baixa complexidade.

NCU03043_N.crassa	1	-----MSYQSSPHETNPWGSSSGPGGPPPPPPQQPAPQNMVYIN
flc1_P.anserina	1	MTMTIDTHNQHRFGSLNFDHMSYSSHPHETNPWVSTAPAGGP-----QGGSQLYVS
FlbC_A.fumigatus	1	-----MTMVIENQNRQYGG-MSFDSVYSHNVAAHAPQFTDPWTSAHT
FlbC_N.fischeri	1	-----MTMVIENQNRQYGG-MSFDSVYSHNVPHHAPQFTDPWASAHT
FlbC_A.clavatus	1	-----MTMVIENQNRQYGG-MGFDSVYSHNVPHHTPEFTDPWTTAHT
Flbc_A.nidulans	1	-----MTMVIENQNRQYGGMGFDSVYQHPPHHSQPPQFSDPWTTAHS
NCU03043_N.crassa	41	NRDSAGLPHLNLAALPKRQHVRNGSVWPHQPAAPGPVTAPAGSAPMADVY--RQDDLSS
flc1_P.anserina	56	SQDGLSLPHLNLNGLSKHQHSNRPSGSTSMAPYAPLPVSASSAG-----DVYSRQHDMMMP
FlbC_A.fumigatus	42	SSHSTPPVYATSMGINHTKPEEVSRL-TLSMPYSSVPVSAPSMVTS---GNYSTAPT--G
FlbC_N.fischeri	42	SSHSTPPVYATSMGINHTKPEEVSRL-TLSMPYSSVPVSAPSMVTS---GNYSTAPT--G
FlbC_A.clavatus	42	SSHSTPPVYATSLGINHTKPEEVSRL-ALSLPYSSIPVSAPSLVAS---SSYSTAPT--S
Flbc_A.nidulans	43	SSHSTPPVYPASVGIKQ---DETSLRPSHPMPYS-VSVSAPSIVAG---SNYSSASTSAS
NCU03043_N.crassa	100	MPQDHLGLNRMHPHATSTA-YDTSAYTTSASPVSINYPSTSQY-ELGYBPATMRGAFG
flc1_P.anserina	111	MSQD-LLSINRLQHPTTSAAPYDTSAYTTSASPVTASATSTAYDQLGYAPAPIRGTYA
FlbC_A.fumigatus	96	YSGAEVIGLQ---HDMPTTTFEQAPTYYTASS--MSSFTPATYAPISYAPPLAHPHDSR
FlbC_N.fischeri	96	YSGAEVIGLQ---HDMPTTTFEQAPTYYTASS--MSSFTPATYAPISYAPPLAHPHDSR
FlbC_A.clavatus	96	YPGPEVMSLQ---HEMPRTTTFEQPTTYTASS--MSTFTPATYAPISYAPSLAHQHPDAR
Flbc_A.nidulans	96	YPAPDMMGLP---HEIPRTSFDHAPAYTTAPS--ISSFAPASYAPISYASE---VHQDNR
NCU03043_N.crassa	158	-MAPDDTARRYSSQGIQDDRRSFQDALBASQGMLTMSQE-TPRNIYDVNRARGSTDSY
flc1_P.anserina	170	ALAPEDSSRRYSQGLQDDRRSFQDALBASQGMMSLSQD-TPRNIYDVNRARGSTESY
FlbC_A.fumigatus	151	RVSHVDP-RGNHSQ---PPSGPTFGDALDASRGMVALSQDLTPRNIYAPR--ARGSGDSY
FlbC_N.fischeri	151	RVSHVDP-RGNHSQ---PPSGPTFGDALDASRGMVALSQDLTPRNIYGPR--ARGSGDSY
FlbC_A.clavatus	151	RISHVDP-RANHSQ---APSGPTFGDALDASRGMVALSQDLTPRNIYGPR--SRGSGDSY
Flbc_A.nidulans	148	RISHADASRVASSQ---STSGPTFGDALDASRGMVALSQDLTPRNIYGPR--SRGSGDSY
NCU03043_N.crassa	216	GFPQTHSTGSSVSSASFGGYYG---SVDGSI SDYSTAGSDIES--LSGRSLPRPQGLMS
flc1_P.anserina	229	GFPSTHSATSSVSSITGFSFYGG---SVDGSDVSDYSTTGSDIES--LSGRSLPRPQGLMS
FlbC_A.fumigatus	205	GFPAAHSSGSSISSGGNYPYASVASVSVSSVTDYSSTTSESYENGHLSTLPRPSNLLS
FlbC_N.fischeri	205	GFPAAHSSGSSISSGGNYPYASVASVSVSSVTDYSSTTSESYENGHLSTLPRPSNLLS
FlbC_A.clavatus	206	GFPSTHSSGSSISSGGNYPYASVGSVDSSVTDYSSTTSESYDNHLSRTLPRPSTLLS
Flbc_A.nidulans	204	GFPLAHSAGSSISSAGSYPYASVASVSVSSVTDYSSTTSESYENGHLSTLPRPSTLLT
NCU03043_N.crassa	271	-SQPPAPQSMMSGFSSKVSTSTSKKHKCKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFHCEVEG
flc1_P.anserina	284	-SQPPAPQSMMSGFSSKVSSSTQKKHKCKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFQCEVEG
FlbC_A.fumigatus	265	GSAPPGPQSMMSQFSSKMPSNTQKKHKCKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFACDVEG
FlbC_N.fischeri	265	GSAPPGPQSMMSQFSSKMPSNTQKKHKCKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFACDVEG
FlbC_A.clavatus	266	GSAPPGPQSMMSQFSSKMPSNTQKKHKCKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFACDVEG
Flbc_A.nidulans	264	GSAPPGPQSMMSQFSSKMPSNTQKKHKCKVCDKRFTRPSSLQTHMYSHTGEKPFACDVEG
NCU03043_N.crassa	330	CGRQFSVVSNLRRHKKVHKPQSE--TPSETGSEAGQHSE
flc1_P.anserina	343	CGRNFSVVSNLRRHKKVHKNOGEPQTPSETGSEDHQSDE
FlbC_A.fumigatus	325	CGRHFSVVSNLRRHKKVHKGEKE----NVSGGEE-----
FlbC_N.fischeri	325	CGRHFSVVSNLRRHKKVHKGEKE----NVSGGEDE-----
FlbC_A.clavatus	326	CGRHFSVVSNLRRHKKVHKGEKE----NVSGGEDD-----
Flbc_A.nidulans	324	CGRHFSVVSNLRRHKKVHKGGEKE----GGSGDDEE-----

Figura 9 – Alinhamento múltiplo de seqüências polipeptídicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU03043 (FLBC) de *N. crassa* com as proteínas FLE1 (*P. anserina*, CAD12881) e FlbC dos fungos *A. fumigatus* (EAL93672), *N. fischeri* (EAW18939), *A. clavatus* (EAW14351) e *A. nidulans* (AAC33347). O alinhamento foi realizado por ClustalW e os aminoácidos idênticos (em preto) e as trocas conservativas (em cinza) foram identificados por BoxShade. Os traços lineares indicam onde estão situadas as regiões do domínio de ligação C_2H_2 zinc finger.

Já a proteína codificada pela ORF NCU00019 está anotada como FKH1, pertence à família de fatores de transcrição do tipo *forkhead*. Na figura 10 é mostrado o alinhamento das seqüências polipeptídicas das proteínas FKH1 de *N. crassa*, *A. chrysogenum* (AcFKH1) e *S. cerevisiae* (Fkh1p). Os traços lineares indicam onde estão situadas as regiões dos domínios FHA e FKH em *N. crassa*. FKH1 de *N. crassa* apresenta 51% e 45% de identidade com as proteínas Fkh1p e AcFKH1, respectivamente.

O fator de transcrição codificado pela ORF NCU06205 é a proteína RCO-1, funcionalmente caracterizada em *N. crassa* como um mediador da repressão de genes relacionados a variados tipos de processos celulares, dentre eles, a regulação da conidiação (YAMASHIRO et al., 1996). Da mesma forma, a proteína codificada pela ORF NCU09068, NIT2, foi funcionalmente caracterizada em *N. crassa* por Fu e Marzluf (1987), e está envolvida na regulação do metabolismo de nitrogênio em situações limitantes de fonte primária de compostos nitrogenados e/ou indução por nitrato.

Finalmente, a proteína codificada pela ORF NCU01994, embora anotada como hipotética, apresenta 37% de identidade com o fator de transcrição Fcr3 (*fluconazole resistance 3*) de *Candida albicans*, o qual está envolvido na resistência a fluconazol (YANG et al., 2001). A figura 11 mostra o alinhamento da seqüência polipeptídica da proteína codificada pela ORF NCU01994 de *N. crassa* com a proteína Fcr3 de *C. albicans* e com as proteínas Fcr3, ainda não caracterizadas, dos fungos *A. fumigatus* (57% identidade), *N. fischeri* (55%) e *A. flavus* (55%). Recentemente, Tian, Li e Glass (2011) realizaram um perfil transcricional com a linhagem mutante Δ NCU01994, revelando que o fator de transcrição ausente nesta linhagem exerce algum papel no metabolismo de carboidratos e compostos carbonados.

2. Análise morfológica das linhagens mutantes

2.1. Determinação da taxa de crescimento linear

As linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem foram analisadas em relação à taxa de crescimento linear em *race tubes*. Brevemente, as células foram inoculadas em uma extremidade do tubo e mantidas a 30°C no escuro. A frente de crescimento foi marcada a cada 24 h, até a mesma atingir a outra extremidade do tubo. A distância de crescimento foi medida e expressa em função das horas de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura 12 mostra as taxas de crescimento das linhagens. Os resultados mostram que o crescimento das linhagens mutantes nas ORFs NCU06205 (*rco-1*), NCU00090 (*pacC*) e NCU00019 (*fkh1*) foi bastante afetado quando

FKH1_ <i>N. crassa</i>	1	MSPSPPKHTASFNNTADQHNLSDPVTGDSPPSRPSKRRKKDDDAPTDLADADSSSLVADQS
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	1	MPPTSKRSQQRKRDTRSSPTTRPPEEPPTPTRPAKRRRK-----LSPPDPPEPESES
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	1	MSVTSREQKFS-----GKYS
FKH1_ <i>N. crassa</i>	61	ALDMNDDQVVARVIOYLEMPKN-VQASKDHSNSIHES-SQGVQAFAKIAANDWTYYIMS
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	53	PSNV-DDDALVTQVTQKLNKPP-VQATKDANSIHEANSQGVKAYAKVAADWTFFYITK
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	16	SYTAQDRQGLVNAVTCVLSSSSDPVAVSSDYNSNSLSIA--REVNAYAKIACDWTYYVQK
FKH1_ <i>N. crassa</i>	119	LNVNIGRS-----SEPIQATTCQS-----QEEDPSKVVHIDLGPKNQV
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	110	LAVKIGRSPFAGGGEAGRGRRSERHRESCGSSSGTGHDVDVDRDEDEDQVHIDLGPSTV
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	74	LEVITIGRN-----TDSLNLNVPVPG-----TVVKKNIIDIDLGPATV
FKH1_ <i>N. crassa</i>	157	SRQHALTYFKSTEEQWNRVKGRNALKVDCVPPKVGDEGP---LRSGEVIEIGGEMMFV
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	170	SREHAVISFDSKNEKWNMTVKGRNGVRVNNLLFKPGESRQ---LSSGEVMEIGGVEMMFV
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	110	SRKHAAIRFNLESGSWELQIFGRNGAKVNFRRIPTGPSPPTVLQSGCIIDIGGVQMIFI
FKH1_ <i>N. crassa</i>	214	LP-----ADISALQIKRDYLERAGIVPPDSQVSP-----RQARHELPSAGESH
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	227	LP-----SEISPLHIHPSLERCCGLN-----ATTEKPRAPRQR
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	170	LPEQETIISDYCLNHLMPKLLSTYGTNGNNPILRNIIEGSTYLREQRLQEEARLQQLDH
FKH1_ <i>N. crassa</i>	257	AFQAVSPTSKAAPRNQGPQKALAPAPPYRRGVTPPLNLPPEPMHRPVHEGLAGPLVMTN
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	260	SHLAPAAIDDTTPG-----TPPPSTQN--RHPLTSTKSPAFS-----TPGHVMVGA
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	230	LHTPLSSSSDVNPIDPHGDTIMMEEDDENYTRGGIRENTYTSSSNNAVNTGNVPHIE
FKH1_ <i>N. crassa</i>	317	NEVDLSLDENQHHPKQFSYAQMITQAIWNTEQKLNLSGIYQFIMNRYSYRHQPAGGWQ
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	305	SGVDLSKIDENKHHPKQFSYAQMITQAIISAPGKLTLLNGIYTYIMDQYAYRHQPPSGWQ
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	290	NPSDLSLDENRYIKPPQSYASMITQAIISTPEGSISLADLYKFISDNYAFYRFS-QMAWQ
FKH1_ <i>N. crassa</i>	377	-NSIRHNLSLNKSFEEKVARSTDEPGKGMKWQIVADAREDMIRNAYRGGRGHRGTSNPAS
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	365	QNSIRHNLSLNKHFDKVARSTYEPGKGAKWHMVPETKDELKNAWRIRGGHRGSSVPS
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	349	-NSVRHNLSLNKAFEKVPKIRAGQQGKGMNWKISDEVRRDFIN-KWNAG-----
FKH1_ <i>N. crassa</i>	436	PSGLNYITQGPKDMAAKEPASRRKRKISPSDSPQPQPHPTLRDSQSTPVRRAQRKPLPDK
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	425	PSQLNYITQGPRDMAARGSPSSRRKRSSLITSPTPR--PPLHMSQATPDGALKHSTRANA
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	395	--KLSKIRRCASVTRQLQLHMSKFGETP-----
FKH1_ <i>N. crassa</i>	496	AEDGTEASPLSTIRKPAATMS-TLGIVEDTPASPTLGPSYLQEDGASLVTPAPNRVNPRLV
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	483	VLT-VDGSPLPFRFKKGEMGDRDPSFSNYPHSPTLTSSFLQEDGASFVTPAPPRVHPKLA
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	421	-----APSSSIDPRGKAQKVKSLSLQATSSILGESA
FKH1_ <i>N. crassa</i>	555	PPSTAQRPSQHMPSTSSPAPFWRYADISSTPLKPAQYDASPSKTHGNLPSQSSSP-----
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	542	PPSTAQRPSQHMPSTSSPAPFWRFIDIGSTPLR---GTSPTKASALPPQSSSPLRRNKS
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>	453	PQLQRTQLTGLISTTTSMDDVTTNANVNNSSLS-----
FKH1_ <i>N. crassa</i>	610	PPARSKSPAGSASPSRTTSRGATVGVVEESPSPAEFEEF-----DRAFDLTKGFQSIGSYHA
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	598	PPSSPTRPQKEVSQEPVNVPPETPVVKRNVEDNEDEEEDDDDDQCFDLAQGFQSIGAFHE
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>		-----
FKH1_ <i>N. crassa</i>	665	P-VSRGKEVQPAAGNDVPSMAPLSS
FKH1_ <i>A. chrysogenum</i>	658	NGLSVGDTF-----
Fkh1p_ <i>S. cerevisiae</i>		-----

Figura 10 – Alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas do fator de transcrição FKH1 de *N. crassa* com as proteínas Fkh1p de *S. cerevisiae* (AAZ22496) e AcFKH1 de *A. chrysogenum* (AAP35674). O alinhamento foi realizado por ClustalW e os aminoácidos idênticos (em preto) e as trocas conservativas (em cinza) foram identificados por BoxShade. Os traços lineares indicam onde estão situadas as regiões do domínio *forkhead*.

NCU01994_ <i>N. crassa</i>	1	-----MDYTNPTYFGAAAQPPYHFIGIPPLT
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	1	-----MDYS--FYSNPQSQQPFSSVYDLHGSLP
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	1	-----MDYS--FYSNPQSQQPFSSVYDLHGSLP
<i>Fcr3_A.flavus</i>	1	-----MDYS--FYSNPQSQQPFSSVYDLHGSLP
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	1	MNFKTENSTTPNGDWSQSKAFTNSGSSFPVLNGTCELDQENLALSNSGQPEISIFTQDSGL
NCU01994_ <i>N. crassa</i>	27	PSHSNSASSDDFNASPQEIFDQFPNGLPDQFQNFETAQENNQSTTFAG----PPTPP
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	25	TPDQNNPAPNGDDIN-----DPFSSLVNYSFHP-SFRION----PAAPS
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	25	TPDQNNPAPNGDDIN-----DPFSSLVNYSFHP-SFRION----PAAPS
<i>Fcr3_A.flavus</i>	1	-----DPFSSLVNYSFHP-SFRION----PAAPS
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	61	HGIDVAAPSDITDLNNQSGYQYNNNLAHDLYFTGSMEMPTQHPYITNTNNHLSYSNSSE
NCU01994_ <i>N. crassa</i>	82	TQQLLPITQPTNGAIHLQEQQSAADLLRSLLNAKGDPADRARARRQGSNSDEDENLTPA
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	65	SFVPPPHSPPESE---FSKHSVSSNDFPNSHAEP-GSVECGDDQLQHRSSSEKDNLTPA
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	64	SFVPPPHSPPESE---FSKHSVSSNEFP-SHAEP-GSVECGDDQLQHRSSSEKDNLTPA
<i>Fcr3_A.flavus</i>	1	-----MTPA
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	121	EFSPIGNMSPDSTGGANSNFTSGNKRKASNESFSPISCHHYGTESGNNNNNGTSRSS
NCU01994_ <i>N. crassa</i>	142	QS-----RRKAQNRAA-----QRAFRE
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	120	QS-----KRKAQNRAA-----QRAFRE
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	118	QS-----KRKAQNRAAANISPIGASSQRAFRE
<i>Fcr3_A.flavus</i>	5	QS-----KRKAQNRAA-----QRAFRE
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	181	QSSSHKSRKKLLDEKDAALIARDDSELTEELQMKRKAQNRAA-----QRAFRE
NCU01994_ <i>N. crassa</i>	159	RKERHVKELNRLQQLLEEAQVTRSENEKLQDLQKISTENEILRATSLAAGAAAAGSP
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	137	RKERHVRELEEKVSALEQESTTLAADNERLKRELAKFATENEVLRATT---GQLASSQG
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	146	RKERHVRELEEKVSTLEQESTTLAADNERLKRELAKYATENEVLRATT---GQLASSQG
<i>Fcr3_A.flavus</i>	22	RKERHVRELEEKVNNLEQASSNLVADNERLKRELARFTTENEILRATS---GSGDRTHN
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	230	RKESKLKELEAKLLASEEERQKLLDELEQIKKQNIISIATENEILKHNGMGNNINDVQIGN
NCU01994_ <i>N. crassa</i>	219	LGSAGTPMTTGP-MSYKPTDFYSNLLLENHNEKTP--SHRVVKSE-SGERLLAAGAAWDLM
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	193	RHLDSEPTITGTP-MKYTPPTDFYTNLVP-KGEPAP--THRVTVCEKTGERLLDAGATWDLI
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	202	RHLDSEPTITGTP-MKYTPPTDFYTNLVP-KGEPAP--THRVTVCEKTGERLLDAGATWDLI
<i>Fcr3_A.flavus</i>	78	-HSD-EPTITGTP-LKYTPPTDFYSELVP-KGEPSP--LHRVSTCAKTGEKLLGAGATWDLI
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	290	LSSYGRLOVDKFNFPKTKQDFIEHVLQGTNHQLKDENDKDKVYNDQGHKLLALGAVWDYL
NCU01994_ <i>N. crassa</i>	275	QN---HELFQRLVNIQAVSELLKGQAKCDGQGPVFEERATLEAIEQSVASGSDELL
<i>Fcr3_A.fumigatus</i>	249	QG---HELYKQGLVDIGDVSNNRLKGMAQCNGQGPAPFREGQVLQAIEASAAACRDELI
<i>Fcr3_N.fischeri</i>	258	QG---HELYKQGLVDIGDVSNNRLKGMAQCNGQGPAPFREGQVLRAIEASAAACRDELI
<i>Fcr3_A.flavus</i>	132	QG---HELFQRLVNDIKDVSERLKNITQCDGQGPAPFAEVLKAIEESAAANDDDL
<i>Fcr3p_C.albicans</i>	350	QIKAEFADLDFNSIDFNDVMEKLGNEKCHGYGPAYPLELVNEAIESSLN-----

Figura 11 – Alinhamento múltiplo de sequências polipeptídicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU01994 de *N. crassa* com as proteínas Fcr3 dos fungos *A. fumigatus* (EAL87351), *N. fischeri* (EAW23926), *A. flavus* (EED50594) e da levedura *C. albicans* (AAL35299). O alinhamento foi realizado por ClustalW e os aminoácidos idênticos (em preto) e as trocas conservativas (em cinza) foram identificados por BoxShade. Os traços lineares indicam onde está situada a região do domínio bZIP.

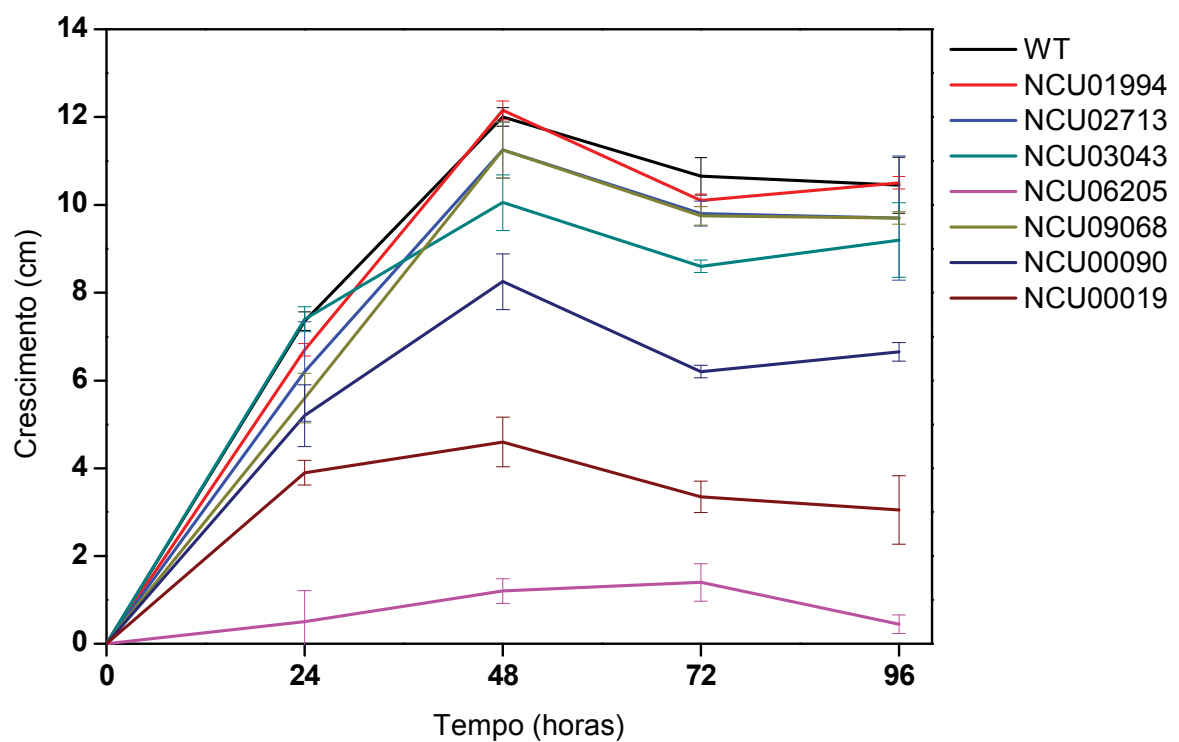


Figura 12 – Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutantes em *race tubes*. As células foram inoculadas em uma das extremidades e o crescimento foi medido através da marcação da frente micelial a cada 24 h.

comparado à linhagem selvagem. As demais linhagens apresentaram padrões de crescimento similares ao da linhagem selvagem.

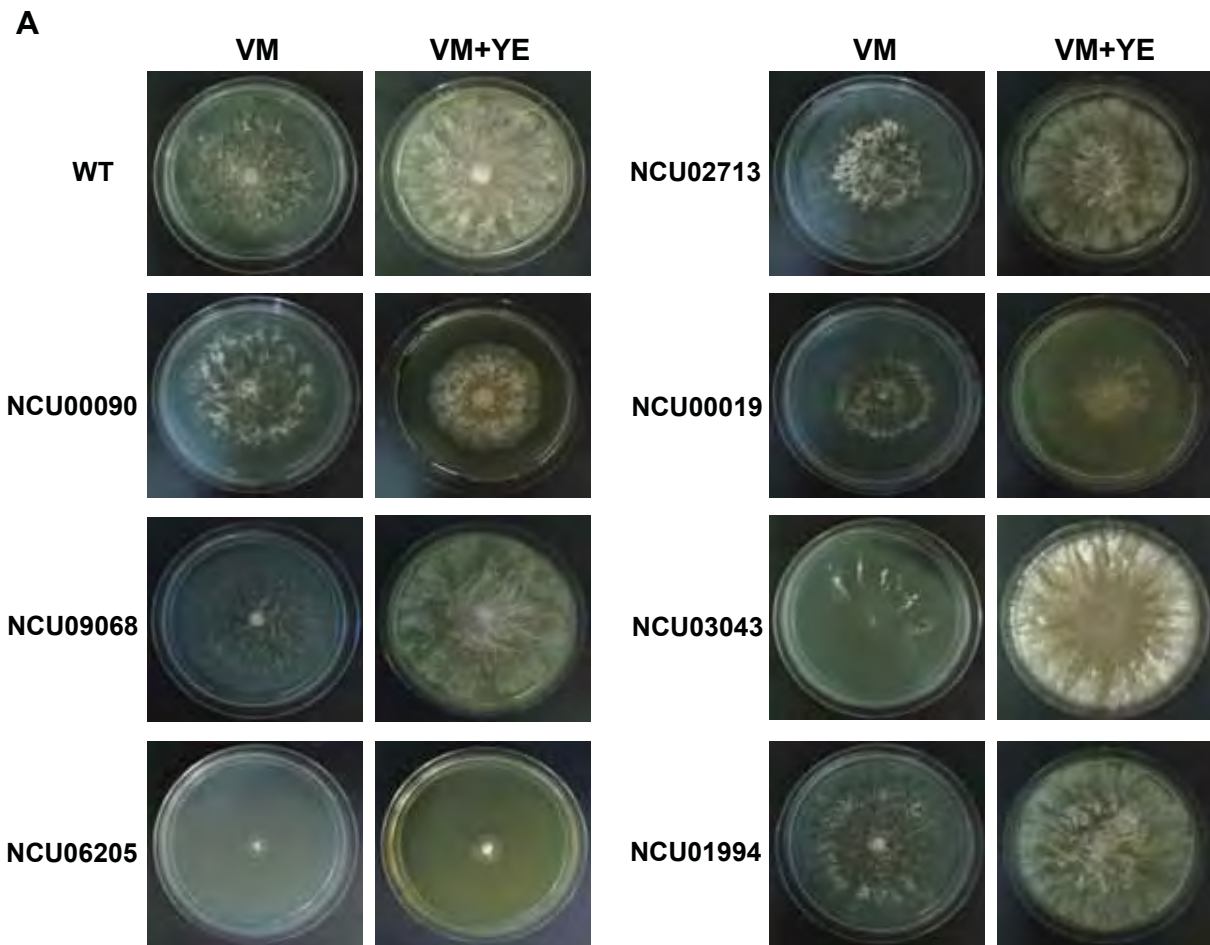
2.2. Análise de crescimento radial

A análise de crescimento radial foi feita em placas contendo meio VM e VM suplementado com extrato de levedo (YE). Células (10^7 conídios/mL) ou massa micelial das linhagens selvagem e mutantes foram inoculadas no centro das placas e incubadas no claro/escuro, a 30 °C por 24 h. A figura 13A mostra o crescimento radial das linhagens, nas quais o diâmetro foi medido e os valores descritos na tabela (figura 13B). Novamente, podemos observar que, comparadas à linhagem selvagem, as linhagens mutantes nas ORFs NCU06205 (*rco-1*), NCU00090 (*pacC*) e NCU00019 (*fkh1*) apresentaram o crescimento radial afetado, principalmente a linhagem *rco-1*^{KO}, a qual cresceu sete vezes menos que a linhagem selvagem.

3. Análise da região 5'-flanqueadora dos genes *gsn* e *gpn*

As regiões 5'-flanqueadoras dos genes *gsn* e *gpn* que abrangem o promotor e a região 5'-UTR, foram analisadas quanto à presença de sítios de ligação para os fatores de transcrição identificados neste trabalho. Essa região do gene *gsn* (2.391 pb) foi sequenciada e caracterizada por Freitas e Bertolini (2004). A região 5'-flanqueadora do gene *gpn* (2.881 pb) foi obtida no banco de dados do genoma de *N. crassa*. Utilizando-se o programa *MatInspector* no site Genomatix, foram encontrados sítios de ligação para quatro dos fatores de transcrição selecionados em nosso estudo, conforme mostra a figura 14. A proteína Mig1 de *S. cerevisiae* (ortóloga à CRE-1 em *N. crassa*) possui cinco sítios de ligação no promotor do gene *gsn* e cinco no promotor *gpn*. Para a proteína NIT2, existe um único elemento *cis* na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*, e cinco deles na região *upstream* do gene *gpn*. Seis e três elementos Fkh (*Forkhead*) foram identificados na região regulatória dos genes *gsn* e *gpn*, respectivamente, e somente um único sítio de ligação para a proteína PacC foi encontrado na região promotora do gene *gsn*. Estes dados sugerem que os fatores de transcrição selecionados e a proteína CRE-1 possam exercer forte regulação no metabolismo do glicogênio.

Diante de todos os dados obtidos, os fatores de transcrição que apresentaram interesse relevante para a continuidade dos estudos foram as proteínas PACC, RCO-1, NIT2, FhbC (codificada pela ORF NCU03043) e CRE-1 (codificada pela ORF NCU08807), a

**B**

Linhagens	VM	VM+YE
WT	7,70 ± 0,26	7,87 ± 0,06
NCU02713	7,37 ± 0,29	7,50 ± 0,14
NCU03043	8,20 ± 0,52	8,35 ± 0,21
NCU00090	5,87 ± 0,47	5,27 ± 0,40
NCU00019	6,93 ± 0,45	6,90 ± 0,0
NCU06205	1,08 ± 0,17	1,22 ± 0,25
NCU09068	7,27 ± 0,23	7,67 ± 0,06
NCU01994	7,37 ± 0,06	8,00 ± 0,10

Figura 13 – Análise de crescimento radial das linhagens selvagem e mutantes. **(A)** Análise de crescimento radial em placas contendo VM e VM suplementado com extrato de levedo (VM + YE). O crescimento foi medido (em cm) após 24 h, no claro/escuro. **(B)** Tabela contendo as médias dos diâmetros das colônias e o desvio padrão (\pm), em centímetros.

A



B

Elementos para FT	Sequências consenso	Posição no promotor <i>gsn</i> (nt)*	Posição no promotor <i>gpn</i> (nt)*	Organismo	Referências
Mig1	5'-GGGG-3'	-2305, -2026, -1592, -1487, -317	-1610, -1564, -618, -351, -22	<i>S. cerevisiae</i>	Lundin, Nehlin e Ronne, 1994
PacC	5'-GCCAAG-3'	-1803	–	<i>A. nidulans</i>	Arst e Peñalva, 2003
NIT2	5'-TATC-3'	-1558	-2064, -1217, -660, -625, -594	<i>N. crassa</i>	Fu e Marzluf, 1990a
Fkh	5'-AACA-3'	-2261, -2178, -2103, -948, -679, -214	-2548, -2327, -2115	–	Kaufmann, Muller e Knochel, 1995

Figura 14 – (A) Representação esquemática dos genes *gsn* e *gpn* com as sequências 5'-flanqueadoras, as respectivas ORFs e as posições relativas dos sítios para as proteínas Mig1, PacC, NIT2 e Fkh. No promotor *gsn*, a sequência do TATA box está indicada pelo T e sobrepondo um sítio para Fkh. O provável sítio de início da transcrição (TIS) está indicado pela flecha (FREITAS; BERTOLINI, 2004). As ORFs estão delimitadas pelo *start codon* ATG e pelo *stop codon* TAA. **(B)** Tabela descritiva dos elementos de DNA regulatórios.

qual foi incluída no trabalho devido à existência dos elementos de DNA regulatórios existentes nas regiões 5'-flanqueadoras dos genes *gsn* e *gpn*.

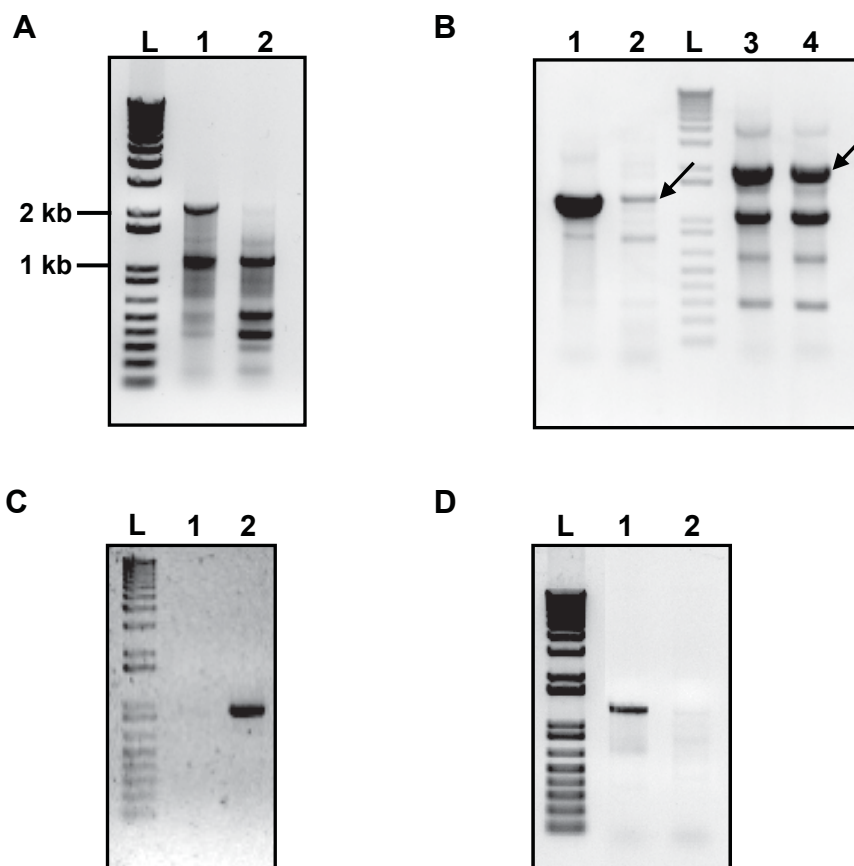
4. Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes por PCR

Visando confirmar a ausência dos genes nocauteados nas linhagens mutantes de *N. crassa* selecionadas, foram realizadas reações de amplificação das ORFs, utilizando-se DNA genômico extraído das linhagens mutantes e da linhagem selvagem. As reações de amplificação foram realizadas concomitantemente, linhagem selvagem e mutante para cada par de oligonucleotídeo. Todas as ORFs foram amplificadas a partir do DNA genômico da linhagem selvagem (figura 15 A-D). Entretanto, em relação à ORF NCU00090 um fragmento de aproximadamente 2.041 pb foi amplificado (tamanho da ORF + íntron), indicado por uma seta na figura 15B (canaleta 4). Análises de restrição nesse fragmento foram realizadas e confirmaram que se tratava da ORF em questão. Estes resultados mostraram que o gene *pacC* não foi corretamente nocauteado na linhagem FGSC#11397. Já na linhagem #10372 (*cre-1^{KO}*), um fragmento de aproximadamente 1,3 kb correspondente ao tamanho da ORF foi amplificado (figura 15B, canaleta 2). Análises de restrição confirmaram que este fragmento **não** é o da ORF NCU08807. As demais ORFs não foram amplificadas nas respectivas linhagens mutantes, confirmando, dessa forma, os nocautes.

5. Clonagem das ORFs e subclonagem em vetores de expressão

Com objetivo de analisarmos o papel dos fatores de transcrição selecionados sobre o metabolismo de glicogênio, as sequências de cDNA correspondentes às ORFs selecionadas foram isoladas. Pares de oligonucleotídeos específicos para cada ORF foram utilizados nas reações de amplificação. A figura 16 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose dos produtos amplificados por PCR e uma tabela contendo o tamanho dos fragmentos esperados. Sequências das ORFs NCU00090 (639 pb) e NCU09068 (927 pb) foram amplificadas, correspondendo às proteínas truncadas PACC e NIT2, respectivamente. Os fragmentos denominados $\Delta 90$ e $\Delta 9068$ contêm apenas as seqüências que codificam os domínios C_2H_2 *zinc finger* e GATA *zinc finger* de ligação ao DNA, respectivamente. Para as demais ORFs foram amplificados fragmentos de cDNA inteiros.

Todos os fragmentos correspondentes aos tamanhos esperados das ORFs foram excisados do gel de agarose, purificados e subclonados no vetor de clonagem pMOS-Blue, originando os plasmídeos pMOS- $\Delta 90$, pMOS- $\Delta 9068$, pMOS-8807, pMOS-3043 e pMOS-



E

Linhagem	ORF	Figura/Canaleta	Tamanho esperado
#11397	NCU00090	B/4	2041 pb
#11355	NCU03043	D/2	1215 pb
#11371	NCU06205	A/2	2176 pb
#10372	NCU08807	B/2	1293 pb
#11437	NCU09068	C/1	927 pb

Figura 15 – Amplificação das ORFs + íntrons a partir de DNA genômico das linhagens mutantes e selvagem. **(A)** Eletroforese em gel de agarose 1% do fragmento amplificado da ORF NCU06205. 1, linhagem selvagem. 2, linhagem mutante. **(B)** ORFs NCU08807 (canaletas 1-2) e NCU00090 (canaletas 3-4). 1 e 3, linhagem selvagem. 2 e 4, linhagens mutantes nas respectivas ORFs. **(C)** ORF NCU09068. 1, linhagem mutante. 2, linhagem selvagem. **(D)** ORF NCU03043. 1, linhagem selvagem. 2, linhagem mutante. **(E)** Tabela das linhagens testadas e tamanho dos fragmentos esperados, com íntrons. (L, ladder 1 kb).

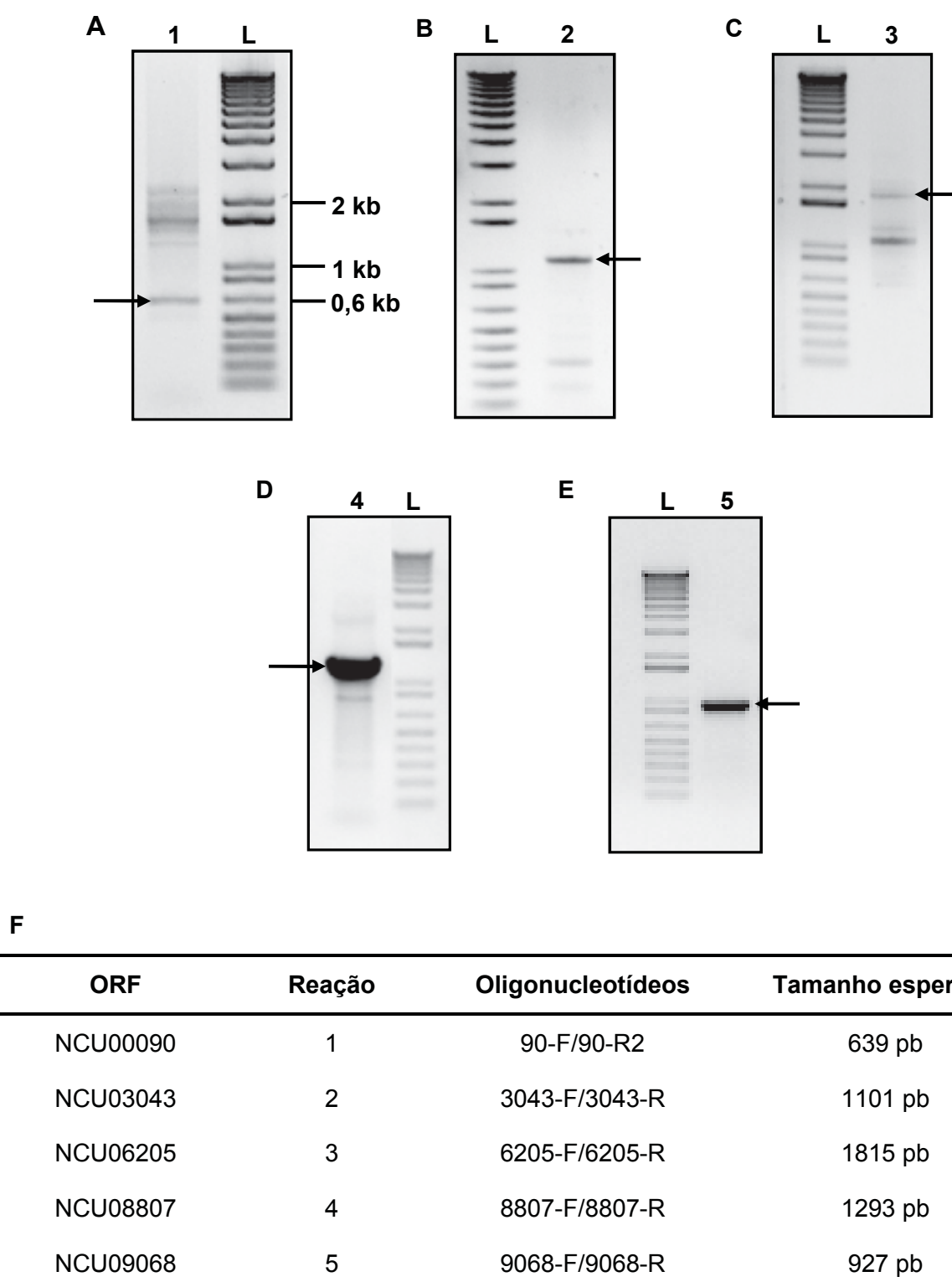


Figura 16 – Amplificação dos fragmentos das ORFs correspondentes aos fatores de transcrição. **(A)** Eletroforese em gel de agarose 1% do fragmento amplificado da ORF NCU00090. **(B)** ORF NCU03043. **(C)** ORF NCU06205. **(D)** ORF NCU08807. **(E)** ORF NCU09068. (L, ladder 1 Kb). **(F)** Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação das ORFs e tamanho dos fragmentos esperados.

6205. Os clones positivos foram confirmados por meio de análises de restrição nas respectivas construções plasmidiais (dados não mostrados). Os insertos inicialmente clonados no vetor de clonagem pMOS-Blue foram transferidos para vetores de expressão. Duas alunas de Mestrado deram continuidade às subclonagens das ORFs NCU03043 e NCU06205.

Cassetes de DNA correspondentes aos insertos $\Delta 90$ (PACC truncada), $\Delta 9068$ (NIT2 truncada) e 8807 (CRE-1) foram transferidos do vetor pMOS para os vetores de expressão pET28a/pGEX. Após a transformação de células de *E. coli* DH10B, os plasmídeos recombinantes resultantes (pET- $\Delta 90$, pET- $\Delta 9068$, pET-8807, pGEX- $\Delta 90$ e pGEX- $\Delta 9068$) foram submetidos a análises de restrição para a confirmação da presença e da orientação dos insertos no vetor de expressão (dados não mostrados). Amostras das construções plasmidiais de clones considerados positivos foram confirmadas por seqüenciamento de DNA e armazenados a -80°C para continuidade do trabalho.

6. Produção e Purificação das proteínas recombinantes

6.1 Ensaios de indução e análise de solubilidade das proteínas recombinantes

Para a produção das proteínas recombinantes e a verificação de sua solubilidade, os plasmídeos pET- $\Delta 90$, pET- $\Delta 9068$, pET-8807, pGEX- $\Delta 90$ e pGEX- $\Delta 9068$ foram utilizados para transformar linhagens de *E. coli* produtoras (BL21 e/ou Rosetta). A indução das proteínas recombinantes fusionadas à cauda poli-His foi verificada em géis de poliacrilamida SDS-PAGE (12%). Bandas correspondentes às proteínas His- Δ PACC (aproximadamente 40 kDa, massa molecular teórica de 26 kDa), His-CRE-1 (aproximadamente 55 kDa, massa molecular teórica de 50 kDa) e His- Δ NIT2 (aproximadamente 46 kDa, massa molecular teórica de 36 kDa) foram identificadas nos extratos celulares dos clones analisados após indução com IPTG. Quanto à solubilidade dessas proteínas, observamos que a proteína His- Δ PACC foi expressa em grande quantidade na linhagem BL21, estando presente tanto na forma solúvel no sobrenadante (S) como no precipitado (P), após centrifugação. As proteínas His-CRE-1 e His- Δ NIT2 foram produzidas, na maior parte, na forma solúvel, porém, em maior quantidade somente na linhagem Rosetta (dados de solubilidade não mostrados). Ensaios de indução das proteínas GST- Δ PACC e GST- Δ NIT2 também foram verificados em géis de poliacrilamida SDS-PAGE (12%). Bandas correspondentes às proteínas GST-PACC (aproximadamente 59 kDa, massa molecular teórica de 49,5 kDa) e GST- Δ NIT2 (aproximadamente 69 kDa, massa molecular teórica de 60 kDa) também foram visualizadas nos extratos celulares dos clones analisados após indução com IPTG. Quanto à solubilidade dessas proteínas, observamos que ambas foram produzidas na forma solúvel

e insolúvel. A produção de todas as proteínas recombinantes foi confirmada por *Western blot* utilizando os anticorpos anti-His e anti-GST (dados não mostrados).

Assim, optamos por seguir os ensaios de purificação em pequena e/ou larga escala primeiramente com as proteínas fusionadas à cauda de poli-His.

6.2. Produção e Purificação em pequena escala

Com o objetivo de obtermos proteínas recombinantes puras para os ensaios de ligação ao DNA (EMSA), a purificação da proteína His- Δ PACC foi realizada utilizando-se uma resina de Ni-NTA agarose, a qual nos permite purificar uma proteína rapidamente utilizando uma centrífuga de bancada. A figura 17A mostra um gel de SDS-PAGE 12% das etapas de purificação da proteína His- Δ PACC, em que podemos observar a obtenção da proteína recombinante com bom grau de pureza. A fração eluída com 300 mM de imidazol (E2) apresentou maior pureza em relação à fração E1 (eluição com 100 mM de imidazol). A proteína dializada (D2), portanto, apresentou maior pureza que a fração D1. Na figura 17B é mostrado o resultado de *Western blot* das etapas de purificação usando anticorpo anti-His, confirmando a produção da proteína His- Δ PACC.

Este tipo de purificação (em resina de Ni-NTA agarose) não funcionou bem para as proteínas His-CRE-1 e His- Δ NIT2. As frações protéicas foram eluídas com bastante contaminação e com baixo rendimento (dados não mostrados). Tais proteínas foram então purificadas por cromatografia de afinidade em coluna His-Trap (GE).

6.3. Purificação de proteína recombinante em maior escala

A proteína PACC também foi produzida em maior escala com o objetivo de obtermos uma grande quantidade de proteína pura para a síntese de anticorpos. A purificação foi feita por cromatografia de afinidade em coluna His-Trap em um sistema de purificação AKTA Prime. A figura 18 mostra as etapas de purificação da proteína His- Δ PACC, a qual foi produzida em alta quantidade a partir do extrato solúvel protéico. O cromatograma (figura 18A) mostra que não houve a formação de um pico específico referente às frações em que a proteína recombinante foi eluída. Dessa forma, amostras de 40 frações eluídas foram avaliadas em gel de SDS-PAGE 12%. A figura 18B mostra o perfil das frações 9 a 25. Verificou-se que a proteína recombinante His- Δ PACC começou a ser eluída a partir da fração 9. Embora a proteína não tenha sido obtida com um alto grau de pureza, três preparações foram dialisadas e encaminhadas para a produção de anticorpos em coelho. A

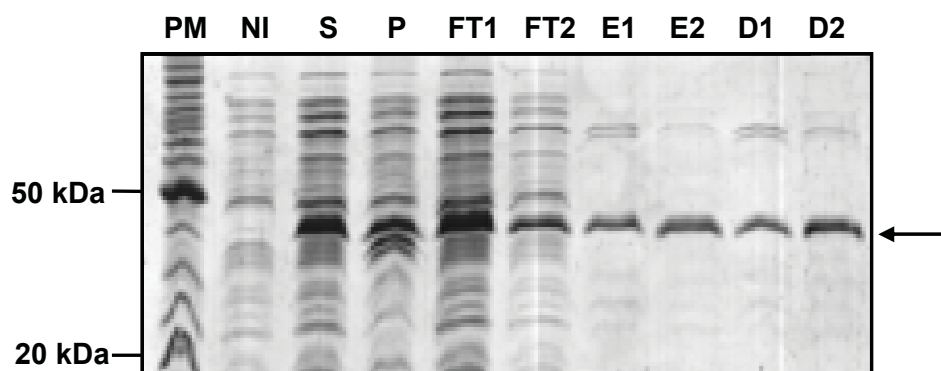
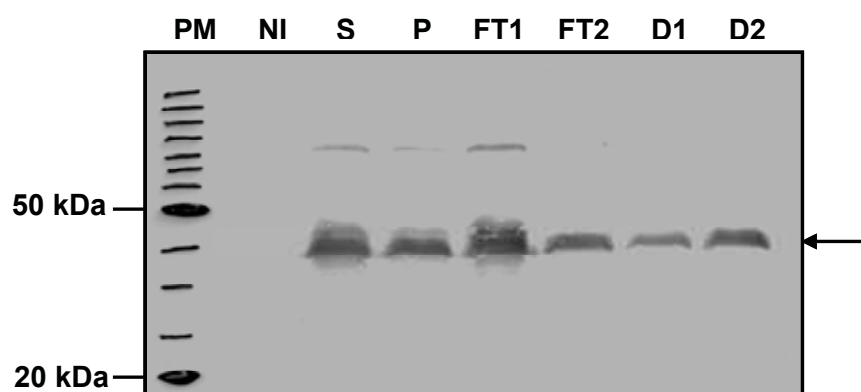
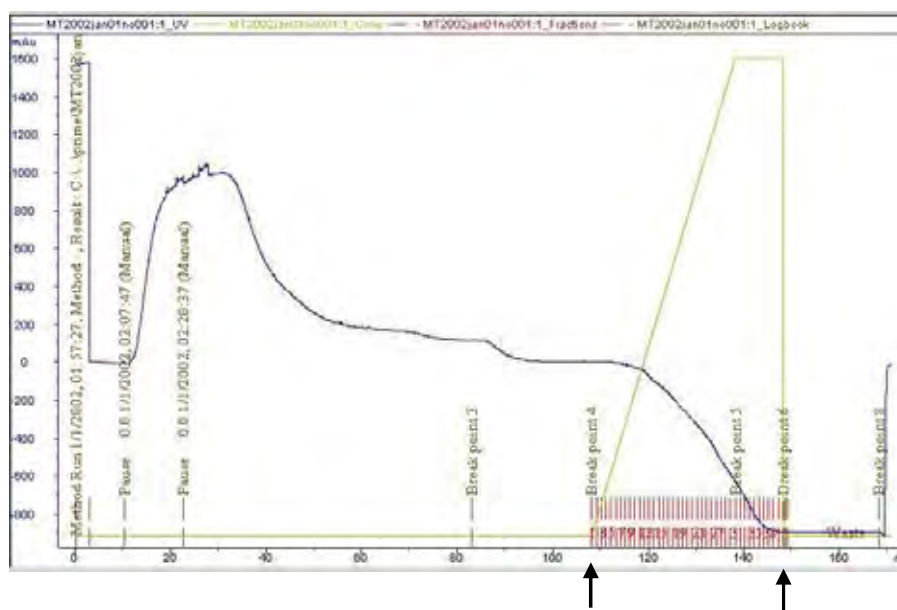
A**B**

Figura 17 – Purificação da proteína His- Δ PACC produzida em *E. coli* em pequena escala. Uma quantidade correspondente a 20 μ g de proteína foi aplicada em cada canaleta. PM, peso molecular, NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado, FT1 e FT2, *flow through*, E1 e E2, eluição com 100 e 300 mM de imidazol, respectivamente, D1 e D2, diálise das amostras E1 e E2, respectivamente. **(A)** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12% corado com Coomassie Blue R-250. **(B)** *Western blot* utilizando anticorpo anti-His.

A



B

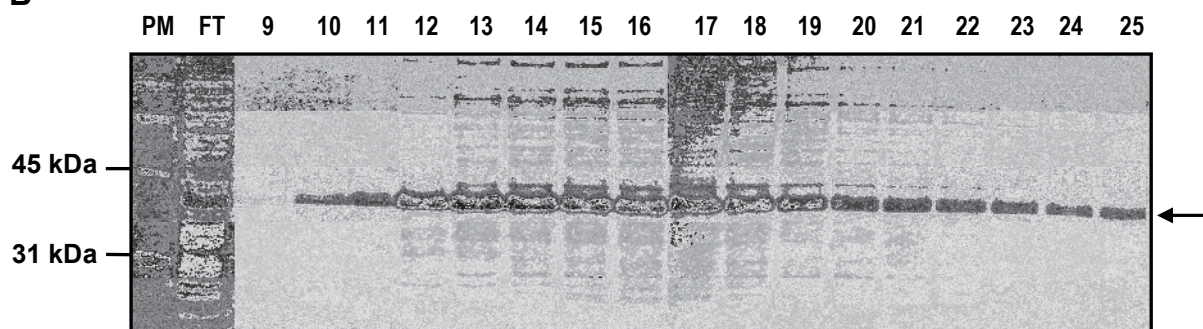


Figura 18 – Purificação e análise da proteína His- Δ PACC produzida em *E. coli* BL21 em maior escala. **(A)** Cromatograma das etapas de purificação da proteína em coluna His-Trap utilizando um gradiente linear de 0,05 a 1 M de imidazol. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** Análise eletroforética de 17 frações eluídas (9 a 25). PM, peso molecular, FT, *flow through*. Eletroforese realizada em SDS-PAGE, gel de poliácridamida 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

titulação do anticorpo foi verificada contra a proteína recombinante por *Western blot* (1:500) (dados não mostrados).

Da mesma maneira, a proteína CRE-1 foi produzida em maior escala na forma recombinante em *E. coli* linhagem Rosetta. A figura 19 mostra as etapas de purificação da proteína His-CRE-1, a qual também foi produzida em alta quantidade a partir do extrato solúvel protéico. O cromatograma (figura 19A) mostra que também não houve a formação de um pico específico referente às frações em que a proteína recombinante foi eluída. Amostras de 16 frações eluídas foram separadas em gel de SDS-PAGE 12% (figura 19B). Verificou-se que a proteína recombinante His-CRE-1 começou a ser eluída a partir da primeira fração e com altos níveis de contaminação. As frações 8 a 16 foram separadas e reaplicadas em coluna His-Trap após diluição (5X) com tampão sem imidazol, reduzindo a quantidade de proteínas contaminantes. Algumas frações foram unidas, concentradas em Amicon (MiliPore) e as frações resultantes (figura 19C) foram utilizadas nos experimentos de EMSA.

A proteína NIT2 truncada foi produzida na forma recombinante em *E. coli* Rosetta. A figura 19 mostra as etapas de purificação da proteína His- Δ NIT2, a qual foi produzida em boa quantidade a partir do extrato solúvel protéico. O cromatograma (figura 20A) mostra que houve a formação de dois picos durante a eluição das frações. Amostras de 30 frações eluídas foram separadas em gel de SDS-PAGE 12%. A figura 20B mostra as 17 primeiras frações. A proteína His- Δ NIT2 começou a ser eluída a partir da primeira fração e com alto grau de contaminação. As frações 8 a 14 foram homogeneizadas, diluídas 5X em tampão sem imidazol, e purificadas novamente em resina de cobalto (His-Select® Cobalt Affinity Gel, Sigma). As novas frações purificadas (figura 20C) foram utilizadas em experimentos de EMSA, porém, o alto grau de contaminação persistente não permitiu ainda preparar amostras para serem enviadas para a produção de anticorpos.

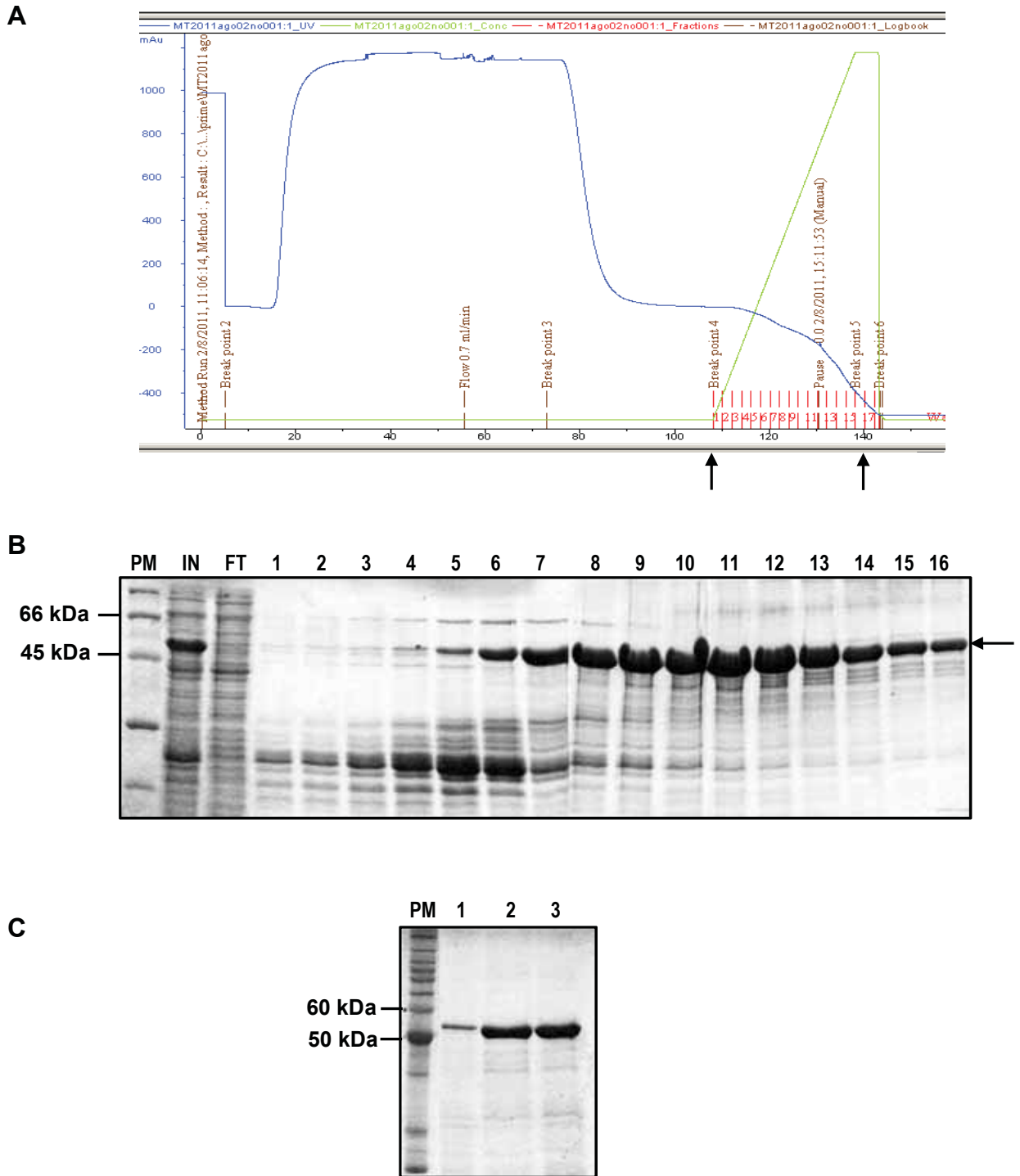


Figura 19 – Purificação e análise da proteína His-CRE1 produzida em *E. coli* Rosetta em maior escala. **(A)** Cromatograma das etapas de purificação da proteína em coluna His-Trap utilizando um gradiente linear de 50 a 500 mM de imidazol. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** Análise eletroforética de 16 frações eluídas. PM, peso molecular, IN, *input*, FT, *flow through*. Eletroforese realizada em SDS-PAGE, gel de poliácridamida 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. **(C)** Preparações da proteína His-ΔCRE1 após segunda cromatografia em coluna His-Trap. PM, peso molecular. Eletroforese realizada em SDS-PAGE, gel de poliácridamida 12% corado com Comassie Brilliant Blue R-250.

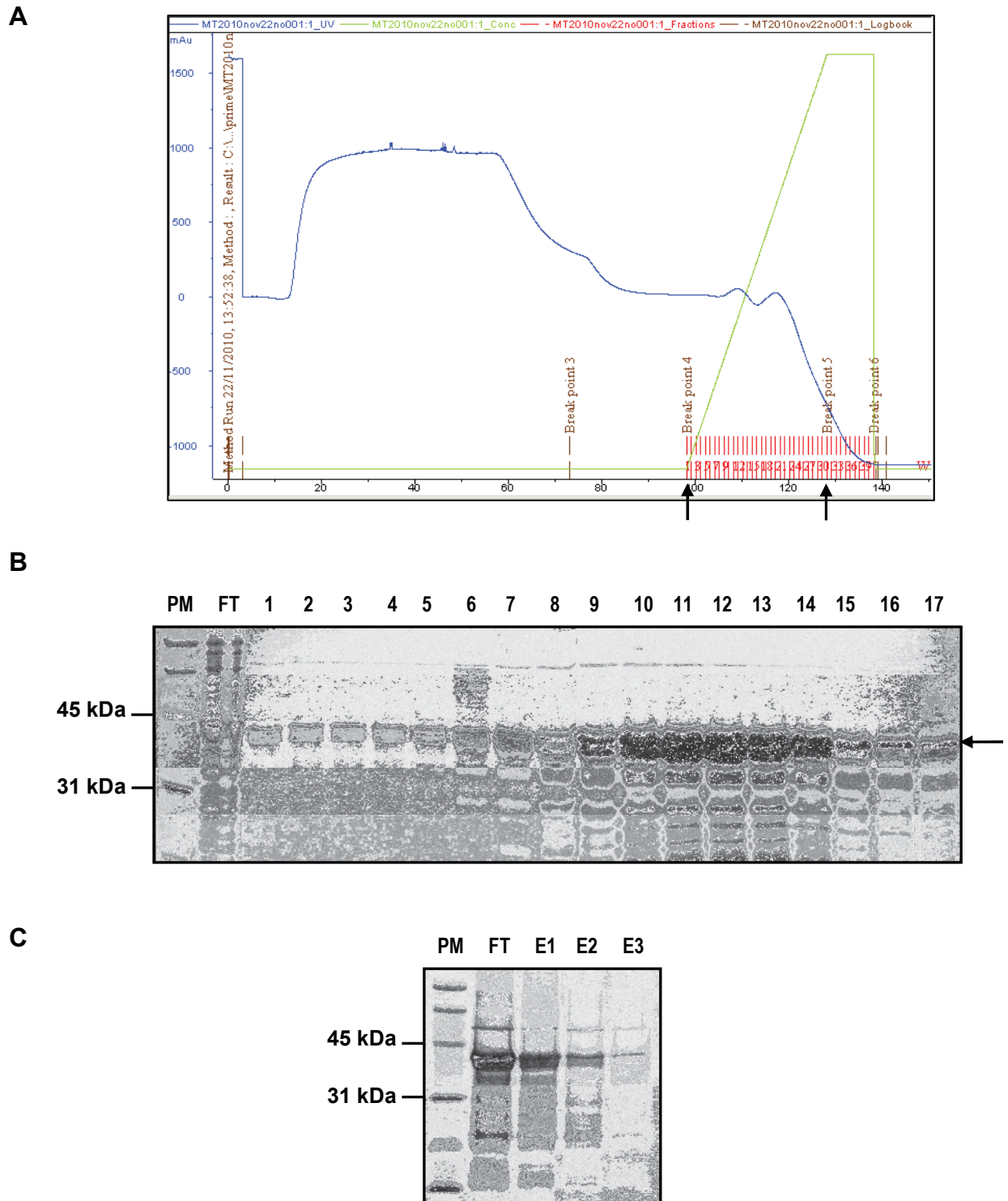


Figura 20 – Purificação e análise da proteína His- Δ NIT2 produzida em *E. coli* Rosetta em maior escala. **(A)** Cromatograma das etapas de purificação da proteína em coluna His-Trap utilizando um gradiente linear de 50 a 500 mM de imidazol. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** Análise eletroforética de 17 frações eluídas **(C)** Purificação da proteína His- Δ NIT2 em resina de cobalto. E1, E2 e E3, eluição com 300, 500 mM e 1 M de imidazol, respectivamente. PM, peso molecular, FT, *flow through*. Eletroforese realizada em SDS-PAGE, gel de poliacrilamida 12% corado com Comassie Brilliant Blue R-250.

Resultados - Parte 2

7. Caracterização funcional do fator de transcrição PACC

Como descrito anteriormente, a regulação de genes pelo fator de transcrição PacC tem sido extensivamente investigada em fungos e leveduras. Uma vez encontrado um elemento *cis* específico para a ligação da proteína PacC na região promotora do gene *gsn* de *N. crassa* (GONÇALVES et al., 2011), decidimos investigar a participação deste fator de transcrição na regulação do metabolismo do glicogênio. Como a linhagem mutante na ORF NCU00090 (FGSC#11397) não foi corretamente nocauteada (como apresentado no item 4), uma nova linhagem mutante (*pacC^{KO}*) foi construída pelo Dr. Renato M. de Paula, de acordo com os procedimentos descritos por Ninomiya et al. (2004), e utilizada, juntamente com a linhagem selvagem, nos ensaios mostrados a seguir.

8. Análise morfológica das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* em diferentes condições de pH

8.1. Determinação da taxa de crescimento linear

A determinação da taxa de crescimento linear das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* foi realizada com base na velocidade de extensão da hifas em *race tubes*. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura 21 mostra as taxas de crescimento das duas linhagens. Os resultados mostram claramente que ambas as linhagens cresceram preferencialmente em condições ácidas, e que em pH alcalino, a extensão das hifas foi prejudicada. A linhagem mutante *pacC^{KO}* apresentou um crescimento favorável em pH 4,2, enquanto que nos pHs 5,8 e 7,8, a progressão das hifas foi menor em comparação à linhagem selvagem. Estes resultados mostram que a proteína PACC possui um papel importante no desenvolvimento do fungo *N. crassa* em condições fisiológicas e em pH alcalino.

8.2. Análise de crescimento radial

A análise de crescimento radial foi feita em placas contendo meio VM e VM suplementado com extrato de levedo nos pHs 4,2, 5,8 e 7,8. Células (10^7 conídios/mL) das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* foram inoculadas no centro das placas e incubadas no claro/escuro, a 30 °C por 24 h. A figura 22A mostra o resultado do crescimento radial

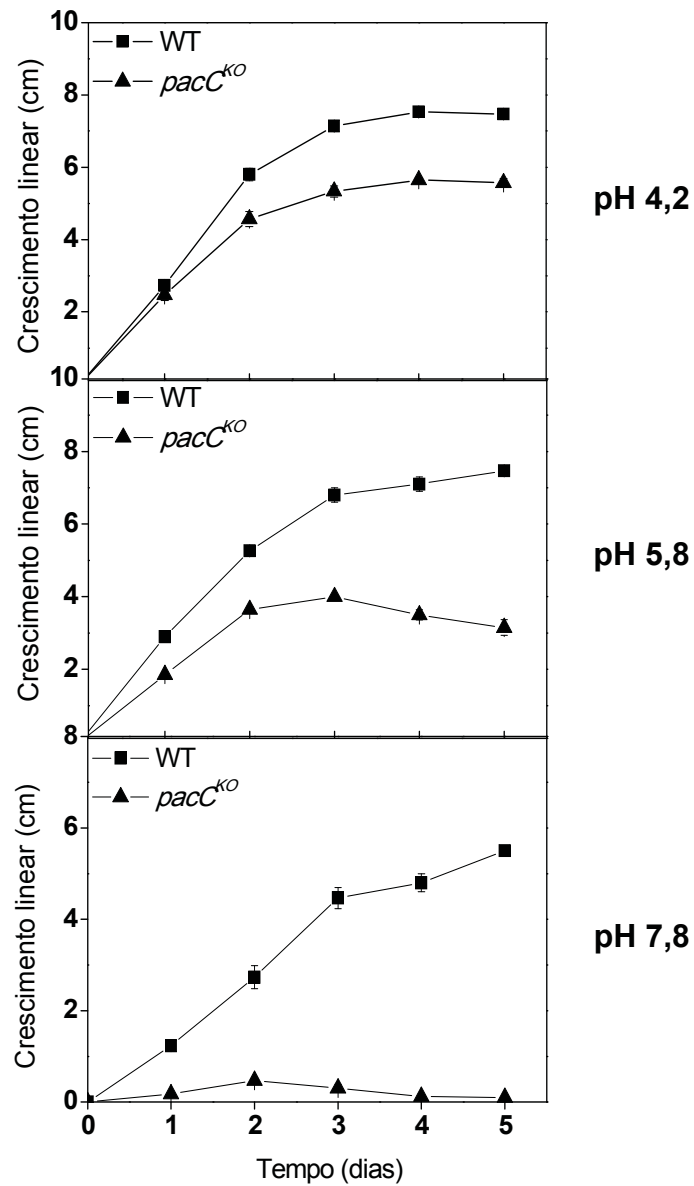
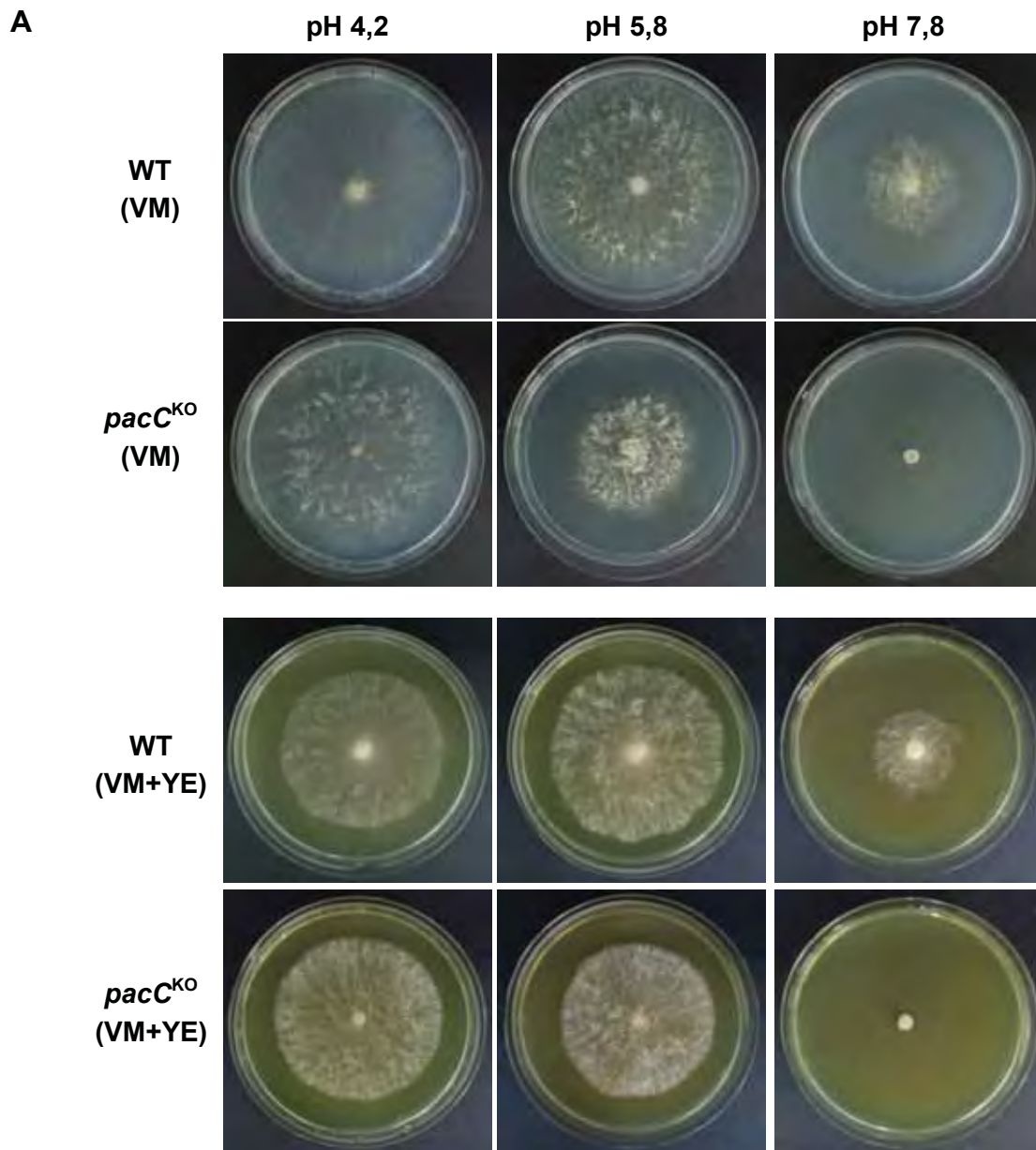


Figura 21 - Análise do crescimento linear das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* em *race tubes*, em diferentes condições de pH. As células foram inoculadas em uma das extremidades e o crescimento foi medido através da marcação da frente micelial a cada 24 h, no escuro, em temperatura ambiente.



B

Linhagens	pH 4,2		pH 5,8		pH 7,8	
	VM	VM+YE	VM	VM+YE	VM	VM+YE
WT	7,90± 0,17	5,65±0,07	8,2±0,46	8,07±0,72	3,73± 0,23	3,20±0,00
<i>pacC</i> ^{KO}	7,83±0,06	6,00±0,14	4,80±0,40	5,73±0,52	0,70± 0,20	0,65±0,07

Figura 22 – Análise de crescimento radial. **(A)** Crescimento das linhagens selvagem e mutante *pacC*^{KO} em diferentes condições de pH em placas contendo meio VM e VM adicionado de extrato de levedo (VM + YE). **(B)** Tabela contendo os valores dos diâmetros medidos das colônias e o desvio padrão (±), em centímetros.

das duas linhagens. Os diâmetros das colônias foram medidos e os valores apresentados na tabela (figura 22B). Novamente, podemos observar que, comparada com a linhagem selvagem, a linhagem mutante cresceu melhor no pH 4,2, enquanto que nos pHs 5,8 e 7,8, o crescimento radial foi afetado.

8.3. Análise morfológica

Uma análise morfológica foi realizada nas linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* após 9 dias de incubação em Erlenmeyers contendo meio VM. Diferenças morfológicas foram observadas entre as duas linhagens, sendo que a linhagem mutante cresceu muito lentamente, com formação de hifas curtas e baixa conidiação. Além disso, foi observada que na linhagem *pacC^{KO}* ocorreu a formação de manchas marrons, caracterizadas como “melanização”. A figura 23A mostra uma comparação morfológica entre as duas linhagens.

As extremidades das hifas crescidas em placas contendo meio VM e VM+YE nos pHs 4,2, 5,8 e 7,8 (24 h) foram observadas em lupa e fotografadas e estão apresentadas na figura 23B. Foi observado que em pH 4,2, as hifas da linhagem *pacC^{KO}* apresentaram um aspecto estrangulado, ao passo que na linhagem selvagem, as hifas estavam mais finas que as crescidas em pH 5,8. Em pH alcalino, nas duas linhagens as hifas mostraram serem mais curtas do que as crescidas em pH fisiológico, e a extremidade de algumas hifas da linhagem mutante se enrolaram e ficaram curvadas para trás (descrito na literatura como *curledback*).

9. Determinação do conteúdo de glicogênio durante o estresse de pH

As linhagens selvagem e *pacC^{KO}* foram analisadas durante o crescimento vegetativo em meio mínimo de Vogel líquido (pH 5,8) e após submissão ao estresse de pH (transferência de pH 5,8 para 4,2 e 7,8). Na linhagem selvagem, o micélio submetido ao estresse de pH foi retornado ao pH fisiológico normal, caracterizando a situação de recuperação do estresse (RE). Os micélios foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio e para a extração do RNA total. A dosagem de glicogênio presente nos extratos celulares foi feita da mesma forma que a descrita no item 1.1.

Na linhagem selvagem, foi verificado que na condição de estresse em pH ácido (4,2), o conteúdo de glicogênio aumentou gradativamente em relação ao tempo em que o micélio foi exposto, como mostra a figura 24A. Quando o micélio foi transferido novamente para o meio com pH fisiológico normal (RE), o nível de glicogênio reduziu, porém não voltou ao mesmo valor do tempo inicial do experimento (controle), mesmo após 120 min de

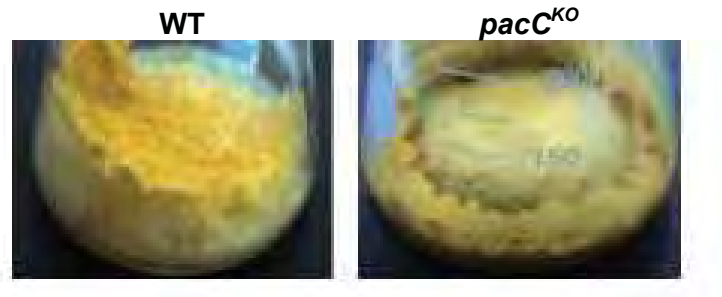
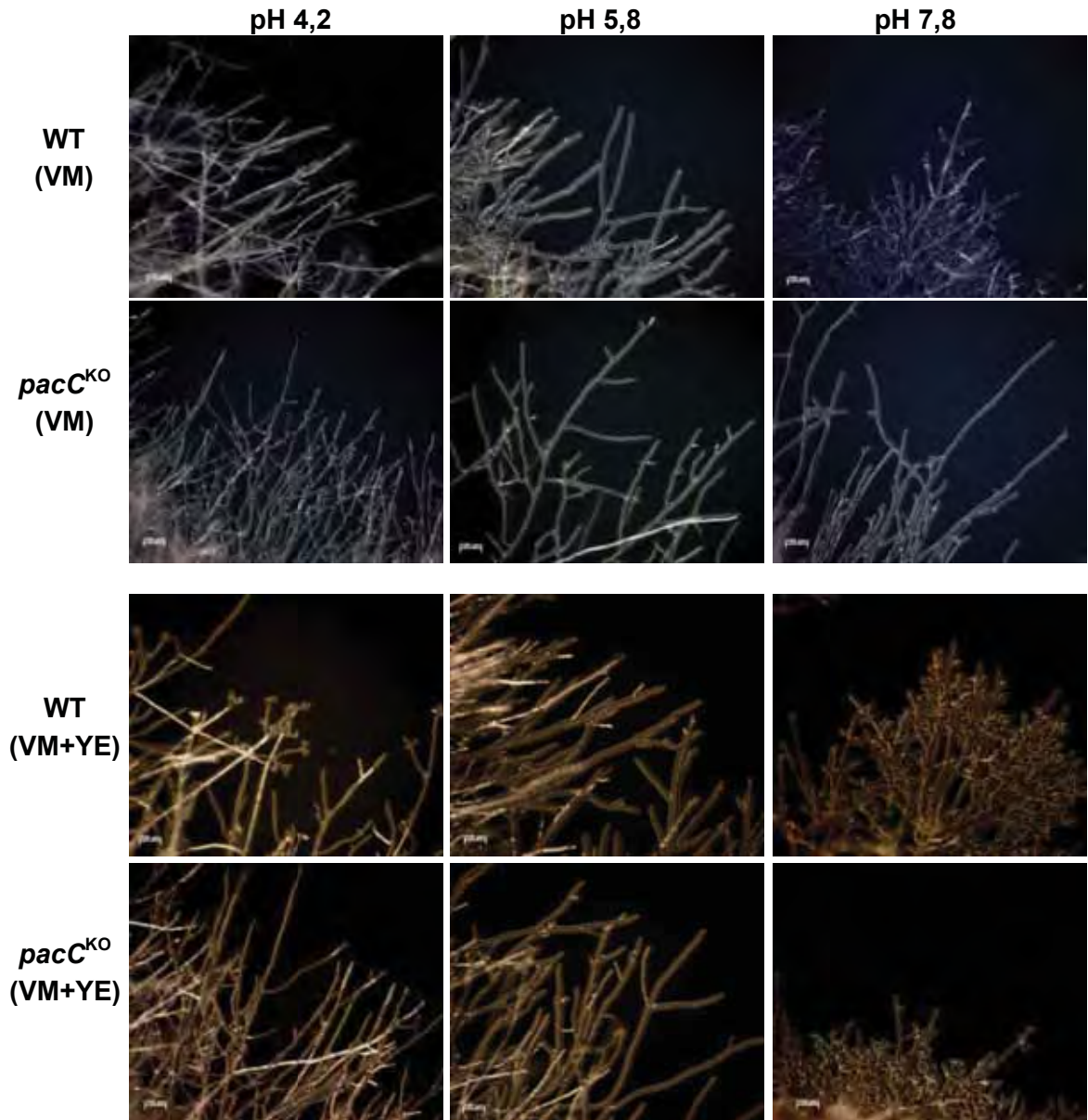
A**B**

Figura 23 – (A) Análise morfológica das linhagens selvagem e mutante *pacC^{KO}* crescidas em meio VM após 9 dias de incubação. **(B)** Análise da ponta das hifas das duas linhagens crescidas em placas contendo meio VM e VM + YE em diferentes condições de pH. Imagens fotografadas em um aumento de 80X (Estereomicroscópio trinocular Zeiss).

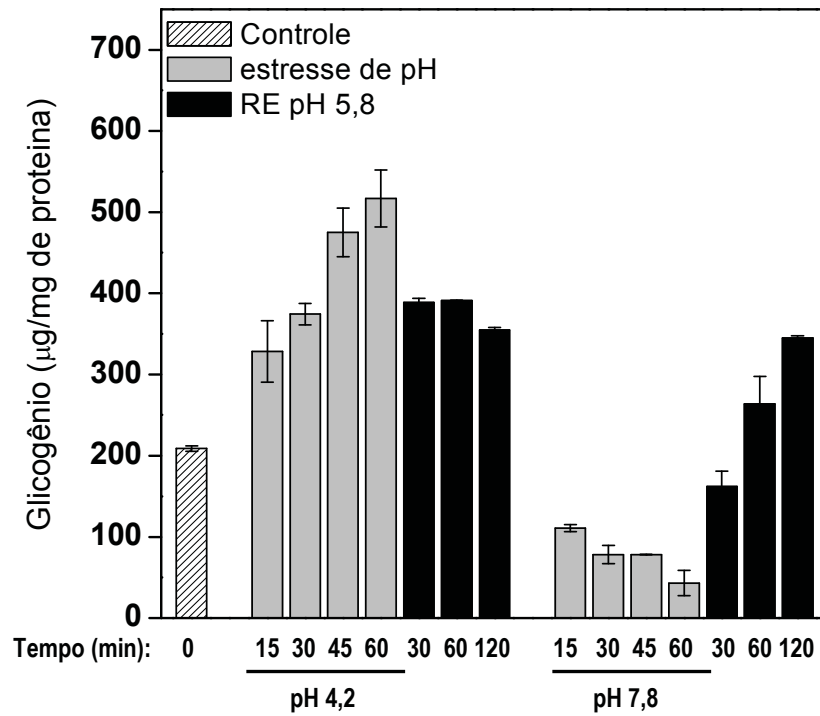
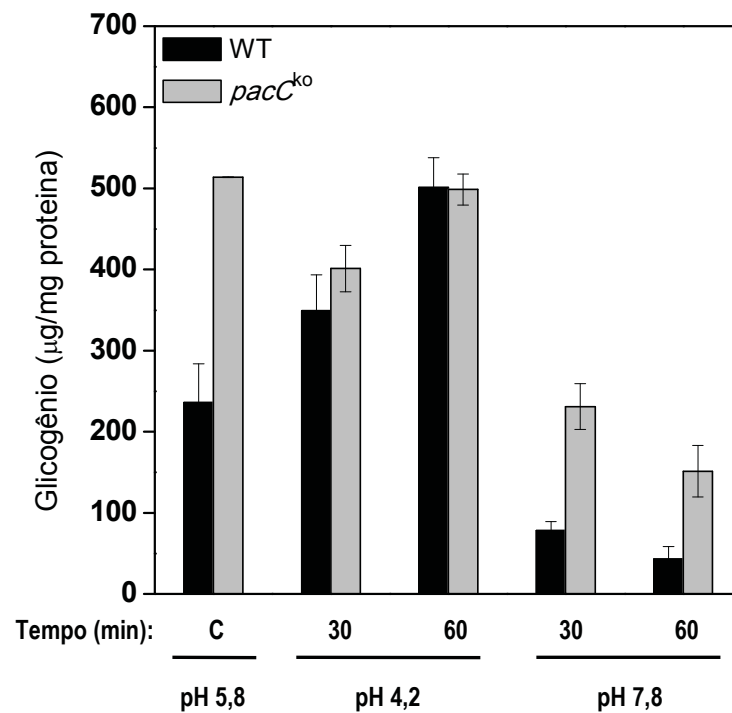
A**B**

Figura 24 – Concentração de glicogênio durante o estresse de pH. As amostras foram crescidas em pH 5,8 durante 24 h e transferidas para meios em pH 4,2 e 7,8. **(A)** Linhagem selvagem. RE, recuperação de pH. **(B)** Comparação do conteúdo de glicogênio nas linhagens selvagem e *pacC*^{ko}. O conteúdo de glicogênio foi quantificado como descrito em Materiais e Métodos.

recuperação de pH. Já na condição de estresse em pH alcalino (7,8), o conteúdo de glicogênio da linhagem selvagem diminuiu gradativamente em relação ao tempo de exposição (figura 24A). Quando o micélio foi novamente transferido para meio de pH fisiológico normal (5,8), os níveis de glicogênio recuperaram os níveis iniciais logo nos primeiros 30 min, continuando a aumentar após esse período.

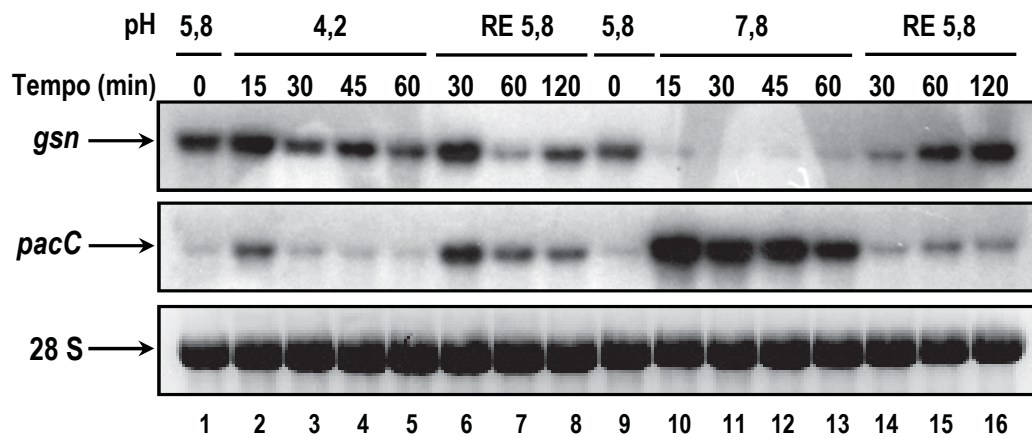
O conteúdo de glicogênio também foi avaliado na linhagem mutante *pacC*^{KO} submetida ao estresse de pH (figura 24B). Foi observado que mesmo durante o crescimento vegetativo (controle, 0) um elevado nível de glicogênio foi encontrado na linhagem mutante quando comparada à linhagem selvagem. Em pH ácido (4,2), ambas as linhagem acumularam quantidades similares de glicogênio, e em pH alcalino (7,8), o conteúdo de glicogênio diminuiu quando comparado ao pH normal (5,8), porém com menor intensidade na linhagem mutante. Estes resultados mostraram que na linhagem mutante *pacC*^{KO} ocorreu uma desregulação do acúmulo de glicogênio, tanto durante o crescimento vegetativo quanto no estresse de pH alcalino. Os resultados do estresse ácido dão evidências de que o fator de transcrição PACC possa não estar envolvido com a regulação do metabolismo do glicogênio neste pH.

10. Análise da expressão dos genes *gsn*, *gpn* e *pacC* durante o estresse de pH

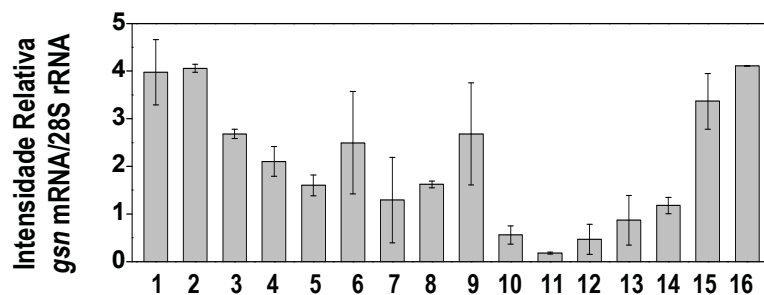
O RNA total das linhagens selvagem e *pacC*^{KO} extraído dos micélios submetidos ao estresse de pH (descrito no item anterior) foi analisado quanto à expressão dos genes que codificam a glicogênio sintase (*gsn*), glicogênio fosforilase (*gpn*) e o fator de transcrição PACC (*pacC*) por *Northern blot*, utilizando-se o RNA ribossômico 28S como controle de normalização. O objetivo desse experimento foi verificar se o padrão de acúmulo de glicogênio no ensaio anterior ocorreu devido à expressão diferenciada do gene *gsn/gpn*, bem como levantar hipóteses se o fator de transcrição PACC poderia estar envolvido com a regulação da expressão dos mesmos.

A figura 25 mostra a expressão dos genes *gsn* e *pacC* na linhagem selvagem, onde podemos ver a presença de bandas únicas de hibridização (3,0 kb para ambos os transcritos), as quais correspondem ao tamanho dos transcritos *gsn* e *pacC*, respectivamente. Foi observada uma redução na expressão do gene *gsn* após o estresse de pH, tanto ácido como alcalino, sendo mais acentuada no pH 7,8. Notou-se também que após o estresse alcalino, o transcrito *gsn* retornou aos níveis normais assim que o micélio foi transferido para o meio de recuperação (pH fisiológico 5,8). O resultado obtido em relação à expressão do gene *gsn* durante o estresse alcalino e sua recuperação foi coincidente ao

A



B



C

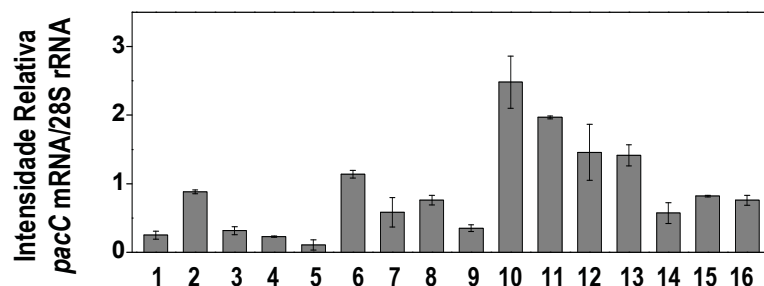


Figura 25 – Expressão dos genes *gsn* e *pacC* na linhagem selvagem durante o estresse de pH por *Northern blot*. Fragmentos dos genes *gsn* e *pacC* marcados radiativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP foram utilizados como sonda. (A) Auto-radiografia das membranas. O micélio crescido a 30°C/24 h, (tempo 0, pH 5,8) foi dividido em duas amostras iguais e transferidas para meio VM de pH 4,2 e 7,8. Amostras foram coletadas após 15, 30, 45 e 60 min de estresse ácido e alcalino, e o micélio resultante foi transferido para meio VM de pH 5,8 (RE, recuperação). Amostras foram coletadas após 30, 60 e 120 min de recuperação de pH. O perfil do rRNA 28S foi visualizado com brometo de etídio. (B) Normalização da expressão do gene *gsn* utilizando o software ImageJ. (C) Normalização da expressão do gene *pacC* utilizando o software ImageJ.

observado no ensaio de acúmulo de glicogênio (mostrado na figura 24A), levando-nos a crer que o baixo acúmulo de glicogênio em pH alcalino possa ser devido à reduzida expressão do gene *gsn*. O mesmo não pode ser afirmado em relação ao estresse ácido, já que não foi observada nenhuma correspondência entre o conteúdo de glicogênio e a expressão do gene *gsn*.

Na figura 25 também pode ser observado que o transcrito *pacC* manteve os níveis basais de expressão em pH 4,2, enquanto que em pH 7,8, níveis altíssimos do transcrito foram encontrados durante toda a condição de estresse. Interessantemente, a quantidade do transcrito *pacC* retornou ao normal logo após a transferência do micélio para meio de recuperação (pH 5,8). Em conjunto, esses resultados sugerem que em meio de pH alcalino ocorre um aumento na expressão de *pacC*, levando a uma redução na expressão do gene *gsn*, o que explica o baixo conteúdo de glicogênio observado nesta condição de pH. Portanto, baseado nestes resultados podemos sugerir que o gene *gsn* é ácido-específico.

A figura 26 mostra a expressão dos genes *gsn* e *gpn* na linhagem mutante *pacC^{KO}* em comparação com a linhagem selvagem. Foi observado que a expressão do gene *gsn* foi muito maior na linhagem mutante em todos os pH analisados, inclusive com níveis elevados do transcrito quando o micélio foi submetido ao pH alcalino. Este resultado indica que a ausência do fator de transcrição PACC na linhagem mutante está associada à desregulação do gene *gsn* na condição de estresse estudada. Já para a expressão do gene *gpn*, a figura mostra que o perfil de expressão nas duas linhagens foi similar nos diferentes pH analisados, onde ocorreu uma diminuição na expressão do gene *gpn* durante o estresse de pH ácido e alcalino. Este resultado sugere que o gene *gpn* não seja regulado por pH, condizente com a ausência de *motifs* regulatórios para a proteína PACC no promotor *gpn*.

11. Determinação do conteúdo de glicogênio durante o estresse de pH e choque térmico

O conteúdo de glicogênio na linhagem selvagem foi também analisado durante o estresse de pH associado ao estresse térmico (transferência do micélio em pH 5,8, 30°C para os pHs 4,2, 5,8 e 7,8 a 45°C). Os micélios coletados foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio e para a extração do RNA total. Experimentos anteriores mostraram que na linhagem selvagem de *N. crassa* ocorre redução do conteúdo de glicogênio quando o fungo é submetido ao choque térmico (DE PAULA et al., 2002; NOVENTA-JORDÃO et al., 1996).

A figura 27A mostra que, na linhagem selvagem, o conteúdo de glicogênio diminuiu após o choque térmico em todos os três pH analisados. Foi observado que durante a

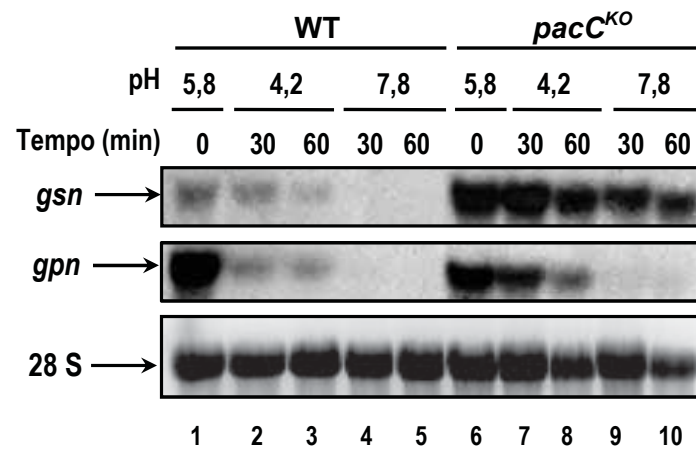
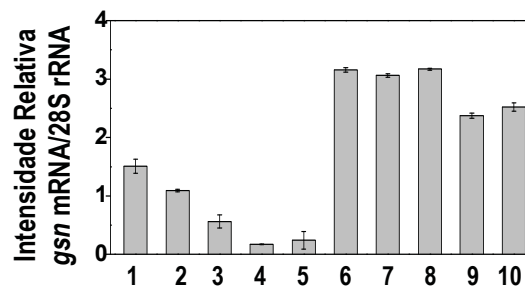
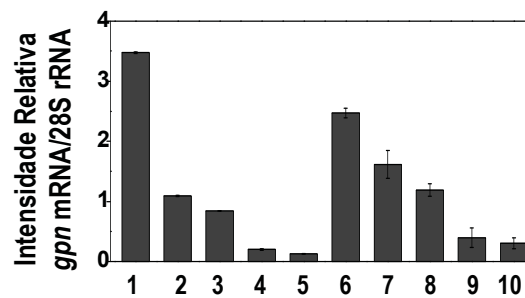
A**B****C**

Figura 26 – Expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e *pacC^{ko}* durante o estresse de pH por Northern blot. Fragmentos dos genes *gsn* e *gpn* marcados radiativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP foram utilizados como sonda. **(A)** Auto-radiografia das membranas. O micélio crescido a 30°C/24 h, (tempo 0, pH 5,8) foi dividido em duas amostras iguais e transferidas para meio VM de pH 4,2 e 7,8. Amostras foram coletadas após 30 e 60 minutos de estresse ácido e alcalino. O perfil do RNAr 28S visualizado com brometo de etídio. **(B)** Normalização da expressão do gene *gsn* utilizando o software ImageJ. **(C)** Normalização da expressão do gene *gpn* utilizando o software ImageJ.

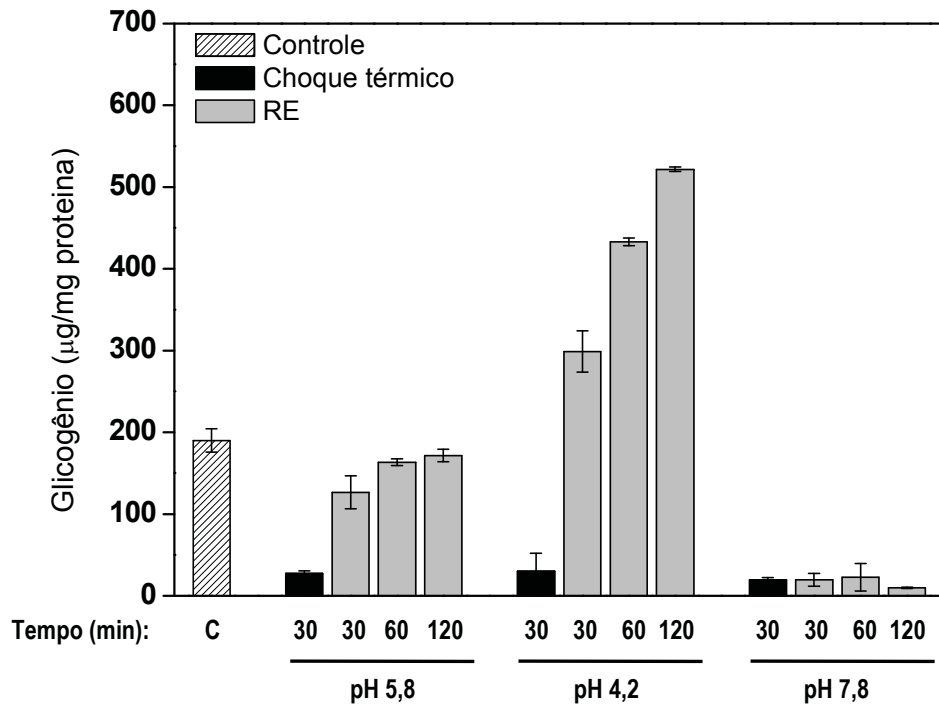
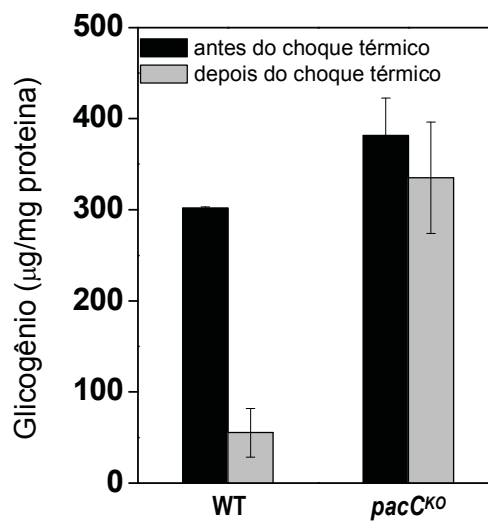
A**B**

Figura 27 – (A) Concentração de glicogênio da linhagem selvagem durante o estresse de pH e choque térmico combinados. Amostras foram crescidas em pH 5,8, 30°C durante 24 h e transferidas para meio em pH 4,2, 5,8 e 7,8 pré-aquecidos a 45°C por 30 min (choque térmico). Após esse período, os micélios remanescentes foram retornados para meio a 30°C, mantendo os respectivos valores de pH (RE, recuperação de temperatura). **(B)** Concentração de glicogênio nas linhagens selvagem e *pacC^{KO}* antes e depois do choque térmico em pH fisiológico normal. Amostras foram crescidas a 30°C durante 24 h e transferidas para meio pré-aquecido a 45°C por 30 min (choque térmico). O conteúdo de glicogênio foi quantificado como descrito em Materiais e Métodos.

recuperação de temperatura, o nível de glicogênio em pH 5,8 retornou ao normal após 120 min de incubação, e em pH 4,2, o nível do carboidrato continuou a aumentar, apresentando o mesmo perfil observado na figura 24A. Em pH alcalino (7,8), os níveis de glicogênio não foram recuperados após o retorno à temperatura normal. É importante salientar que o micélio continuou em pH alcalino, concordando com os resultados apresentados na figura 24A. De uma forma geral, o estresse choque térmico parece influenciar mais fortemente na regulação do metabolismo do glicogênio do que o estresse de pH.

O conteúdo de glicogênio também foi avaliado na linhagem mutante *pacC*^{KO} submetida ao choque térmico, porém em pH fisiológico normal (figura 27B). Elevados níveis de glicogênio foram encontrados na linhagem mutante tanto antes como depois do choque térmico, em comparação à linhagem selvagem, sugerindo que PACC possa estar envolvido com o acúmulo de glicogênio durante o estresse térmico.

12. Análise da expressão dos genes *gsn* e *pacC* durante o estresse de pH e choque térmico combinados

O RNA total da linhagem selvagem extraído do micélio submetido ao estresse de pH e térmico foi analisado quanto à expressão dos genes *gsn* e *pacC*, por *Northern blot*, utilizando-se o RNA ribossômico 28S como controle de normalização. Na figura 28A pode ser visualizada uma redução acentuada do transcrito *gsn* na condição de choque térmico (CT) em todos os pHs analisados, assim como ocorreu no acúmulo de glicogênio na mesma situação estudada (figura 26). Nos pHs 4,2 e 5,8 os níveis do transcrito *gsn* retornaram ao normal após 120 minutos de recuperação de temperatura. Em pH 7,8, a expressão do gene *gsn* não mostrou recuperação após o retorno do micélio à temperatura fisiológica, assim como foi observado para o conteúdo de glicogênio mostrado na figura anterior.

A expressão do gene *pacC* também foi observada durante as duas situações de estresse combinadas (figura 28A). A expressão do gene *pacC* foi reprimida quando os micélios foram submetidos ao choque térmico nos três pHs analisados, similar ao observado para o gene *gsn*. Entretanto, diferentemente ao observado para *gsn*, os níveis do transcrito *pacC* foram recuperados nos micélios expostos aos três pH analisados.

A figura 28B mostra a expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e mutante *pacC*^{KO} durante o estresse térmico em pH fisiológico (5,8). Foi observado que tanto a expressão dos genes *gsn* e *gpn* diminuiu após o choque térmico nas duas linhagens, sendo que essa redução mostrou ser mais intensa na linhagem selvagem. A expressão do gene *gsn* na linhagem *pacC*^{KO} foi condizente com os resultados de acúmulo de glicogênio antes do choque térmico, apresentado na figura 27B.

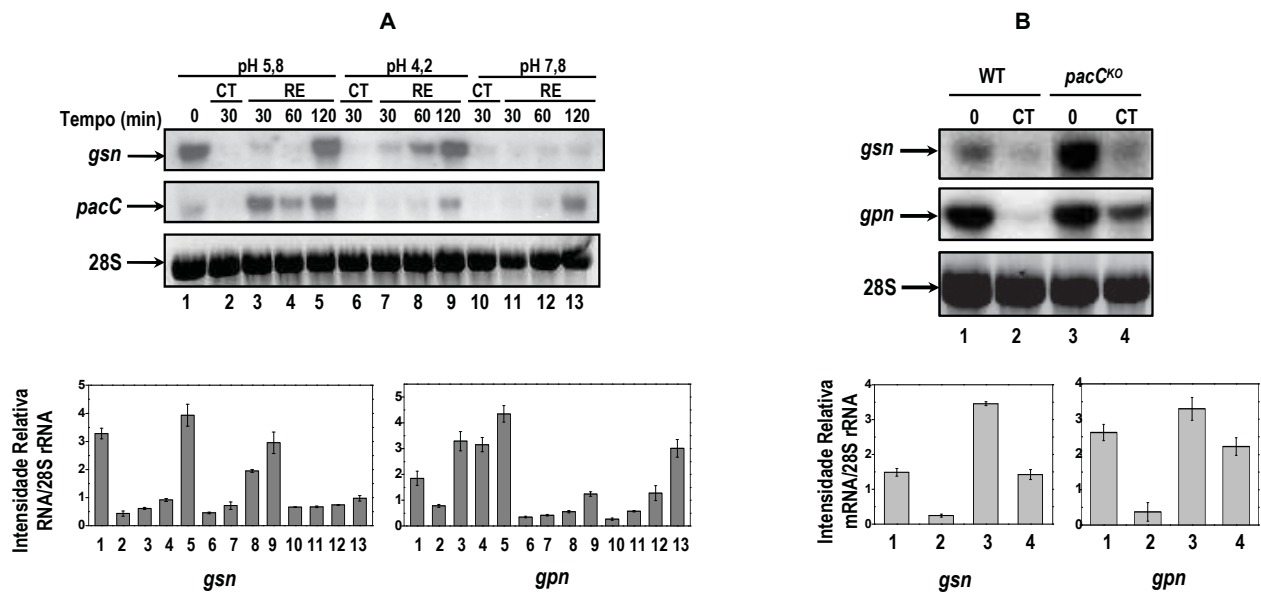


Figura 28 – Expressão gênica durante o estresse de pH e térmico combinados por *Northern blot*. Fragmentos dos genes *gsn*, *gpn* e *pacC* marcados radiativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP foram utilizados como sondas. A figura mostra as auto-radiografias das membranas e o perfil do RNAr 28S visualizado com brometo de etídio. **(A)** Expressão dos genes *gsn* e *pacC* na linhagem selvagem. O micélio crescido a 30°C/24 h, (tempo 0, pH 5,8) foi dividido em três amostras iguais e transferidas para meio VM de pH 4,2, 5,8 e 7,8 pré-aquecido a 45°C (CT). Amostras foram coletadas após 30 min de choque térmico, e o micélio resultante foi transferido para meios nos pHs correspondentes a 30°C (RE, recuperação de temperatura). **(B)** Expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e *pacC*^{KO} durante o choque térmico em pH fisiológico normal. O micélio crescido a 30°C/24 h, foi transferido para meio pré-aquecido a 45°C. Os gráficos mostram a normalização da expressão dos genes, utilizando o software ImageJ.

13. Análise de ligação DNA-proteína por EMSA

Os resultados obtidos com as dosagens de glicogênio e com a expressão do gene *gsn* reforçam a idéia de que o metabolismo do glicogênio seja regulado por pH, visto que o nível do transcrito *gsn* sofreu redução após estresse de pH alcalino, e retomou ao normal assim que as células estressadas foram re-incubadas em meio de pH fisiológico de crescimento (5,8). Para investigar se o fator de transcrição PACC, produzido em sua forma recombinante ou presente no extrato celular bruto, seria capaz de reconhecer e se ligar ao elemento *cis* PacC presente na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*, realizamos ensaios de retardamento em gel (EMSA). Fragmentos de DNA marcados contendo o *motif* PacC (311 e 146 bp) foram utilizados como sondas, e os mesmos fragmentos de DNA não-marcados (CE, competidor específico) e o oligonucleotídeo de fita dupla (OligoPacC), contendo o *motif* PacC, foram utilizados como competidores específicos.

13.1. Ensaio de ligação com a proteína His- Δ PACC recombinante

A interação DNA-proteína foi primeiramente analisada na presença de quantidades crescentes da proteína His- Δ PACC (0,5 a 3,0 μ g) com uma sonda de DNA de 311 pb contendo o *motif* PacC, mostrado no esquema da figura 29A. Observou-se a formação de complexos DNA-proteína de alto peso molecular, indicados por uma seta na figura 29B. A especificidade destes complexos pôde ser verificada quando a proteína foi incubada previamente (20 min) na presença do competidor específico (311 pb) não-marcado radioativamente, quando ocorreu uma diminuição da intensidade da banda, indicando que a proteína PACC recombinante pode estar se ligando especificamente ao fragmento de DNA. Em altas concentrações da proteína (3,0 μ g, canaletas 8 e 9), o competidor específico (7X de excesso molar à sonda) foi todo consumido, não podendo ser visualizada a diminuição da banda devido à competição (canaleta 9).

Um ensaio de competição foi realizado com a incubação de diferentes concentrações do CE (311 pb) e do OligoPacC dupla-fita (27 pb), previamente adicionados à sonda de DNA menor (146 pb) e utilizando 2,0 μ g de proteína recombinante. A figura 29C mostra a formação dos complexos DNA-proteína de alto peso molecular e a diminuição da intensidade das bandas com a adição dos competidores específicos. Enquanto que o competidor específico (CE) não foi capaz de remover todo o sinal do complexo, o OligoPacC apresentou esta capacidade, utilizando-se apenas a concentração de 1X de excesso molar à sonda. Esses resultados mostram que especificidade de ligação da proteína PACC ao seu elemento regulatório de DNA depende do tamanho do fragmento de DNA utilizado.

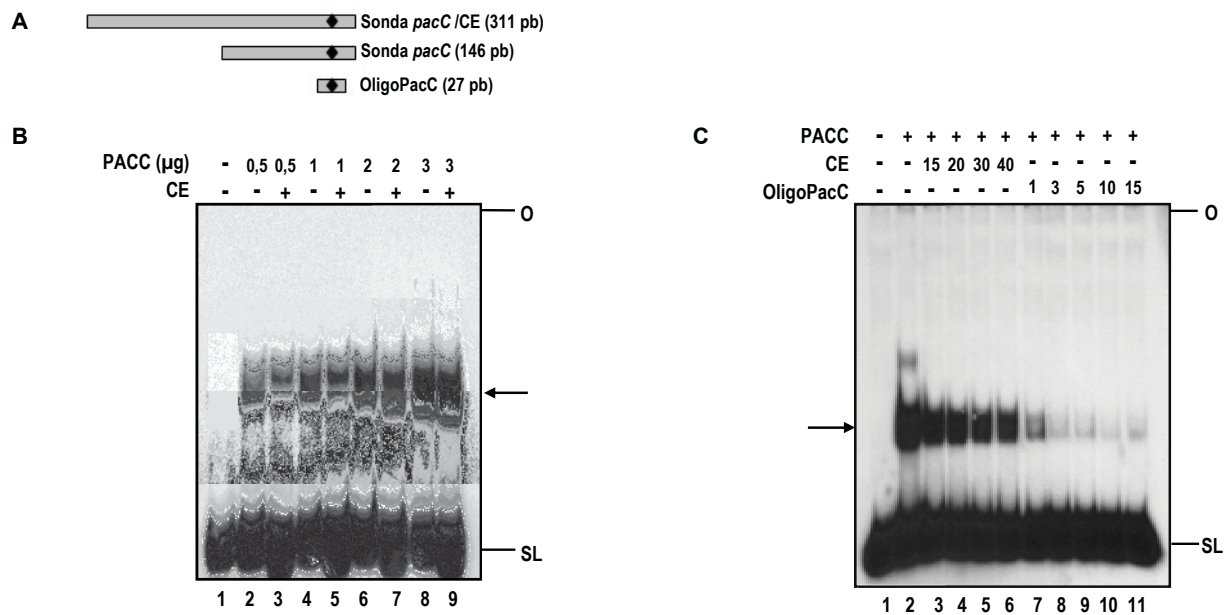


Figura 29 – Auto-radiografia dos ensaios de EMSA, mostrando da ligação da proteína His-ΔPACC ao fragmento do promotor *gsn*. **(A)** Desenho esquemático das sondas *pacC* (maior e menor), competidor específico e OligoPacC, e a respectiva posição do *motif* PacC (losango preto). **(B)** Quantidades crescentes da proteína foram adicionadas à sonda (311 pb). O competidor específico (CE) foi adicionado à reação na concentração de 7X de excesso molar à sonda (canaletas 3, 5, 7 e 9). Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. **(C)** Quantidades crescentes do competidor específico (CE, canaletas 3 a 6) e do OligoPacC (canaletas 7 a 11) foram testadas com 2,0 ug da proteína recombinante à sonda (146 pb). Canaleta 1, sonda sem adição de proteína; canaleta 2, adição de proteína recombinante à sonda, sem competidores específicos. O, origem do gel, SL, sonda livre. O complexo DNA-proteína é indicado pela seta. Eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

Para verificar se a diminuição do tamanho do competidor específico influencia na competição, outro ensaio foi realizado com a ligação de 1,0 e 2,0 µg da proteína His-ΔPACC com um competidor específico de tamanho menor (146 pb) e o com OligoPacC, adicionados 10 min previamente à sonda. Na figura 30B, foi mostrado que com apenas 10X de excesso molar, foi possível ver uma redução mais intensa do complexo com a utilização do CE de tamanho menor do que com a observada com o CE de tamanho maior (figura 29C). Esses resultados reforçam a hipótese de que as seqüências adjacentes ao *motif* PacC “mais expostas” são também importantes para a ligação da proteína ao seu sítio específico no DNA, assim como ocorreu com a competição utilizando o OligoPacC de dupla-fita.

Através da mutagênese sítio-dirigida, foi construída uma sonda contendo o *motif* PacC mutado (*mpacC*), onde os seis nucleotídeos da seqüência consenso foram alterados, como mostrado no desenho esquemático da figura 30A. A figura 30C mostra que ocorreu a perda da especificidade da ligação da proteína His-ΔPACC à sonda *mpacC*, onde o complexo DNA-proteína só pode ser visualizado com a utilização de 2,0 a 3,0 µg da proteína recombinante, enquanto que para a sonda não mutada (*pacC*) foi possível a visualização do complexo com apenas 0,5 µg da proteína (mostrado na figura 29B). A mutação do *motif* PacC confirma a especificidade da ligação da proteína ao fragmento de DNA.

Um ensaio de *superhift* foi também realizado para mostrar a interação DNA-proteína-anticorpo. Uma quantidade crescente de anticorpo α-PACC foi adicionado à proteína recombinante PACC 10 min antes da adição da sonda *pacC*. Na figura 30D foi observado que com o aumento da quantidade de anticorpo (10 e 20 µL, título 1:500), o complexo DNA-PACC-α-PACC foi deslocado no gel (canaletas 4 e 5) formando um complexo de peso molecular maior do que o somente formado pelo complexo DNA-proteína (canaleta 2). Todos estes dados, em conjunto, permitem concluir que a seqüência consenso 5'-GCCAAG-3' localizada na região 5'-flanqueadora do gene *gsn* é específica para a ligação da proteína recombinante PACC de *N. crassa*.

13.2. Ensaio EMSA com extrato celular bruto

O elemento regulatório PacC do promotor *gsn* foi analisado quanto à capacidade de ligação com proteínas presentes no extrato celular bruto preparado a partir de micélio crescido durante 24 h em pH fisiológico (5,8) e submetido ao estresse de pH alcalino (7,8). O extrato celular bruto das duas condições de crescimento foi fracionado por cromatografia de afinidade em coluna de Heparina-Sepharose, seguido de ensaios de retardamento em gel (EMSA), com o objetivo de identificar frações protéicas apresentando atividade de

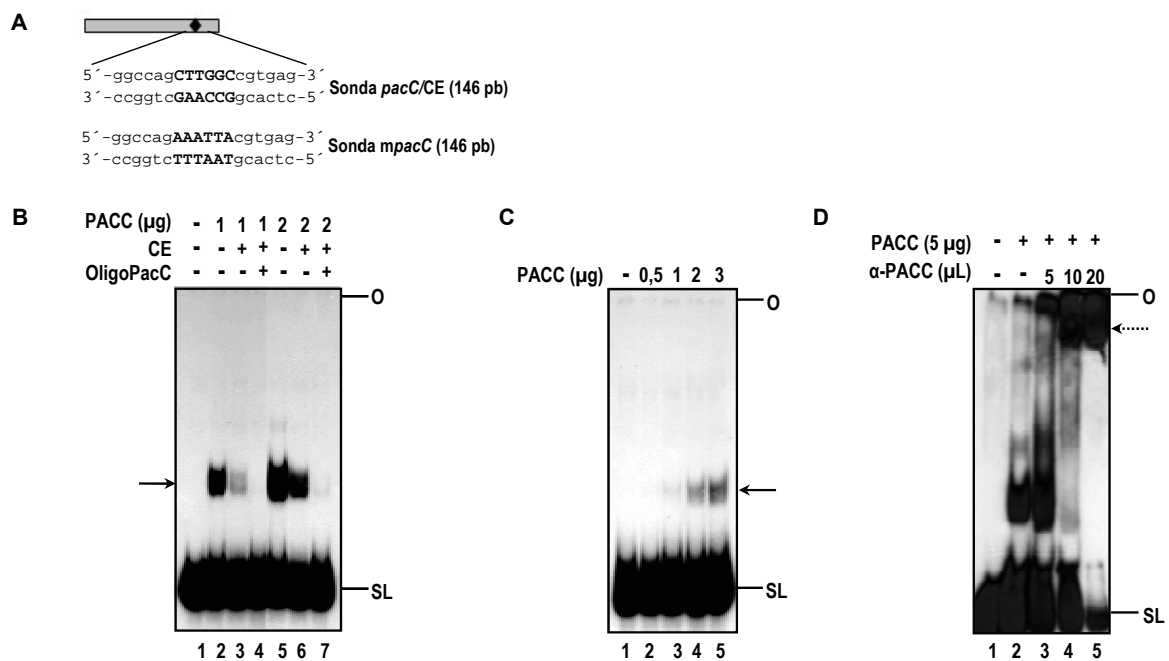


Figura 30 – Auto-radiografia dos ensaios de EMSA, mostrando a ligação da proteína His-ΔPACC ao fragmento do promotor *gsn*. **(A)** Desenho esquemático das sondas *pacC* e *mpacC*, mostrando a sequência *core* mutada, e a respectiva posição do *motif* PacC (losango preto). **(B)** Ensaio de competição com o competidor específico (CE) de 146 pb (10X) e com o OligoPacC (5X). Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. **(C)** Ensaio de ligação com quantidades crescentes da proteína PACC à sonda mutada (*mpacC*). Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. **(D)** Ensaio de ligação da proteína PACC a quantidades crescentes do anticorpo α-PACC adicionado 10 min antes da adição da sonda *pacC*. Canaleta 1, sonda sem adição de proteína ou anticorpo. O, origem do gel; SL, sonda livre. Os complexos DNA-proteína são indicados pelas setas e o *supershift* é indicado pela seta pontilhada. Eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

ligação DNA-proteína à sonda *pacC*.

Durante o fracionamento do extrato celular bruto do micélio crescido em pH 5,8, um pico contendo proteínas do extrato foi observado entre as frações 7 e 21 coletadas (cromatograma, figura 31A), as quais foram testadas em ensaios de EMSA, utilizando a sonda *pacC* (146 pb). A figura 31B mostra um ensaio de retardamento em gel (5% poliacrilamida) com as frações 12 a 19, em que pode ser visualizada a formação de complexos DNA-proteína de alto peso molecular a partir da fração 15, sendo mais intensa nas frações 17 a 19. As frações 16 a 19 foram então testadas novamente por EMSA, em maior quantidade (35 µg) e em gel de poliacrilamida 4%, na presença do competidor específico (CE) e do OligoPacC (10X, para ambos), adicionados 10 min previamente à sonda. A figura 32 mostra a auto-radiografia de um gel de EMSA, em que os complexos DNA-proteína específicos formados pelas frações 17 a 19 foram deslocados na presença do CE e do OligoPacC, sugerindo que a ligação de proteínas ao *motif* PacC ocorreu com extrato preparado de micélio crescido nas condições fisiológicas do fungo (pH 5,8).

Da mesma maneira, o extrato bruto protéico preparado a partir de micélio submetido ao estresse alcalino (7,8, 1h) foi fracionado em coluna de Heparina-Sepharose. A figura 33A mostra o cromatograma do fracionamento, em que dois picos foram formados entre as frações 9 e 23, as quais foram testadas em ensaio de EMSA, utilizando a sonda *pacC* (figura 33B). Foi observada a formação de complexos entre as frações 14 e 17, sendo a mais intensa a da fração 17. As frações 15 a 17 foram então testadas novamente por EMSA, na presença do competidor específico (CE) e do OligoPacC (10X para ambos), adicionados 10 min previamente à sonda. A figura 34 mostra que o complexo DNA-proteína formado pela fração 16 foi intensificado com a adição do OligoPacC (27 pb), indicando que as proteínas presentes nesta fração não se ligaram especificamente ao *motif* 5'-GCCAAG-3', contido no oligo dupla-fita, mas sim em outra região da sonda *pacC*. Já na fração 17, o complexo de alto peso molecular formado não desapareceu e nem foi deslocado na presença do CE ou do OligoPacC, sugerindo que possivelmente a quantidade de proteína que se ligou especificamente à sonda *pacC* esteja muito elevada nesta fração, não permitindo a diminuição visual da banda na presença dos competidores específicos.

Para testar a hipótese de que haveria maior quantidade de proteínas específicas na fração 17 do extrato de pH 7,8 se ligando ao *motif* PacC, foi realizado um ensaio de competição, com concentrações crescentes do OligoPacC, o qual já havia sido demonstrado ser mais eficiente para “roubar” proteína quando adicionado previamente à sonda *pacC* (mostrado nas figuras 29C e 30B). Para isto, as frações 18 (extrato pH 5,8) e 17 (extrato pH 7,8) foram testadas em um ensaio de competição por EMSA, utilizando o OligoPacC na

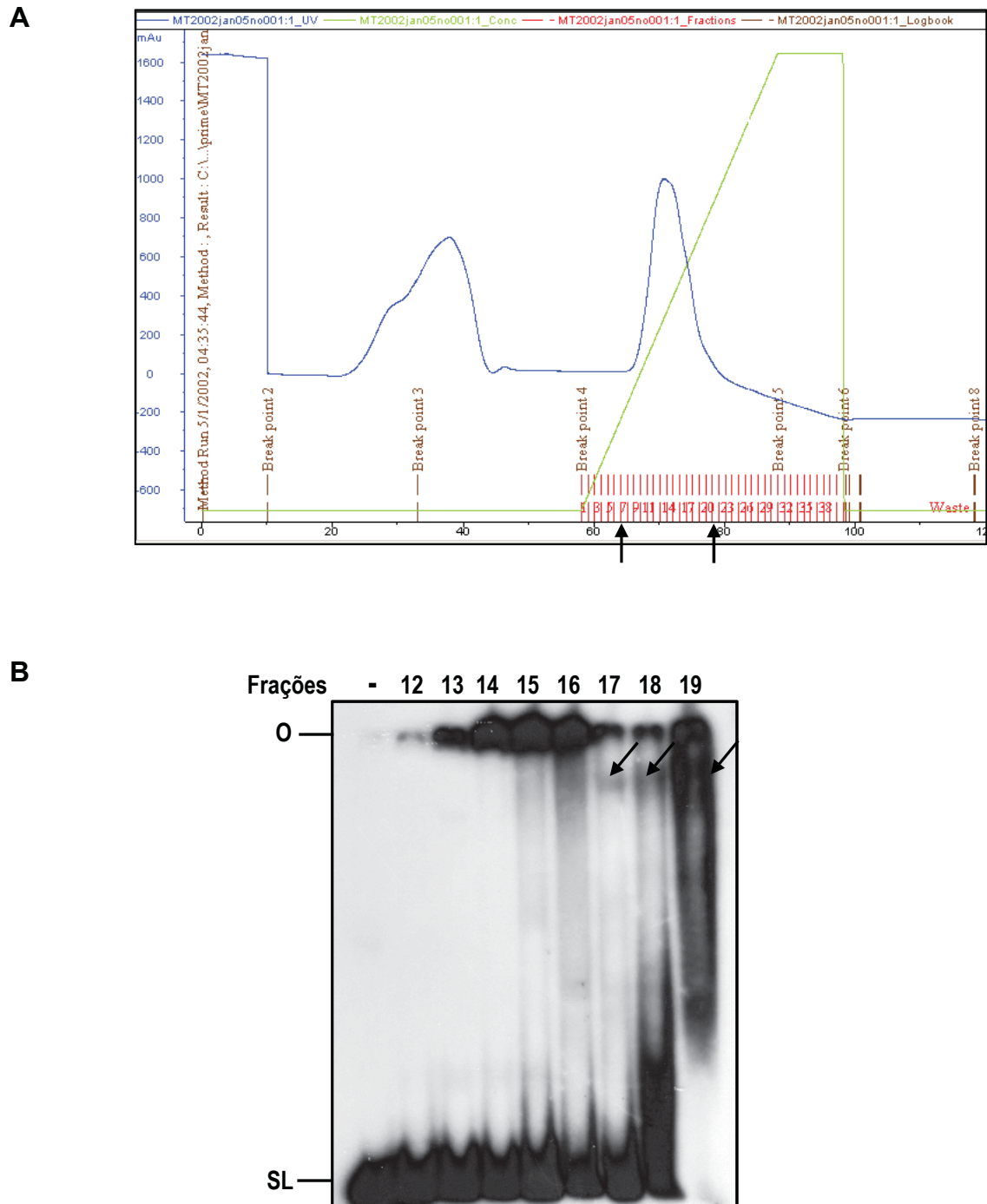


Figura 31 – Fracionamento do extrato celular bruto de micélio crescido em pH 5,8, seguido do ensaio de EMSA para análise das frações cromatográficas. **(A)** Cromatograma das etapas de fracionamento do extrato protéico em coluna de Heparina-Sepharose, utilizando um gradiente linear de 0,1 a 1,5 M de KCl. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** Auto-radiografia do EMSA das frações 12 a 19 (20 µg), as quais foram testadas na presença da sonda *pacC* de 146 pb. O, origem do gel; SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína estão indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliácridamida 5% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

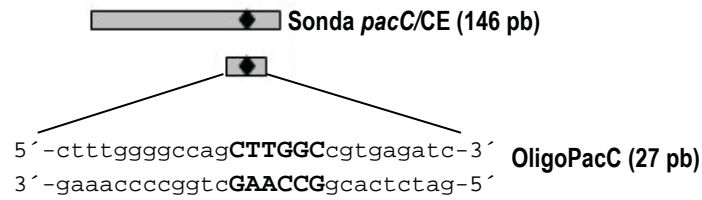
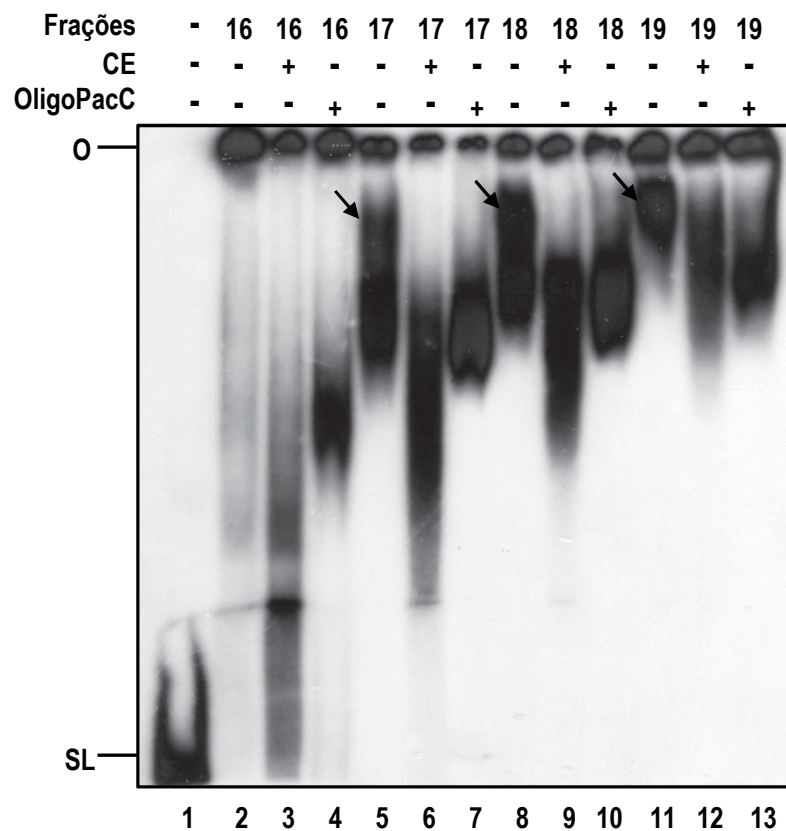
A**B**

Figura 32 – (A) Desenho esquemático da sonda *pacC*, competidor específico (CE) e do OligoPacC, a qual é mostrada a seqüência de 27 pb e a respectiva posição do *motif* PacC (losango preto, seqüência em caixa alta). **(B)** Auto-radiografia do ensaio de EMSA mostrando a ligação de proteínas das frações 16 a 19 (35 µg) do extrato celular bruto preparado de micélio crescido em pH 5,8 à sonda *pacC*. O competidor específico (CE) foi adicionado às reações das canaletas 3, 6, 9 e 12, e o OligoPac às reações das canaletas 4, 7, 10 e 13, ambos na concentração de 10X de excesso molar à sonda. Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. O, origem do gel, SL, sonda livre. Os complexos DNA-proteína estão indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

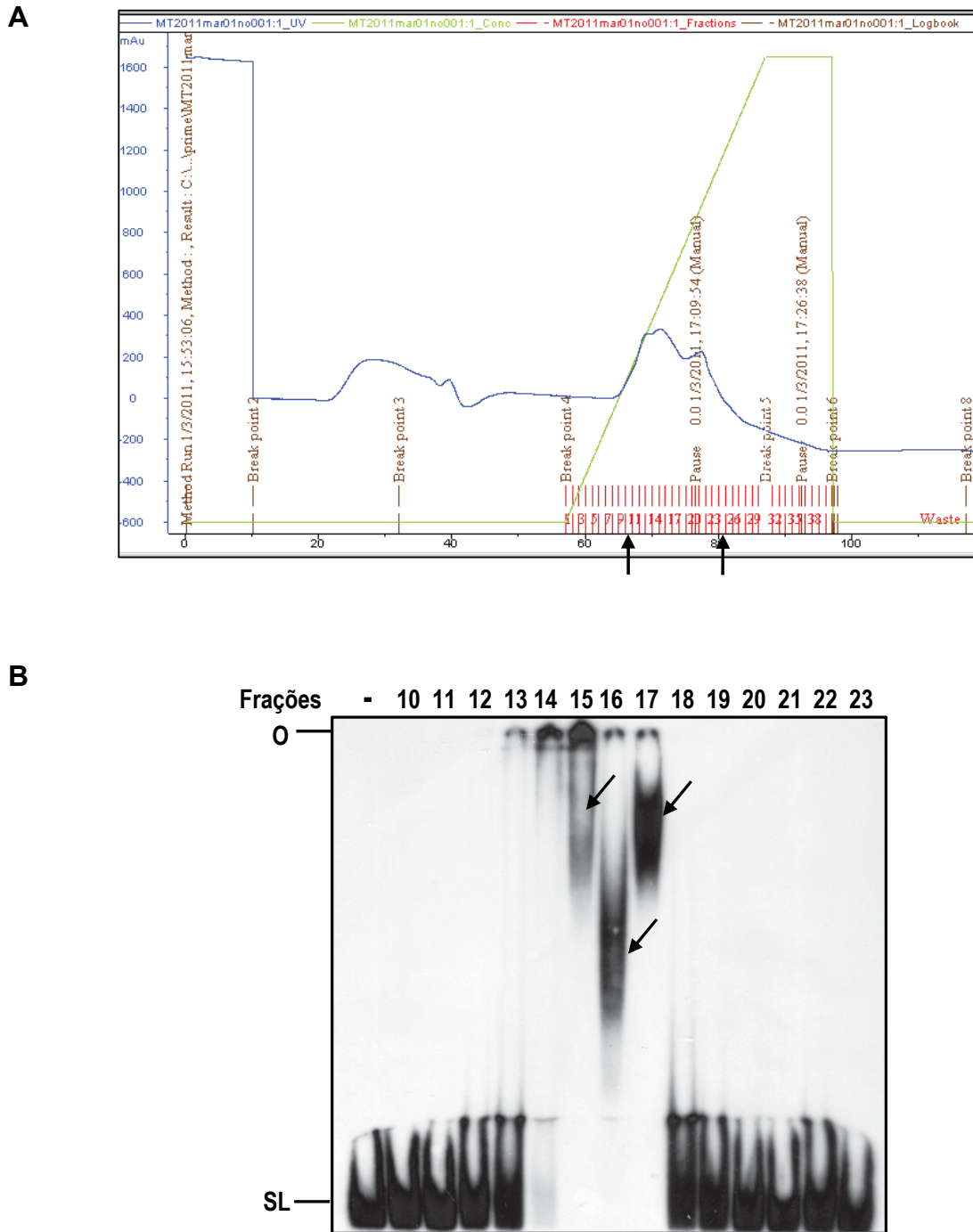


Figura 33 – Fracionamento do extrato celular bruto de micélio submetido a estresse de pH alcalino (7,8, 1 h), seguido do ensaio de EMSA **(A)** Cromatograma das etapas de fracionamento do extrato protéico em coluna de Heparina-Sepharose, utilizando um gradiente linear de 0,1 a 1,5 M de KCl. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** Auto-radiografia do EMSA das frações 10 a 23 coletadas (35 µg), as quais foram testadas na presença da sonda *pacC*. O, origem do gel, SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína estão indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliácridamida 4% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

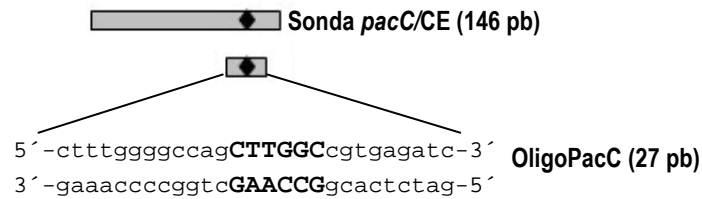
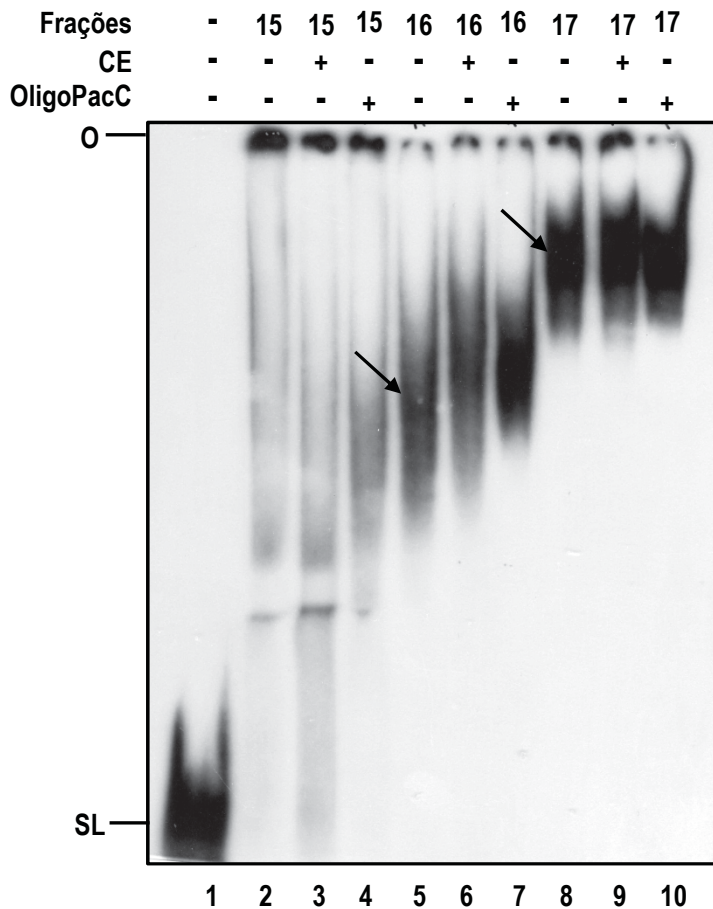
A**B**

Figura 34 – (A) Desenho esquemático da sonda *pacC*, competidor específico (CE) e do OligoPacC, no qual é mostrada a sequência de 27 pb e a respectiva posição do *motif* PacC (losango preto, sequência em caixa alta). **(B)** Auto-radiografia do ensaio de EMSA, mostrando a ligação de proteínas das frações cromatográficas 15 a 17 (35 µg) do extrato celular bruto preparado de micélio submetido a estresse de pH alcalino à sonda *pacC*. O competidor específico (CE) foi adicionado às reações das canaletas 3, 6 e 9 e o OligoPacC às reações das canaletas 4, 7 e 10, ambos na concentração de 10X de excesso molar à sonda. Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. O, origem do gel, SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína são indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

concentração de 10, 20 e 30X de excesso molar à sonda. A figura 35 mostra a autoradiografia do gel, em que pode ser observado que no extrato de pH 5,8 o complexo DNA-proteína foi deslocado com todas as quantidades de OligoPacC testadas (canaletas 4 a 6), enquanto que na fração do extrato de pH 7,8 o complexo apenas foi deslocado a partir de 20X de excesso molar à sonda (canaletas 10 e 11). Estes resultados mostraram que proteínas de extrato celular bruto de micélio crescido em ambas as condições de pH foram capazes de se ligar ao elemento PacC presente na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*, e que, muito provavelmente deve existir uma maior quantidade de proteínas específicas na fração 17 do extrato protéico de micélio crescido a pH alcalino.

14. Análise da expressão da proteína PACC por *Western blot*

Como a ligação de proteínas do extrato celular bruto à sonda *pacC* foi verificada no micélio crescido em condições fisiológicas (pH 5,8), decidimos analisar a expressão da proteína PACC neste extrato e no extrato de pH alcalino por *Western blot*. Para isso, o micélio de *N. crassa* (linhagem selvagem) foi crescido durante 24 h em pH 5,8 e transferido para meio em pH alcalino (7,8) durante 1, 2, 3 e 4 h. A expressão da proteína PACC foi analisada a partir de 100 µg de extrato protéico total/canaleta. A figura 36 mostra a presença da proteína PACC de *N. crassa*, de aproximadamente 58 kDa, em células crescidas tanto em pH 5,8 quanto durante as 4 h de estresse alcalino. O tamanho da proteína PACC corresponde à massa molecular da forma intermediária da proteína PacC de *A. nidulans* ativada em pH alcalino (53 kDa). Em nossos experimentos não foi encontrada nenhuma outra forma da proteína PACC de peso molecular maior (~68 kDa, teórico esperado para a forma não processada da proteína de *N. crassa*) ou menor (~27 kDa, como descrito para *A. nidulans*). Os dados obtidos pelos ensaios de EMSA em conjunto com a análise de expressão da PACC sugerem que a via de sinalização de pH em *N. crassa* possa ter algumas etapas diferentes da via descrita para *A. nidulans*. A proteína PACC de *N. crassa* deve sofrer um processamento independentemente do pH externo, e outros experimentos serão necessários para confirmar tal hipótese.

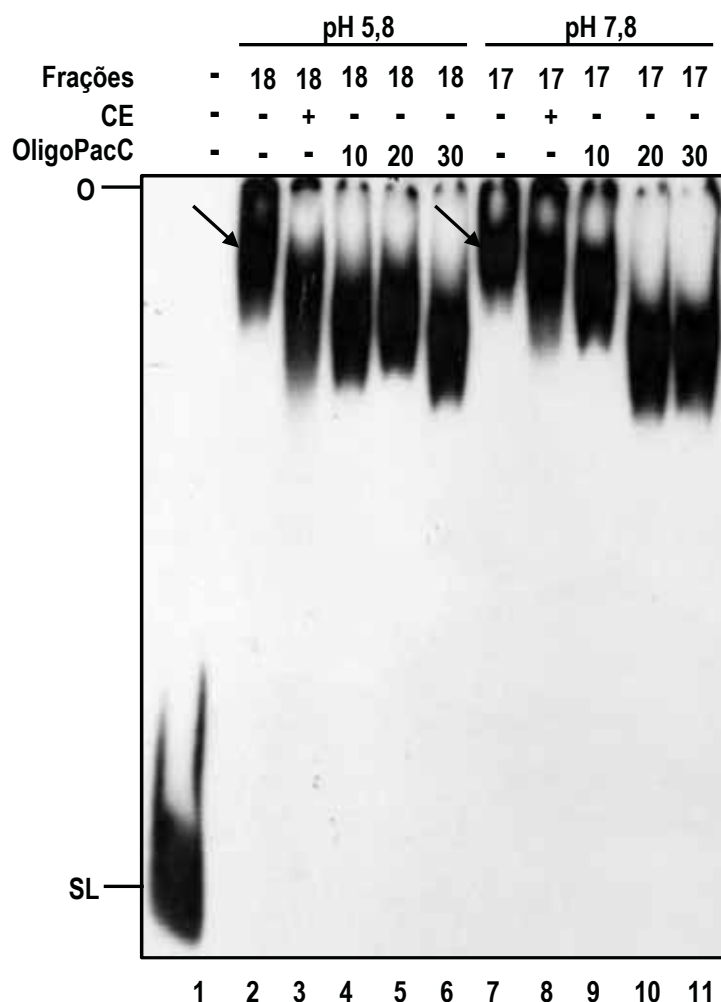


Figura 35 – Auto-radiografia do ensaio de EMSA com diferentes frações cromatográficas. A reação foi realizada com proteínas da fração 18 (extrato de pH 5,8) e da fração 17 (extrato de pH 7,8) à sonda *pacC*. O competidor específico (CE) foi adicionado na concentração de 10X de excesso molar à sonda (canaletas 3 e 8) e o OligoPacC, nas concentrações de 10, 20 e 30X de excesso molar (canaletas 4 a 6 e 9 a 11). Canaleta 1, sonda sem adição de proteína; Canaletas 2 e 7, adição das frações sem competidores específicos. O, origem do gel, SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína estão indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

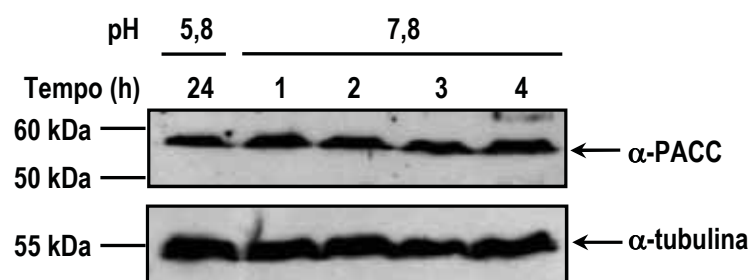


Figura 36 – Análise da expressão da proteína PACC de *N. crassa* por *Western blot*. As células foram crescidas durante 24 h em pH 5,8 e transferidas para meio de pH 7,8 e incubadas durante 1, 2, 3 e 4 h. O extrato protéico total (100 µg de proteínas totais/canaleta) foi fracionado em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. As condições para o *Western* foram descritas em Materiais e Métodos. As bandas correspondentes às proteínas PACC e α-tubulina (controle endógeno) estão indicadas por setas.

Resultados - Parte 3

15. Caracterização funcional preliminar do fator de transcrição NIT2

A caracterização funcional preliminar deste fator de transcrição foi realizada por ensaios de retardamento em gel (EMSA). Como descrito anteriormente, a regulação de genes estruturais do metabolismo de nitrogênio é exercida pelo fator de transcrição NIT2 quando há limitação de fonte primária de compostos nitrogenados e/ou indução por nitrato (MARZLUF, 2001). O resultado de acúmulo de glicogênio na linhagem FGSC#11392 (*nit2*^{KO}) (figura 5) mostrou um comportamento diferente ao que é descrito para a linhagem selvagem: ocorreu um hiper-acúmulo de glicogênio tanto antes como depois do estresse térmico. A análise das regiões 5'-flanqueadoras dos genes *gsn* e *gpn* (figura 14) revelaram a presença de elementos de DNA *cis* do tipo “GATA” para o fator de transcrição NIT2, um *motif* identificado na 5'-*gsn* e cinco deles identificados na 5'-*gpn*.

Dessa forma, decidimos iniciar a investigação sobre o papel do fator de transcrição NIT2 na regulação do metabolismo de glicogênio, visando uma compreensão preliminar dos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo de carboidratos *versus* metabolismo de nitrogênio.

16. Análise da ligação DNA-proteína

Para investigar se o fator de transcrição NIT2, produzido em sua forma recombinante ou presente em extrato celular bruto, é capaz de reconhecer e se ligar ao elemento *cis* NIT2 presente na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*, realizamos os ensaios de retardamento em gel (EMSA). Um fragmento de DNA marcado contendo o *motif* NIT2 foi utilizado como sonda (134 pb) e o mesmo fragmento de DNA não-marcado (CE, competidor específico) e oligonucleotídeo de fita dupla, contendo o *motif* NIT2, foram usados como competidores específicos.

16.1. Análise da ligação com extrato celular bruto

O elemento regulatório NIT2 do promotor *gsn* foi analisado quanto à capacidade de ligação com proteínas presentes em extrato celular bruto extraído de micélio crescido durante 24 h em condições fisiológicas (crescimento vegetativo). O extrato celular bruto foi fracionado por cromatografia de afinidade em coluna de Heparina-Sepharose, seguido de

ensaios de retardamento em gel (EMSA), com o objetivo de identificar frações protéicas apresentando atividade de ligação DNA-proteína à sonda *nit2*.

Durante o fracionamento do extrato celular bruto, um pico contendo proteínas foi observado entre as frações 7 e 21 coletadas (cromatograma, figura 37A), as quais foram seguidamente testadas em ensaios de EMSA, utilizando a sonda *nit2*. A figura 37B mostra um ensaio de retardamento em gel (5% poliacrilamida) com as frações 7 a 20, em que podemos observar que a sonda foi totalmente consumida entre as frações 15 e 18. Um complexo DNA-proteína de alto peso molecular, próximo à origem do gel, foi formado na fração 18, e um outro, mais abaixo, foi formado na fração 19.

As frações 14 a 19 foram então testadas novamente por EMSA em gel de poliacrilamida 4%, na presença do competidor específico (CE, concentração de 10X à sonda). A figura 38B mostra a auto-radiografia de um gel de EMSA, em que os complexos DNA-proteína específicos formados pelas frações 17 e 18 (canaletas 8 e 10) desapareceram na presença do CE (canaletas 9 e 11), mostrando que a ligação de proteínas ao *motif* NIT2 do promotor *gsn* (esquema figura 38A) ocorre em extrato crescido em condições fisiológicas do fungo *N. crassa*.

16.2. Análise da ligação com a proteína His- Δ NIT2 recombinante

A interação DNA-proteína foi também testada na presença da proteína His- Δ NIT2 com a sonda de 134 pb contendo o *motif* NIT2. A figura 39A mostra o desenho esquemático da sonda *nit2* e do OligoNIT2 com a respectiva posição do *motif* NIT2, o qual foi utilizado como competidor específico. A figura 39B mostra a formação dos complexos DNA-proteína de alto peso molecular e a diminuição da intensidade das bandas com a adição dos competidores específicos CE (canaletas 3 e 4) e OligoNIT2 (canaletas 5 a 8). Pode ser observado que a adição de 5X de excesso molar de CE foi suficiente para consumir toda a proteína adicionada, enquanto que com 1X de excesso molar, o OligoNIT2 foi capaz de se ligar especificamente à proteína. Os resultados mostraram que o *motif* NIT2 presente na região 5'-flanqueadora do gene *gsn* é um sítio específico capaz de ser reconhecido e ligado pela proteína NIT2.

17. Caracterização funcional preliminar do fator de transcrição CRE-1

Assim como a coleção de linhagens mutantes em fatores de transcrição foi analisada quanto ao conteúdo de glicogênio, a linhagem FGSC#10372 mutante na ORF NCU08807 (*cre-1*^{KO}) foi estudada durante o estresse térmico e o papel do fator de transcrição CRE-1 no

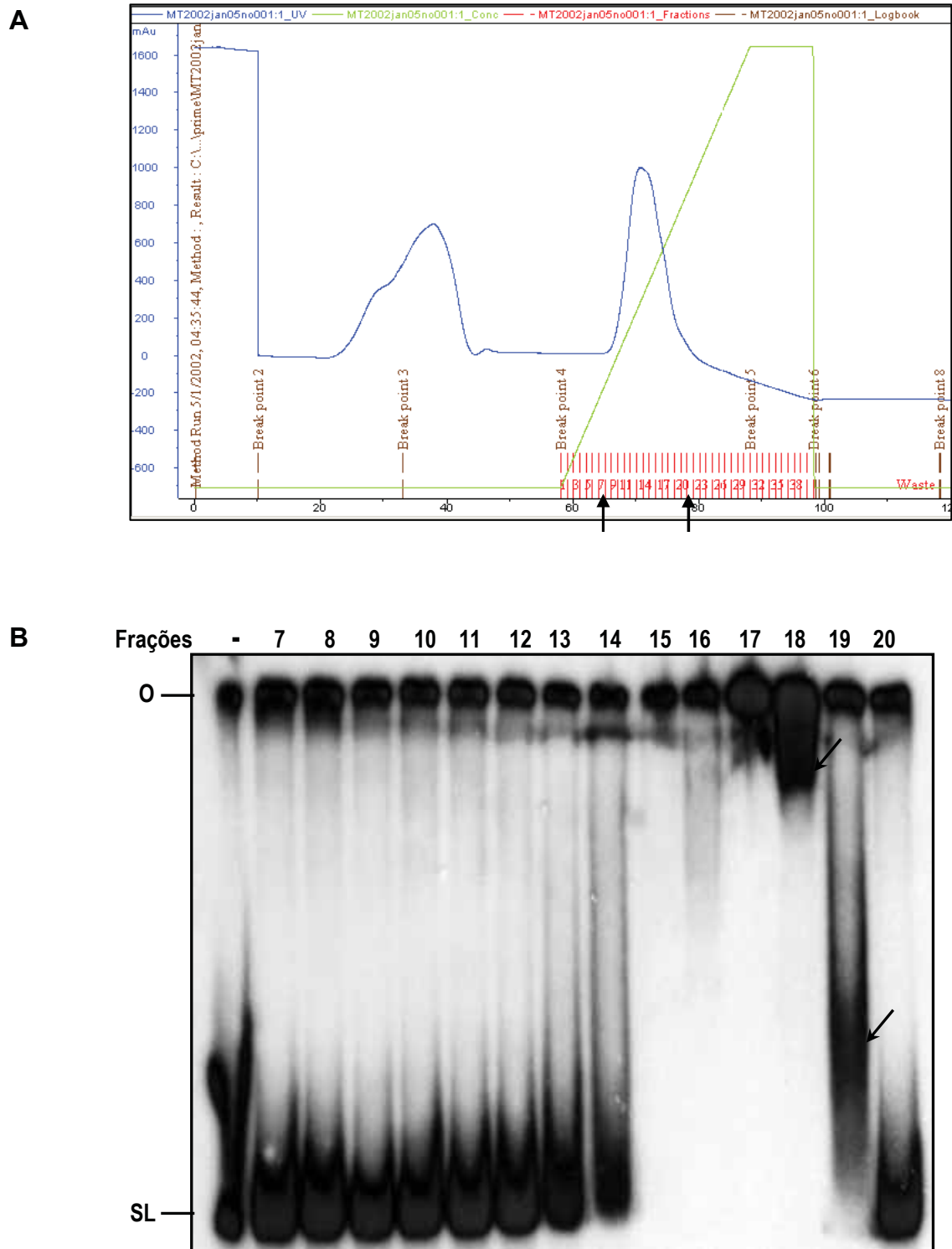


Figura 37 – Fracionamento do extrato celular bruto de micélio crescido em condições fisiológicas (30°C, 24 h), seguido do ensaio de EMSA **(A)** Cromatograma das etapas de fracionamento do extrato protéico em coluna de Heparina-Sepharose, utilizando um gradiente linear de 0,1 a 1,5 M de KCl. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** Auto-radiografia das frações 7 a 20 coletadas (70 µg), as quais foram testadas na presença da sonda *nit2*. O, origem do gel; SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína estão indicados pelas setas Eletroforese em gel de poliácridamida 5% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

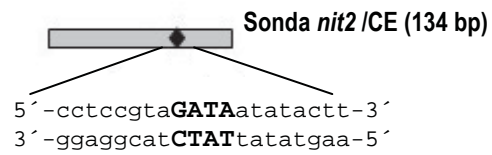
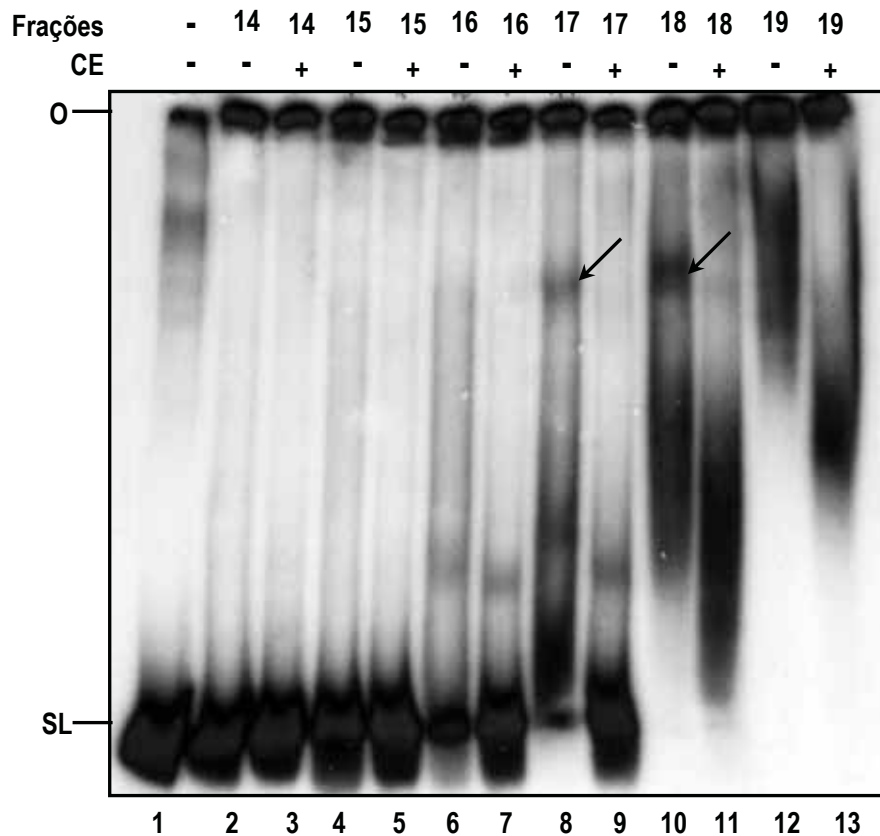
A**B**

Figura 38 – (A) Desenho esquemático da sonda *nit2* e do competidor específico (CE), a qual é mostrada a posição do *motif* NIT2 (losango preto, sequência em caixa alta). **(B)** Autorradiografia do ensaio de EMSA, mostrando a ligação de proteínas das frações 14 a 19 (35 µg) do extrato celular bruto de micélio crescido em condições fisiológicas à sonda *nit2*. O competidor específico (CE) foi adicionado às reações das canaletas 3, 5, 7, 9, 11 e 13 na concentração de 10X de excesso molar à sonda. Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. O, origem do gel; SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína são indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

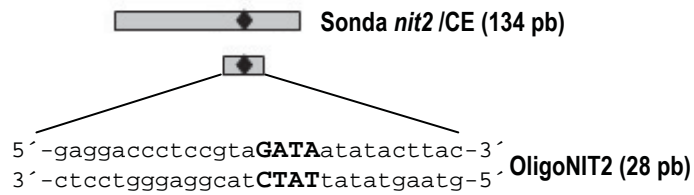
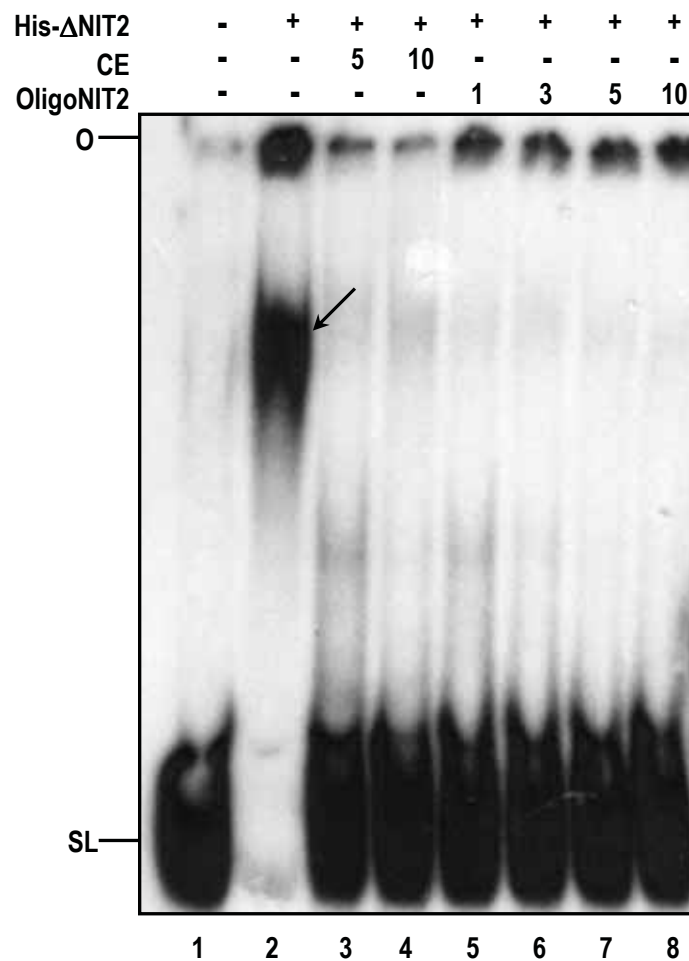
A**B**

Figura 39 – (A) Desenho esquemático da sonda *nit2*, competidor específico (CE) e do OligoNIT2, no qual é mostrada a sequência de 28 pb e a respectiva posição do *motif* NIT2 (losango preto, sequência em caixa alta). **(B)** Autoradiografia do ensaio de EMSA. Quantidades crescentes de competidor específico (CE, canaletas 3 e 4) e do OligoNIT2 (canaletas 5 a 8) foram testadas com 20 ug da proteína recombinante His-ΔNIT2. Canaleta 1, sonda sem adição de proteína. Linha 2, adição de proteína recombinante à sonda, sem competidores específicos. O, origem do gel; SL, sonda livre. O complexo DNA–proteína está indicado pela seta. Eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

metabolismo deste carboidrato foi investigado. O fator de transcrição CRE-1 de *N. crassa* é ortólogo à Mig1p (levedura) e CreA (*A. nidulans*), os quais são descritos como repressores transcricionais que controlam o uso preferencial de fontes de carbono (por exemplo, glicose) (RUIJTER; VISSER, 1997). Vários elementos *cis* Mig1p foram encontrados na região promotora dos genes *gsn* e *gpn* (figura 14), dando indícios de que a proteína CRE-1 possa estar envolvida na regulação do metabolismo de glicogênio.

18. Análise morfológica da linhagem mutante *cre-1^{KO}*

18.1. Determinação da taxa de crescimento linear

A determinação da taxa de crescimento linear da linhagem mutante *cre-1^{KO}* foi realizada, em comparação à linhagem selvagem, com base na extensão das hifas em *race tubes*. Células (10^7 conídios/mL) foram inoculadas em uma extremidade do tubo e mantidas a 30°C, no escuro. A frente de crescimento foi marcada a cada 24 h, até a mesma atingir a outra extremidade do tubo. A distância de crescimento foi medida e expressa em função das horas de crescimento. Os experimentos foram realizados em triplicata e a figura 40A mostra as taxas de crescimento das linhagens. Os resultados mostraram que a linhagem *cre-1^{KO}* apresentou diferenças na extensão apical das hifas, e que muito provavelmente o gene *cre-1* regula o crescimento e/ou desenvolvimento do fungo.

18.2. Análise de crescimento radial

A análise de crescimento radial foi feita em placas contendo meio VM e VM suplementado com extrato de levedo. Células (10^7 conídios/mL) das linhagens selvagem e mutante *cre-1^{KO}* foram inoculadas no centro das placas e incubadas no claro/escuro, a 30 °C durante 24 h. A figura 40B mostra o resultado do crescimento radial das duas linhagens, nas quais o diâmetro foi medido e os valores descritos na tabela (figura 40C). Novamente, podemos observar que, comparada à linhagem selvagem, a linhagem mutante *cre-1^{KO}* mostrou um crescimento afetado.

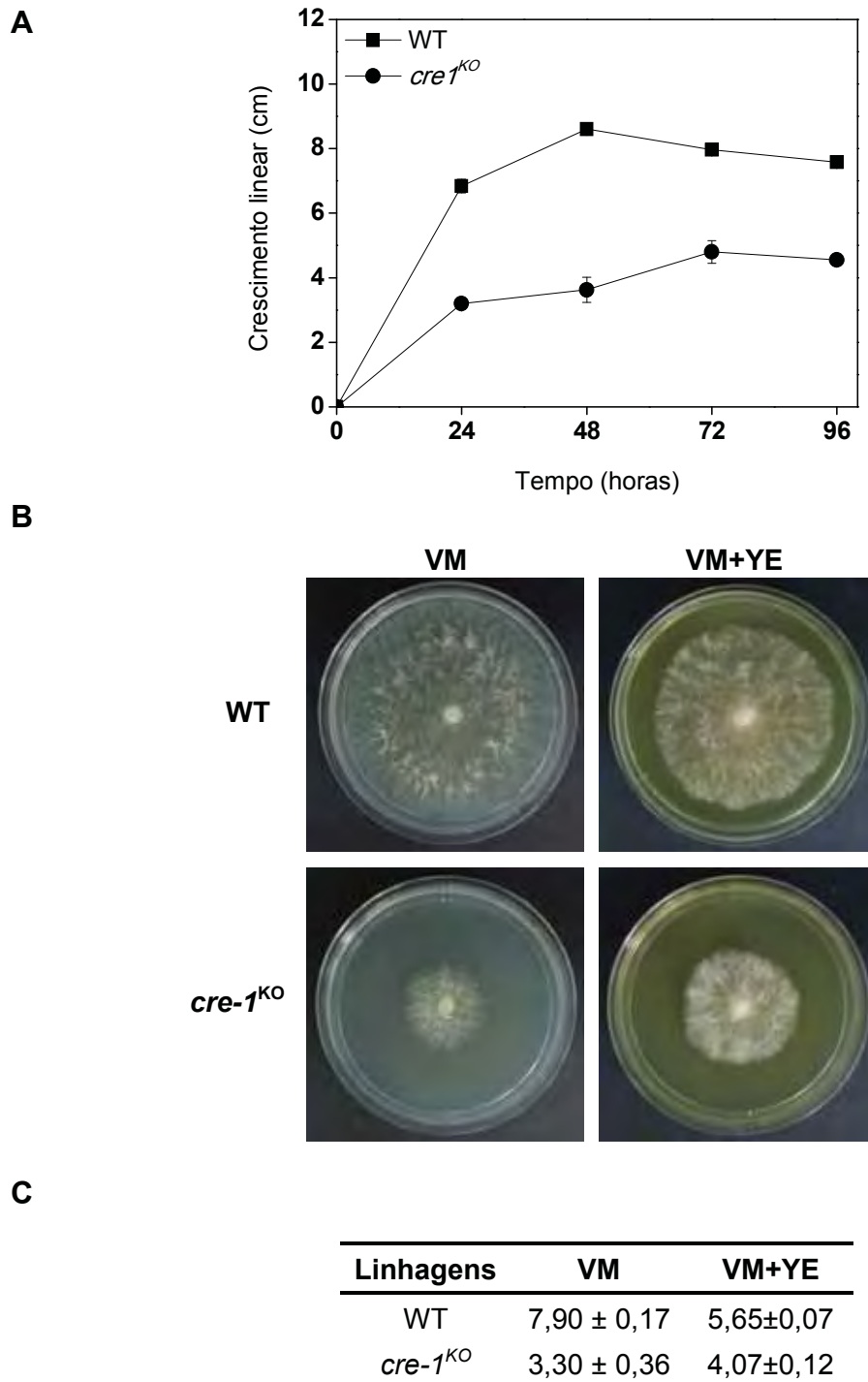


Figura 40 – Análise de crescimento das linhagens selvagem e mutante *cre-1^{KO}*. **(A)** Análise do crescimento linear em *race tubes*. As células foram inoculadas em uma das extremidades do tubo e o crescimento foi medido (em cm) através da marcação da frente micelial a cada 24 h, no escuro, em temperatura ambiente. **(B)** Análise de crescimento radial em placas contendo meio VM e VM adicionado de extrato de levedo (VM + YE). O crescimento foi medido (em cm) após 24 h, no claro/escuro. **(C)** Tabela contendo os valores dos diâmetros medidos das colônias e o desvio padrão (\pm), em centímetros.

19. Ensaio de choque térmico

19.1. Conteúdo de glicogênio e análise de expressão gênica

A linhagem *cre-1^{KO}*, juntamente com a linhagem selvagem foi analisada durante o crescimento vegetativo na temperatura normal (30°C) e após submissão ao choque térmico (transferência de 30°C para 45°C). Os micélios obtidos foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio e para a extração do RNA total. A dosagem de glicogênio foi feita da mesma forma que nos experimentos anteriores

A figura 41A mostra que, nas duas linhagens (selvagem e *cre-1^{KO}*) ocorreu a diminuição do conteúdo de glicogênio após o choque térmico. Entretanto, o conteúdo de glicogênio na linhagem mutante foi elevado antes mesmo do estresse térmico, durante crescimento vegetativo do fungo.

A expressão dos genes *gsn* e *gpn* foi analisada por *Northern blot*, visando investigar se o padrão de acúmulo de glicogênio apresentado pela linhagem *cre-1^{KO}* ocorreu devido à expressão diferenciada dos genes *gsn* e/ou *gpn*. A figura 41B mostra, para a linhagem selvagem, uma redução acentuada na transcrição dos genes *gsn* e *gpn* após o choque térmico. Na linhagem *cre-1^{KO}* o perfil de expressão do gene *gsn* foi praticamente o mesmo que na linhagem selvagem, entretanto, a expressão do gene *gpn* mostrou-se levemente reduzida, durante o crescimento vegetativo, em comparação à linhagem selvagem. Estes dados podem sugerir que a proteína CRE-1 pode estar envolvida na regulação do processo de degradação do glicogênio, pois a sua ausência na linhagem provocou uma diminuição na transcrição do gene *gpn*, com conseqüente acúmulo do carboidrato (figura 41A) durante o crescimento vegetativo do fungo.

20. Análise de crescimento em diferentes fontes de carbono

O fator de transcrição CreA/Mig1p é uma proteína que medeia a repressão por carbono (glicose, por exemplo) de genes que codificam enzimas envolvidas no catabolismo de fontes de carbono alternativas, ou seja, que não são preferenciais à célula. A maioria das enzimas envolvidas na degradação de polissacarídeos, como celulose e pectina, parecem ser reprimidas por glicose (RUIJTER; VISSER, 1997). Sendo assim, decidimos realizar um ensaio de crescimento com as linhagens selvagem e *cre-1^{KO}* em diferentes fontes de carbono, como glicose (repressora), xilose e glicerol (não repressores) com o objetivo de investigar se a proteína CRE-1 poderia estar envolvida com o metabolismo do glicogênio. As linhagens foram primeiramente crescidas em meio VM líquido contendo frutose (fonte não

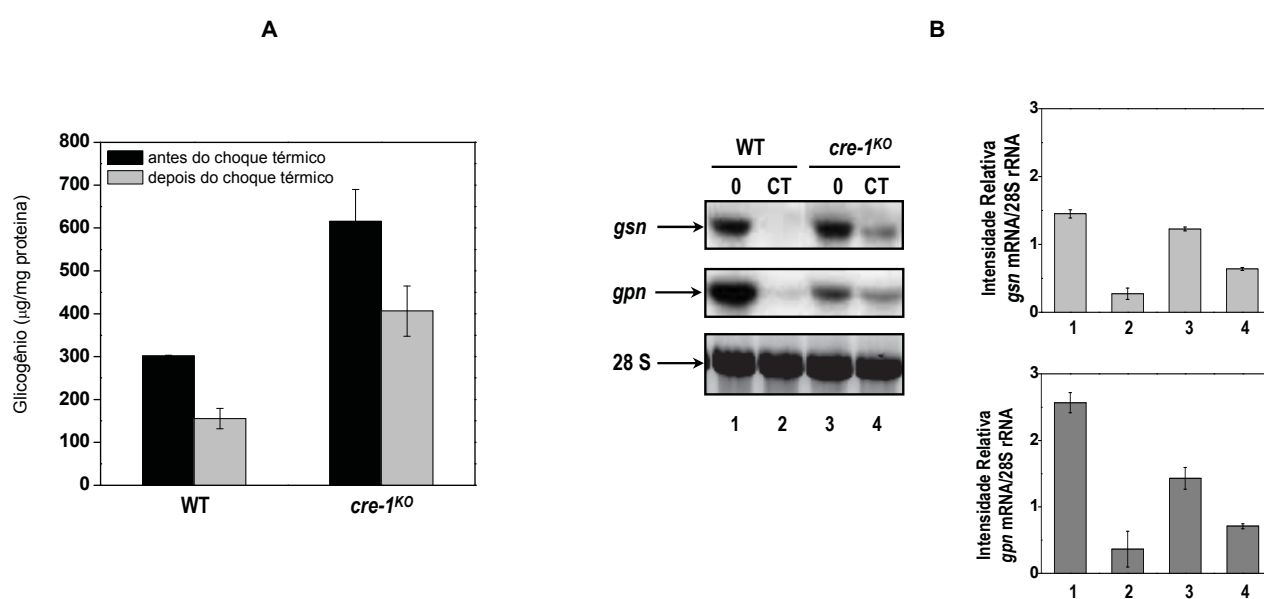


Figura 41 – Conteúdo de glicogênio e análise da expressão gênica nas linhagens selvagem e mutante *cre-1^{KO}*. **(A)** O conteúdo de glicogênio foi quantificado antes e após choque térmico, como descrito em Materiais e Métodos. **(B)** Expressão dos genes *gsn* e *gpn* antes e depois do choque térmico. Amostras de RNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído e transferidas a uma membrana de nylon neutra. Fragmentos dos genes *gsn* e *gpn*, marcados radiativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP foram utilizados como sonda. Os gráficos mostram a normalização da expressão dos genes *gsn* e *gpn* em relação ao RNA 28S, utilizando-se o software ImageJ.

repressora) durante 24 h e transferidas para as fontes de carbono acima mencionadas. Os micélios foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio e para a extração do RNA total.

20.1. Determinação do conteúdo de glicogênio

Na linhagem selvagem, foi verificado que quando o micélio foi transferido para meio repressor (glicose), o conteúdo de glicogênio aumentou levemente nas primeiras duas horas e diminuiu com o tempo (figura 42). Na linhagem *cre-1^{KO}* o conteúdo de glicogênio foi superior à linhagem selvagem mesmo durante o crescimento vegetativo em frutose e aumentou ainda mais quando o micélio foi transferido para meio contendo glicose. Este resultado mostra uma possível desregulação no processo de acúmulo ou degradação do glicogênio intracelular na linhagem mutante.

Na condição em que o micélio foi transferido para uma fonte de carbono não repressora (xilose), os níveis de glicogênio nas duas linhagens (selvagem e mutante) diminuíram em relação aos controles (frutose), e assim permaneceram durante todo o tempo de incubação, mostrando que o glicogênio não foi acumulado, mas apenas degradado na presença deste açúcar (figura 42). Novamente, os níveis de glicogênio na linhagem mutante foram superiores aos existentes na linhagem selvagem, em todos os tempos analisados.

O conteúdo de glicogênio também foi avaliado após a transferência dos micélios das duas linhagens para outro meio não repressor (glicerol). Foi observado um perfil semelhante ao mostrado no crescimento em xilose (figura 42), ou seja, diminuição nos níveis de glicogênio. Quantidades elevadas de glicogênio na linhagem *cre-1^{KO}* também foram observadas durante o período de incubação, em relação à linhagem selvagem.

20.2. Análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* por *Northern blot*

A expressão dos genes que codificam a glicogênio sintase (*gsn*) e a glicogênio fosforilase (*gpn*) foi analisada nas duas linhagens por meio da técnica de *Northern blot*, utilizando-se o RNA ribossômico 28S como controle endógeno. O objetivo desse experimento foi verificar se a desregulação do acúmulo de glicogênio apresentado pela linhagem mutante *cre-1^{KO}* ocorreu devido à expressão alterada dos genes *gsn* e/ou *gpn*, bem como levantar hipóteses se o fator de transcrição CRE-1 poderia estar envolvido com a regulação da expressão dos mesmos.

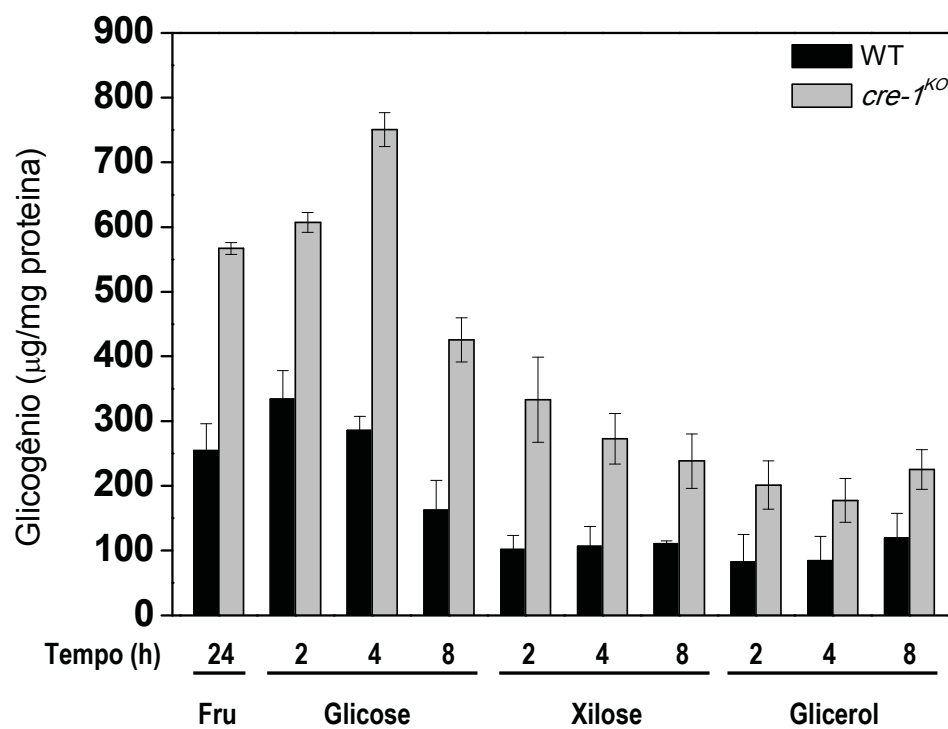


Figura 42 - Concentração de glicogênio durante o crescimento em diferentes fontes de carbono. Células das linhagens selvagem e *cre-1^{KO}* foram crescidas em VM (frutose) durante 24 h e transferidas para meio VM contendo glicose, xilose ou glicerol como única fonte de carbono.

A figura 43 mostra o padrão na expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas duas linhagens. Na linhagem selvagem, um leve aumento do transcrito *gsn* foi observado quando o micélio foi transferido para meio contendo glicose (*gsn*, canaletas 3 e 4). Concomitantemente, uma repressão na expressão do gene *gpn* foi observada nas primeiras 2 h (canaleta 2), passando a aumentar após 8 h de incubação (*gpn*, canaletas 3 e 4). Por outro lado na linhagem mutante *cre-1^{KO}*, uma repressão acentuada na expressão dos dois genes foi observada nas primeiras duas horas após transferência para meio contendo glicose (canaleta 12) e o efeito repressor foi suprimido após as 8 h de incubação para os dois genes. O aumento na expressão do gene *gpn* no tempo de 8 h após transferência para glicose poderia explicar a degradação do glicogênio observada na linhagem selvagem. Entretanto, a mesma conclusão não pode ser realizada para a linhagem mutante.

Quanto ao crescimento em meio contendo xilose como única fonte de carbono, foi observado, na linhagem selvagem, um aumento dos transcritos *gsn* e *gpn* nas primeiras 4 h (figura 43, canaletas 5 e 6), os quais diminuíram após 8 h de incubação (canaletas 7). Ao contrário, na linhagem *cre-1^{KO}*, baixos níveis dos transcritos *gsn* e *gpn* foram encontrados nas primeiras duas horas (canaleta 15), os quais passaram a aumentar a partir de 4 h de incubação.

No crescimento em meio contendo glicerol como única fonte de carbono, a quantidade dos transcritos *gsn* e *gpn* foi elevada na linhagem selvagem nas duas primeiras horas de incubação (figura 43, canaleta 8), passando a declinar após 4 h (canaletas 9 e 10). Entretanto, na linhagem *cre-1^{KO}*, os níveis transcricionais da *gpn* permaneceram elevados durante todo o período de incubação, enquanto que a expressão da *gsn* pareceu ser mais basal.

Estes resultados são preliminares e estão sendo ainda objeto de estudo.

21. Análise de ligação DNA-proteína

Para investigar se o fator de transcrição CRE-1, produzido em sua forma recombinante foi capaz de reconhecer e se ligar ao elemento *cis* Mig1/CreA presente na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*, ensaios de retardamento em gel (EMSA) foram realizados. Um fragmento de DNA marcado contendo o *motif* Mig1 foi utilizado como sonda. Entretanto, o resultado obtido foi negativo, ou seja não foi observado a formação de complexo DNA-proteína. Como a proteína CreA (de *A. nidulans*) é uma proteína descrita ser auto-regulável, ou seja, apresenta sítios de ligação para ela mesma na região promotora do seu gene codificador (*creA*) (STRAUSS et al., 1999), uma busca por sítios contendo a sequência 5'-SYGGRG-3' na região 5'-flanqueadora do gene *cre-1* de *N. crassa* foi realizada. Foram

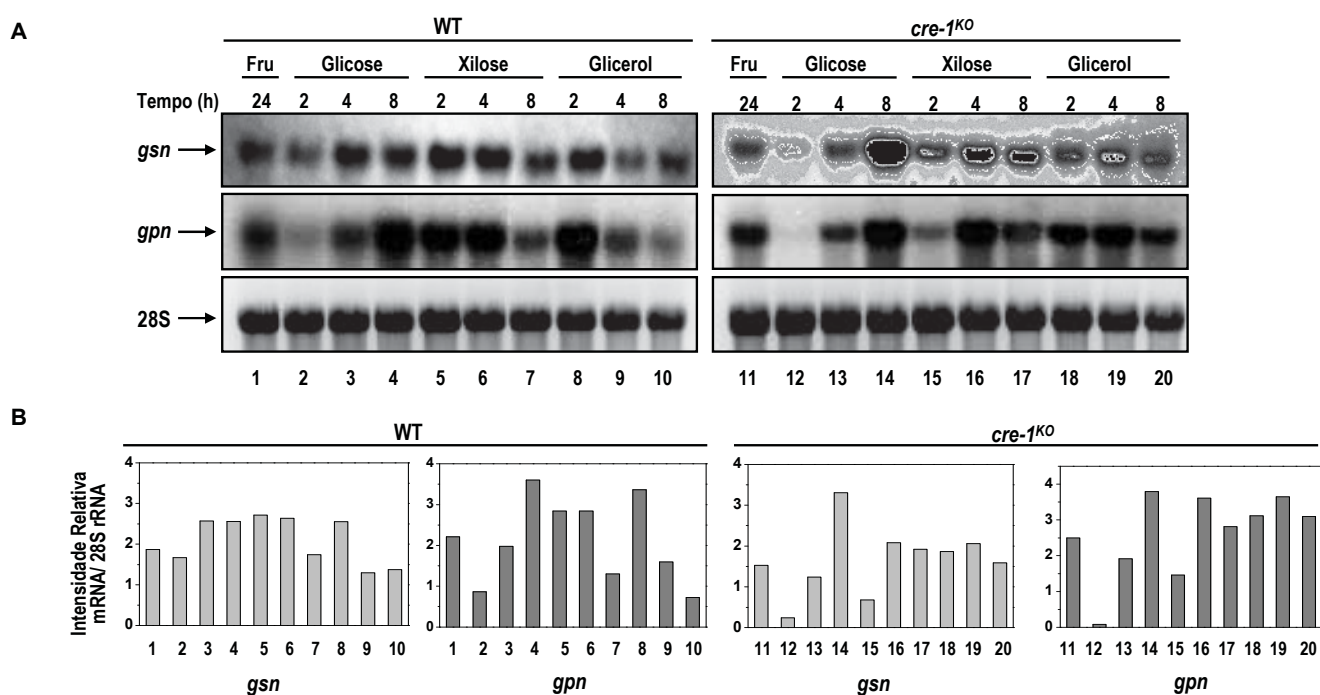


Figura 43 - Expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens selvagem e *cre-1^{KO}* crescidas em frutose e transferidas para diferentes fontes de carbono. Amostras de RNA foram separadas por eletroforese em gel de agarose contendo formaldeído e transferidas para uma membrana de nylon neutra. Fragmentos dos genes *gsn* e *gpn*, marcados radiativamente com $\alpha^{32}\text{P}$ -ATP foram utilizados como sonda. **(A)** Autoradiografia das membranas. O perfil do rRNA 28S foi visualizado com brometo de etídio. **(B)** Normalização da expressão dos genes *gsn* e *gpn* em relação ao RNA 28S, utilizando o software ImageJ.

encontrados 10 possíveis sítios para a proteína CreA. Um fragmento de DNA de 173 pb contendo três *motifs* CreA foi marcado e utilizado como sonda (*pcre-1*) e três preparações da proteína recombinante His-CRE-1 (figura 19C) foram testadas e, novamente, o resultado foi negativo.

Os resultados negativos podem ser compreendidos considerando que: a preparação da proteína CRE-1 não tenha resultado em uma proteína ativa; ou que a ligação da proteína ao DNA seja dependente de alguma outra proteína parceira. É conhecido em *S. cerevisiae* que este fator de transcrição (Mig1p) atua regulando diferentes processos celulares, os quais são reprimidos dependendo da presença de outras proteínas repressoras, formando complexos proteicos bem conservados (SMITH; JOHNSON, 2000).

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização de fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio em *N. crassa*. Um estudo sistemático de *screening* foi realizado com 69 linhagens mutantes (de um total de 147 linhagens) em genes codificadores para fatores de transcrição, das quais sete linhagens mostraram perfis diferentes da linhagem selvagem quanto ao conteúdo de glicogênio avaliado durante o crescimento vegetativo e no estresse térmico. Embora não tenha sido observada uma correlação direta entre o conteúdo de glicogênio e o padrão na expressão dos genes *gsn* e *gpn* em algumas linhagens mutantes, a maioria delas revelou variações na expressão gênica, e por isso, os fatores de transcrição ausentes nestas linhagens foram identificados. Uma discussão mais aprofundada sobre todos os fatores de transcrição selecionados encontra-se no artigo recentemente publicado por Gonçalves et al. (2011) (Anexo 1).

O papel das proteínas identificadas no presente trabalho foi investigado quanto a uma possível participação, direta ou indireta, na regulação do metabolismo do carboidrato. Concomitantemente, análises de crescimento foram realizadas com as linhagens mutantes selecionadas, mostrando que as linhagens *rco-1^{KO}*, *pacC^{KO}* e *fkh1^{KO}* apresentaram deficiências durante o desenvolvimento do fungo. A proteína Fkh1 pertence à família de fatores de transcrição do tipo *forkhead*, encontrada em uma variedade de organismos eucariotos superiores e exerce um papel importante em diversos processos celulares, tais como o desenvolvimento, diferenciação celular e progressão do ciclo celular (KAUFMANN; KNOCH, 1996). Em *S. cerevisiae*, as proteínas Fkh1p e Fkh2p vêm sendo estudadas e foram caracterizadas como ativadores específicos da fase G2/M (VORTH et al., 2007). Em fungos filamentosos, o primeiro fator de transcrição do tipo *forkhead* a ser caracterizado foi a proteína AcFKH1 de *A. chrysogenum*, a qual está associada com a ativação da biossíntese de cefalosporina C (SCHMITT; HOFF; KUCK, 2004). Em *N. crassa*, a proteína FKH1 parece estar diretamente envolvida no desenvolvimento do fungo, bem como os resultados preliminares apontam uma sutil desregulação no acúmulo do glicogênio durante o crescimento vegetativo.

Yamashiro et al. (1996) foram os primeiros pesquisadores a caracterizar o gene *rco-1* de *N. crassa*, e mostraram que este está envolvido com o controle do crescimento vegetativo, reprodução sexual e desenvolvimento assexual no fungo. Mais tarde, investigações preliminares reportaram a possível participação de RCO-1 no mecanismo de repressão do catabolismo de carbono, conhecido como CCR (LE; EBBOLE, 1998), assim como é descrito para a proteína ortóloga Tup1p de *S. cerevisiae* (SMITH; JOHNSON, 2000). A proteína Tup1p vem sendo alvo de inúmeros estudos, os quais revelaram seu efeito pleiotrópico no desenvolvimento celular. Tup1p é uma proteína corepressora que compõe o complexo Tup1-Ssn6, o qual contribui para a repressão de uma série de genes em resposta

a um número de vias de sinalização, por meio da interação física com outras proteínas parceiras (MALAVÉ; DENT, 2006; SMITH; JOHNSON, 2000; TREITEL; CARLSON, 1995). Recentemente, as proteínas RCO-1 e RCM-1 de *N. crassa*, ortólogas a Tup1 e Ssn6 de levedura, respectivamente, foram mostradas estarem envolvidas com a fotoadaptação pela regulação da expressão de genes por luz (OLMEDO et al., 2010). A proteína Tup1p, assim como RCO-1, possui dois domínios de interação protéica: um na região N-terminal (domínio Tup1-N) e outro na porção C-terminal (sete WD-repeats). Em *S. cerevisiae*, o domínio Tup1-N interage com o co-repressor transcricional Ssn6, e os domínios WD40 interagem com fatores de transcrição repressores, os quais formam um complexo bem estável que inibe a expressão gênica por meio do impedimento da ligação de ativadores transcricionais ao DNA, assim como também interage com as histonas, modificando a estrutura da cromatina e impedindo o acesso da RNA polimerase (MALAVÉ; DENT, 2006; SMITH; JOHNSON, 2000). A interação física entre RCO-1 e RCM-1 (Tup1-Ssn6) em *N. crassa* ainda não foi reportada.

Uma das proteínas parceiras do complexo Tup1-Ssn6 é a proteína Mig1p, a qual participa na resposta ao catabolismo de carbono. Neste mecanismo, determinadas fontes de carbono são assimiladas preferencialmente em favor de outras, como economia de tempo e gasto energético (RONNE, 1995). Na maioria dos fungos, a glicose é a fonte de carbono preferencial e, portanto, leva à repressão de genes responsáveis pelo catabolismo de fontes de carbono alternativas, tais como galactose e sacarose (NEHLIN; RONNE, 1990; NEHLIN; CARLBERG; RONNE, 1991). Como mencionado anteriormente, a proteína Mig1p de *S. cerevisiae* é ortóloga ao fator transcricional CreA (*A. nidulans*) ou CRE-1 (*N. crassa*). No presente trabalho foi mostrado que CRE-1 está envolvido tanto com o desenvolvimento do fungo (corroborando os dados de Ziv, Gorovits e Yarden (2008)), como com o acúmulo de glicogênio. Os experimentos de crescimento em diferentes fontes carbono sugerem que a proteína CRE-1 influencia muito mais a regulação da expressão do gene *gpn* do que *gsn*, levando-nos a concluir, de um modo geral, que a célula mantém um mecanismo de degradação de glicogênio altamente regulado por CRE-1 para a utilização preferencial de moléculas de glicose como fonte de carbono. Estudos mais aprofundados serão necessários para a caracterização completa dos fatores de transcrição RCO-1 e CRE-1 de *N. crassa* e o seu papel na regulação do metabolismo de glicogênio.

A linhagem FSGC#11397 mutante para o fator de transcrição PACC também apresentou deficiências durante o desenvolvimento do fungo e mostrou alterações no acúmulo de glicogênio, tanto antes como depois do choque térmico. Entretanto, o *knockout* da ORF NCU00090 nesta linhagem não foi confirmado, o que nos levou a desenvolver novos experimentos com uma nova linhagem mutante *pacC^{KO}*, construída pelo Dr. Renato M. de Paula. Esta linhagem apresentou vários defeitos morfológicos, bem como a incapacidade de crescer em pH alcalino. Os experimentos de crescimento em diferentes

condições de pH revelaram claramente que o gene *gsn* é regulado negativamente por pH alcalino, levando ao baixo acúmulo de glicogênio nesta situação. A linhagem *pacC*^{KO} apresentou níveis de conteúdo de glicogênio e de expressão do gene *gsn* alterados em pH alcalino. Esses resultados são suficientes para caracterizar o gene *gsn* como ácido-específico e também regulado por PACC. Alguns genes ácido-específicos regulados negativamente por pH são descritos na literatura (ESPESO; ARST, 2000; MACCABE et al., 1998). A expressão do gene *pacC* em *N. crassa* mostrou ser regulada positivamente em pH alcalino corroborando com os resultados descritos para outros fungos filamentosos (FLAHERTY et al., 2003; MERHEJ; RICHARD-FORGET; BARREAU, 2011; MEYER et al., 2005).

Entretanto, o alto nível de expressão do gene *pacC* em pH 7,8 não explica o nível de expressão da proteína PACC nesta mesma situação. O resultado de *Western blot* revelou a presença de uma forma única da proteína PACC em *N. crassa*, tanto durante o crescimento vegetativo em pH 5,8, quanto em pH 7,8. O modelo da regulação gênica por pH é bem caracterizado em *A. nidulans* (PEÑALVA; ARST, 2004), o qual mostra que a proteína PacC (PacC⁷²) passa por dois processamentos proteolíticos (PacC⁵³ e PacC²⁷) para se tornar ativa. Por outro lado, a proteína homóloga RIM101p, de *S. cerevisiae*, sofre um único processamento proteolítico e a forma menor, de 27 kDa não é encontrada (LI; MITCHELL, 1997). No presente trabalho, os resultados obtidos indicam de que a proteína PACC de *N. crassa* seja sujeita a um único processamento, pois apresentou um tamanho menor (~55 kDa) do que a massa molecular teórica da proteína inteira (~67 kDa), e que o processamento ocorra independente do pH do meio, visto que a forma processada da proteína foi encontrada antes mesmo do estresse de pH alcalino, no pH 5,8.

Os experimentos de estresse de pH e choque térmico combinados também mostraram que, assim como o gene *gsn*, a expressão do gene *pacC* foi inibida durante o estresse térmico, mesmo nas células submetidas ao pH alcalino. O promotor do gene *pacC* foi analisado quanto a presença de sítios de ligação para fatores de transcrição, onde foram encontrados seis e quatro *motifs* de DNA STRE e HSE, respectivamente, sendo sugestivo que o gene *pacC* seja regulado por estresse térmico, similarmente ao gene *gsn* (FREITAS; BERTOLINI, 2004).

A interação da proteína PACC ao seu elemento regulatório de DNA presente na região promotora do gene *gsn* foi comprovada pelos ensaios de retardamento em gel (EMSA), tanto na presença da proteína PACC recombinante, quanto a presente em extrato celular bruto. A especificidade da ligação ao sítio 5'-GCCAAG-3' foi comprovada por meio de ensaios de competição, utilizando-se um competidor específico (146 pb) e um oligonucleotídeo dupla fita de 27 pb (OligoPacC). Além disso, quando todos os nucleotídeos da sequência consenso de ligação foram mutados a capacidade de ligação da proteína

PACC recombinante ao *motif* de DNA foi praticamente abolida. A análise de ligação do extrato bruto protéico de células crescidas tanto em pH fisiológico normal (5,8) como alcalino mostrou que a proteína PACC estava presente em frações ativas de ambos os extratos, capazes de se ligarem ao elemento de DNA PacC presente na região promotora do gene *gsn*. Estes resultados corroboram com a presença da proteína PACC nas duas condições de pH analisadas no ensaio de *Western blot* e pelos resultados obtidos através do ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP), discutidos com mais detalhes no manuscrito recentemente submetido à publicação (*Mol. Microbiol.*) (Anexo 2).

Finalmente, o presente trabalho revelou um possível envolvimento da proteína NIT2 na regulação do metabolismo do glicogênio. Os resultados de conteúdo de glicogênio mostraram que a linhagem *nit2^{KO}* de *N. crassa* mostrou um hiper-acúmulo deste carboidrato durante o crescimento vegetativo e no estresse térmico. Entretanto, a análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* não revelou diferenças significantes entre as linhagens selvagem e *nit2^{KO}*, embora tenham sido encontrados *motifs* de ligação para a proteína NIT2 no promotor de ambos os genes. O fator de transcrição NIT2 foi descrito como um regulador positivo global do metabolismo de nitrogênio em *N. crassa* (MARZLUF, 2001). Alguns compostos nitrogenados como amônia, glutamina e glutamato são utilizados como fontes de nitrogênio preferenciais pelos fungos, e a asparagina, pelas leveduras. Entretanto, quando essas fontes não estão disponíveis no meio, outras fontes de nitrogênio alternativas podem ser utilizadas, tais como nitrato, nitrito, purinas, amidas, dentre outras. Os genes que codificam as enzimas que catabolizam as fontes secundárias de nitrogênio e as permeases são altamente regulados, os quais estão sujeitos à repressão catabólica do nitrogênio. A derepressão desses genes é mediada pelo fator de transcrição NIT2 que se liga especificamente à região promotora, ativando a transcrição de genes “estruturais” de nitrogênio na ausência de fontes de nitrogênio preferenciais à célula (MARZLUF, 1997). Em *N. crassa*, foi demonstrado que as proteínas NIT2 e NIT4 precisam interagir para ativar com eficiência o gene *nit-3* (codificador para nitrato redutase). NIT4 é um membro da família de fatores de transcrição de fungos GAL4 e contém um domínio de ligação ao DNA do tipo Zn₂Cys₆. A proteína NIT4 também é um regulador positivo, porém específico que ativa a expressão de genes na presença do substrato e/ou indutor, como por exemplo, o nitrato (FENG; MARZLUF, 1998; MARZLUF, 2001).

A especificidade da ligação da proteína NIT2 ao promotor do gene *gsn* foi comprovada por meio de EMSA, entretanto, outros ensaios serão necessários para mostrar a regulação deste fator de transcrição sobre o gene *gpn* também. Uma relação entre a regulação de fontes de carbono e nitrogênio já foi reportada por Lockington et al. (2002), os quais descreveram os efeitos de diferentes fontes de carbono e nitrogênio na secreção de celulasas em *A. nidulans*. Alguns genes vêm sendo descritos por serem modulados tanto

pela repressão catabólica de nitrogênio como de carbono, tais como o cluster de genes *prn* responsáveis pelo metabolismo da prolina, e o gene *amdS* que codifica a acetamidase, todos em *A. nidulans*. (MARZLUF, 2001). A expressão desses genes é controlada pelas proteínas AreA (ortóloga à NIT2) e CreA (MARZLUF, 2001; SOPHIANOPOULOU et al., 1993). Em adição, uma possível relação entre as proteínas AreA e CreA é relatado na literatura devido à presença de elementos GATA (para AreA) no promotor do gene *creA*, em *A. nidulans* (VAUTARD-MEY; FÈVRE, 2003). Dessa forma, fica cada vez mais evidente a ligação entre as vias de utilização de carbono e nitrogênio em fungos filamentosos.

Os resultados obtidos neste trabalho constituem um conjunto de informações valioso em relação à participação de proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, no controle do metabolismo de um carboidrato. O papel de um fator de transcrição foi detalhadamente investigado e alguns resultados forneceram evidências de que o mecanismo molecular envolvido na ação da proteína possa ser distinto do modelo descrito na literatura para a mesma proteína em outros microorganismos. Este dado é bem interessante, pois sugere a existência de um mecanismo diferente em diferentes organismos modelos de estudo. Outras abordagens experimentais serão necessárias para entender a via de sinalização envolvendo este fator de transcrição. Dois outros fatores de transcrição foram caracterizados preliminarmente, e os resultados são também interessantes, pois revelaram mecanismos de regulação cruzada entre metabolismo de carbono e nitrogênio, ainda não muito explorado na literatura científica.

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with IMAGEJ. **Biophot. Int.**, Pittsfield, v. 11, n. 7, p. 36-42, July 2004.
- ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 62, n. 1, p. 35-54, Mar. 1998.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2004.
- ARIÑO, J. Integrative responses to high pH stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **OMICS**, Larchmont, v. 14, n. 5, p. 517-523, Aug. 2010.
- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 719-739, Sept. 2005.
- ARST, H. N. Jr.; PEÑALVA, M. A. pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 224-231, Apr. 2003.
- AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. New York: Wiley Interscience, 1996.
- AZEVEDO, J. L. Fungos: genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Biotecnologia Cienc. Desenvolv.**, Brasília, v. 1, p. 12-15, maio 1997.
- BARBOSA, L. C. B. **Caracterização parcial dos sítios de fosforilação da enzima glicogênio sintase de *Neurospora crassa***. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- BASKARAN, S.; ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; HURLEY, T. D. Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 107, n. 41, p. 17563-17568, Oct. 2010.
- BIENZ, M.; PELHAM, H. R. Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the *Xenopus* hsp70 gene and when linked to a heterologous promoter. **Cell**, Cambridge, v. 5, n. 45, p. 753-760, June 1986.
- BIENZ, M.; PELHAM, H. R. Mechanisms of the heat shock gene activation in higher eukaryotes. **Adv. Genet.**, San Diego, v. 24, p. 31-72, May 1987.
- BORKOVICH, K. A.; ALEX, L. A.; YARDEN, O.; FREITAG, M.; TURNER, G. E.; READ, N. D.; SEILER, S.; BELL-PEDERSEN, D.; PAIETTA, J.; PLESOFISKY, N.; PLAMANN, M.; GOODRICH-TANRIKULU, M.; SCHULTE, U.; MANNHAUPT, G.; NARGANG, F. E.; RADFORD, A.; SELITRENNIKOFF, C.; GALAGAN, J. E.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; CATCHESIDE, D.; INOUE, H.; ARAMAYO, R.; POLYMENIS, M.; SELKER, E. U.; SACHS, M. S.; MARZLUF, G. A.; PAULSEN, I.; DAVIS, R.; EBBOLE, D. J.; ZELTER, A.; KALKMAN, E. R.; O'ROURKE, R.; BOWRING, F.; YEADON, J.; ISHII, C.; SUZUKI, K.; SAKAI, W.; PRATT, R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 1, n. 68, p. 1-108, Mar. 2004.
- BRADEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.

- BROWN, C. E.; LECHNER, T.; HOWE, L.; WORKMAN, J. L. The many HATs of transcription coactivators. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 15-19, Jan. 2000.
- BRUNO, M.; FLAUS, A.; STOCKDALE, C.; RENCUREL, C.; FERREIRA, H.; OWEN-HUGHES, T. Histone H2A/H2B dimer exchange by ATP-dependent chromatin remodeling activities. **Mol. Cell**, Cambridge, v. 12, n. 6, p. 1599-1606, Dec. 2003.
- CADDICK, M. X.; BROWNLEE, A. G.; ARST, H. N. Jr. Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 203, n. 2, p. 346-353, May 1986.
- CARACUEL, Z.; CASANOVA, C.; RONCERO, M. I. G.; DI PIETRO, A.; RAMOS, J. pH response transcription factor PacC controls salt stress tolerance and expression of the P-Type Na⁺ -ATPase Ena1 in *Fusarium oxysporum*. **Eukariot. Cell**, Washington, v. 2, n. 6, p. 1246-1252, Dec. 2003.
- CHIANG, T. Y.; MARZLUF, G. A. Binding affinity and functional significance of NIT2 and NIT4 binding sites in the promoter of the highly regulated *nit-3* gene, which encodes nitrate reductase in *Neurospora crassa*. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 177, n. 21, p. 6093-6099, Nov. 1995.
- COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEIS, R. L.; BORKOVICH, K. A.; DUNLAP, J. C. A high throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 103, n. 27, p. 10352-10357, July 2006.
- COOPER, G. M. **The cell, a molecular approach**. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2000.
- COPPIN, E. The *fle1* gene encoding a C2H2 zinc finger protein co-ordinates male and female sexual differentiation in *Podospira anserina*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 43, n. 5, p. 1255-1268, Mar. 2002.
- DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. Timeline: *Neurospora*: a model of model microbes. **Nature Rev. Genet.**, London, v. 3, n. 5, p. 397-403, May 2002.
- DE PAULA, R. M. **Metabolismo do glicogênio em *Neurospora crassa***: um estudo molecular e bioquímico e análise de interação proteína-proteína. 2004. 164 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.
- DE PAULA, R.; DE PINHO, C. A.; TERENCE, H. F.; BERTOLINI, M. C. Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. **Mol. Genet. Genomics**, Berlin, v. 267, n. 2, p. 241-253, Apr. 2002.
- DE PAULA, R. M.; WILSON, W. A.; TERENCE, H. F.; ROACH, P. J.; BERTOLINI, M. C. GNN, a self-glucosylating protein is involved in the initiation step of *Neurospora crassa* glycogen metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 435, n. 1, p. 112-124, Mar. 2005a.
- DE PAULA, R. M.; WILSON, W. A.; TERENCE, H. F.; ROACH, P. J.; BERTOLINI, M. C. Biochemical characterization of the GNN, the protein involved in the initiation of glycogen synthesis in *Neurospora crassa*. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 579, n. 10, p. 2208-2214, Apr. 2005b.

- DUNLAP, J. C.; BORKOVICH, K. A.; HENN, M. R.; TURNER, G. E.; SACHS, M.; GLASS, L.; McCLUSKEY, K.; PLAMANN, M.; GALAGAN, J. E.; BIRREN, B.; WEISS, R. L.; TOWNSEND, J. P.; LOROS, J. J.; NELSON, M. A.; LAMBREGHTS, R.; COLOT, H. V.; PARK, G.; COLLOPY, P.; RINGELBERG, C.; CREW, C.; LITVINKOVA, L.; DECAPRIO, D.; HOOD, H. M.; CURILLA, S.; SHI, M.; CRAWFORD, M.; KOERHSEN, M.; MONTGOMERY, P.; LARSON, L.; PEARSON, M.; KASUGA, T.; TIAN, C.; BASTURKMEN, M.; ALTAMIRANO, L.; XU, J. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Adv. Genet.**, New York, v. 57, p. 49-96, Mar. 2007.
- EISENDLE, M.; OBEREGGER, H.; BUTTINGER, R.; ILLMER, P.; HAAS, H. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH Regulatory system in *Aspergillus nidulans*. **Eukaryot. Cell**, Washington, v. 3, n. 2, p. 561-563, Apr. 2004.
- ESPESO, E. A.; ARST, H. N. Jr. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 20, n. 10, p. 3355-3363, May 2000.
- ESPESO, E. A.; PENALVA, M. A. Three binding sites for the *Aspergillus nidulans* PacC zinc-finger transcription factor are necessary and sufficient for regulation by ambient pH of the isopenicillin N synthase gene promoter. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 46, p. 28825-28830, Nov. 1996.
- ESPESO, E. A.; TILBURN, J.; SÁNCHEZ-PULIDO, L.; BROWN, C. V.; VALENCIA, A.; ARST, H. N. Jr.; PENALVA, M. A. Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. **J. Mol. Biol.**, London, v. 274, n. 4, p. 466-480, Dec. 1997.
- ESSER, K.; KUENEN, R. **Genetics of fungi**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1967.
- FARKAS, I.; HARDY, T. A.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Isolation of the *GSY1* gene encoding yeast glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 34, p. 20879-20886, Dec. 1990.
- FARKAS, I.; HARDY, T. A.; GOEBL, M. G.; ROACH, P. J. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, n. 24, p. 15602-15607, Aug. 1991.
- FENG, B.; MARZLUF, G. A. Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 18, n. 7, p. 3983-3990, July 1998.
- FINCHAN, J. R. S.; DAY, P. R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. 4th ed. New York: Black-Well Scientific Publication, 1979.
- FLAHERTY, J. E.; PIRTTILÄ, A. M.; BLUHM, B. H.; WOLOSHUK, C. P. PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 69, n. 9, p. 5222-5227, Sept. 2003.
- FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 25, n. 1, p. 125-145, Jan. 2001.
- FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Genomic organization of the *Neurospora crassa* *gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. **Mol. Gen. Genomics**, Berlin, v. 5, n. 272, p. 550-561, Dec. 2004.

- FREITAS, F. Z.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; BERTOLINI, M. C. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the gsn glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 8, p. 2052-2061, May 2008.
- FREITAS, F. Z.; DE PAULA, R. M.; BARBOSA, L. C. B.; TERENCE, H. F.; BERTOLINI, M. C. cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 47, n. 1, p. 43-52, Jan. 2010.
- FU, Y. H.; MARZLUF, G. A. Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 7, n. 2, p. 1691-1696, May 1987.
- FU, Y. H.; MARZLUF, G. A. *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 10, n. 3, p. 1056-1065, Mar. 1990a.
- FU, Y. H.; MARZLUF, G. A. Site-directed mutagenesis of the zinc finger DNA-binding domain of the nitrogen-regulatory protein NIT2 of *Neurospora*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 4, n. 11, p. 1847-1852, Nov. 1990b.
- GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L. J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; KINSEY, J. A.; BRAUN, E. L.; ZELTER, A.; SCHULTE, U.; KOTHE, G. O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.; MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D. D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DE SOUZA, C. P.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M. S.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, London, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.
- GONÇALVES, R. D.; CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; LUCHESSI, A. D.; BERTOLINI, M. C. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol. Cell. Proteomics**. July 2011. In press. DOI 10.1074/mcp.M111.007963.
- GRIFFITHS, A. J. F.; MILLER, J. H.; SUZUKI, D. T.; LEVONTIN, R. C.; GELBART, W. M. **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002.
- HARDY, T. A.; ROACH, P. J. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 268, n. 32, p. 23799-23805, Nov. 1993.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, New York, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.
- HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycol. Res.**, Cambridge, v. 105, p. 1422-1432, Dec. 2001.

- HERVÁZ-AGUILAR, A.; RODRIGUEZ, J. M.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr.; PENALVA, M. A. Evidence for the direct involvement of the proteasome in the proteolytic processing of the *Aspergillus nidulans* zinc finger transcription factor PacC. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 282, n. 48, p. 34735-34747, Nov. 2007.
- HOLMES, D. D.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal Biochem.**, New York, v. 114, n. 1, p. 193-197, June 1981.
- HUANG, K. P.; CABIB, E. Yeast glycogen synthetase is the glucose-6-phosphate dependent form. Purification and properties. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 249, n. 12, p. 3851-3857, June 1974.
- KAESTNER, K. H.; KNOCHEL, W.; MARTÍNEZ, D. E. Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 14, n. 2, p. 142-146, Jan. 2000.
- KAUFMANN, E.; KNOCHEL, W. Five years of the wings of fork head. **Mech. Dev.**, Shannon, v. 57, n. 1, p. 3-20, June 1996.
- KAUFMANN, E.; MULLER, D.; KNOCHEL, W. DNA recognition site analysis of *Xenopus* winged helix proteins. **J. Mol. Biol.**, London, v. 248, n. 2, p. 239-254, Apr. 1995.
- KELLER, N. P.; NESBITT, C.; SARR, B.; PHILLIPS, T. D.; BUROW, G. B. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus spp.* **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 6, p. 643-648, June 1997.
- KOSUGI, S.; HASEBE, M.; MATSUMURA, N.; TAKASHIMA, H.; MIYAMOTO-SATO, E.; TOMITA, M.; YANAGAWA, H. Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 284, n. 1, p. 478-485, Jan. 2009.
- KWON, N. J.; GARZIA, A.; ESPESO, E. A.; UGALDE, U.; YU, J. H. FhbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 77, n. 5, p. 1203-1219, July 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LAMB, T. M.; MITCHELL, A. P. The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 23, n. 2, p. 677-686, Jan. 2003.
- LAMBREGHTS, R.; SHI, M.; BELDEN, W. J.; DECAPRIO, D.; PARK, D.; HENN, M. R.; GALAGAN, J. E.; BASTÜRKMEN, M.; BIRREN, B. W.; SACHS, M. S.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. A high-density single nucleotide polymorphism map for *Neurospora crassa*. **Genetics**, Baltimore, v. 181, n. 2, p. 767-781, Feb. 2009.
- LATCHMAN, D. S. **Eukaryotic transcription factors**. 4th ed. London: Academic Press, 2003.
- LEE, B. J.; CANSIZOGLU, A. E.; SUEL, K. E.; LOUIS, T. H.; ZHANG, Z.; CHOOK, Y. M. Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin β 2. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 3, p. 543-558, Aug. 2006.

- LEE, K.; EBBOLE, D. Tissue-specific repression of starvation and stress responses of the *Neurospora crassa* con-10 gene is mediated by RCO1. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 23, n. 3, p. 269-278, Apr. 1998.
- LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, Cambridge, v. 128, n. 4, p. 707-719, Feb. 2007.
- LI, D.; ROBERTS, R. WD-repeats proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 58, n. 14, p. 2085-2097, Dec. 2001.
- LI, W.; MITCHELL, A. P. Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. **Genetics**, Baltimore, v. 145, n. 1, p. 63-73, Jan. 1997.
- LOCKINGTON, R. A.; RODBOURN, L.; BARNETT, S.; CARTER, C. J.; KELLY, J. M. Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 37, n. 2, p. 190-196, Nov. 2002.
- LUGER, K.; MÄDER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, London, v. 6648, n. 389, p. 251-260, Sept. 1997.
- LUNDIN, M.; NEHLIN, J. D.; RONNE, H. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the CG box-binding zinc finger protein MIG1. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 14, n. 3, p. 1979-1985, Mar. 1994.
- LUSCOMBE, N. M.; AUSTIN, S. E.; BERMAN, H. M.; THORNTON, J. M. An overview of the structures of protein-DNA complexes. **Genome Biol.**, London, v. 1, n. 1, p. 1-37, June 2000.
- MacCABE, A. P.; OREJAS, M.; PÉREZ-GONZÁLES, J. A.; RAMÓN, D. Opposite patterns of expression of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes with respect to ambient pH. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v. 180, n. 5, p. 1331-1333, Mar. 1998.
- MALAVÉ, T. M.; DENT, S. Y. R. Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. **Biochem. Cell Biol.**, Ottawa, v. 84, n. 4, p. 437-443, Aug. 2006.
- MARTINEZ-PASTOR, M.; MARCHLER, G.; SCHULLER, C.; MARCHLER, B. A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO J.**, London, v. 9, n. 15, p. 2227-2235, May 1996.
- MARZLUF, G. A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 61, n. 1, p. 17-32, Mar. 1997.
- MARZLUF, G. A. Metabolic regulation in fungi. In: KHACHATOURIANS, G. G.; ARORA, D. K. **Applied mycology and biotechnology**. Amsterdam: Elsevier Science, 2001. v. 1, p. 55-72.
- MERHEJ, J.; RICHARD-FORGET, F.; BARREAU, C. The pH regulatory factor Pac1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 48, n. 3, p. 275-284, Mar. 2011.
- METZENBERG, R. L. Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 43, n. 3, p. 361-383, Sept. 1979.

- MEYER, V.; STALH, U. New insights in the regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein of *Aspergillus giganteus*. **Curr. Genet.**, New York, v. 42, n. 1, p. 36-42, Oct. 2002.
- MEYER, V.; SPIELVOGEL, A.; FUNK, L.; TILBURN, J.; ARST, H. N. Jr.; STAHL, U. Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of *Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. **Mol. Genet. Genomics**, Berlin, v. 274, n. 3, p. 295-306, Oct. 2005.
- MO, X.; MARZLUF, G. A. Cooperative action of the NIT2 and NIT4 transcription factors upon gene expression in *Neurospora crassa*. **Curr. Genet.**, New York, v. 42, n. 5, p. 260-267, Feb. 2003.
- MORENO-MATEOS, M. A.; DELGADO-JARANA, J.; CODÓN, A. C.; BENÍTEZ, T. pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 44, n. 12, p. 1355-1367, Dec. 2007.
- MUELLER, G. M.; SCHMIT, J. P. Fungal biodiversity: what do we know? What can we predict? **Biodivers. Conserv.**, London, v. 16, n.1, p. 1-5, Jan. 2007.
- NEER, E. J.; SCHMIDT, C. J.; NAMBUDRIPAD, R.; SMITH, T. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature**, London, v. 371, n. 6495, p. 297-300, Sept. 1994.
- NEHLIN, J. O.; RONNE, H. Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms' tumour finger proteins. **EMBO J.**, London, v. 9, n. 9, p. 2891-2898, Sept. 1990.
- NEHLIN, J. O.; CARLBERG, M.; RONNE, H. Control of yeast GAL4 genes by MIG repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. **EMBO J.**, London, v. 10, n. 11, p. 3373-3377, Nov. 1991.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.
- NI, H. T.; LAPORTE, D. C. Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 16, p. 1197-1205, June 1995.
- NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, n. 101, n. 33, p. 12248-12253, Aug. 2004.
- NOVENTA-JORDÃO, M. A.; POLIZELI, M. L. T. M.; BONINI, B. M.; JORGE, J. A.; TERENCEZ, H. F. Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 378, n. 1, p. 32-36, Jan. 1996.
- NUTTALL, F. Q.; GANNON, M. C.; BAI, G.; LEE, E. Y. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v. 311, n. 2, p. 443-449, June 1994.
- OBSIL, T.; OBSILOVA, V. Structure/function relationships underlying regulation of FOXO transcription factors. **Oncogene**, Hampshire, v. 27, n. 16, p. 2263-2275, Apr. 2008.

- OLMEDO, M.; NAVARRO-SAMPEDRO, L.; RUGER-HERREROS, C.; KIM, S. R.; JEONG, B. K.; LEE, B. U.; CORROCHANO, L. M. A role in the regulation of transcription by light for RCO-1 and RCM-1, the *Neurospora* homologs of the yeast Tup1-Ssn6 repressor. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 47, n. 11, p. 939-952, Nov. 2010.
- OSTLING, J.; RONNE, H. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v. 252, n. 1, p. 162-168, Feb. 1998.
- PARROU, J. L.; TESTE, M. A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, Reading, v. 143, p. 1891-1900, June 1997.
- PEDERSON, B. A.; CHENG, C.; WILSON, W. A.; ROACH, P. J. Regulation of glycogen synthase. Identification of residues involved in regulation by the allosteric ligand glucose-6-P and by phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, n. 36, p. 27753-27761, Sept. 2000.
- PEÑALVA, M. A.; ARST, H. N. Jr. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 58, p. 425-451, June 2004.
- PERKINS, D. D. *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. **Genetics**, Baltimore, v. 130, n. 4, p. 687-701, Apr. 1992.
- ROACH, P. J. Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, n. 12, p. 2961-2968, Sept. 1990.
- ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Curr. Mol. Med.**, Hilversum, v. 2, n. 2, p. 101-120, Mar. 2002.
- ROACH, P. J.; SKURAT, A. V.; HARRIS, R. A. Regulation of glycogen metabolism. In: JEFFERSON, L. S.; CHENINGTON, A. D. **Handbook of physiology: the endocrine pancreas and regulation of metabolism**. Oxford: Oxford University Press, 2001. Cap. 19, p. 609-647.
- ROLLINS, J. A.; DICKMAN, M. N. pH signaling in *Sclerotinia sclerotium*: identification of a pacC/RIM1 homolog. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, n. 1, p. 75-81, Jan. 2001.
- RONNE, H. Glucose repression in fungi. **Trends Genet.**, Amsterdam, v. 11, n. 1, p. 12-17, Jan. 1995.
- RUIJTER, G. J. G.; VISSER, J. Carbon repression in *Aspergilli*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 151, n. 2, p. 103-114, June 1997.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHMITT, E. K.; HOFF, B.; KUCK, U. AcFKH1, a novel member of the forkhead family, associates with the RFX transcription factor CPC1 in the cephalosporin C-producing fungus *Acremonium chrysogenum*. **Gene**, Amsterdam, v. 342, n. 2, p. 269-281, Nov. 2004.

- SELITRENNIKOFF, C. P.; NELSON, R. E.; SIEGEL, R. W. Phase-specific genes for macroconidiation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, Baltimore, v. 78, n. 2, p. 679–690, Oct. 1974.
- SELKER, E. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 24, p. 579-613, Dec. 1990.
- SHAO, D.; CREASY, C. L.; BERGMAN, L. W. A cysteine residue in helixII of the bHLH domains is essential for homodimerization of the yeast transcription factor Pho4p. **Nucleic Acids Res.**, London, v. 26, n. 3, p. 710-714, Feb. 1998.
- SKURAT, A. V.; WANG, Y.; ROACH, P. J. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 41, p. 25534-25542, Oct. 1994.
- SMITH, R. L.; JOHNSON, A. D. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v. 25, n. 7, p. 325-330, July 2000.
- SMITH, T. F.; GAITATZES, C.; SAXENA, K.; NEER, E. J. The WD-repeat: a common architecture for diverse functions. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v. 24, n. 5, p.181-185, May 1999.
- SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newslett.**, Kansas City, v. 37, p. 41-43, Feb. 1990.
- SOPHIANOPOULOU, V.; SUAREZ, T.; DIALLINAS, G.; SCAZZOCCHIO, C. Operator derepressed mutations in the proline utilization gene cluster of *Aspergillus nidulans*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 236, p. 290-213, Jan. 1993.
- SPRAGUE, E. R.; REDD, M. J.; JOHNSON, A. D.; WOLBERGER, C. Structure of the C-terminal domain of Tup1, a corepressor of transcription in yeast. **EMBO J.**, London, v. 19, n. 12, p. 3016-3027, June 2000.
- SQUINA, F. M.; LEAL, J.; CIPRIANO, V. T. F.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. **Cell. Stress Chaperones**, New York, v. 15, n. 2, p. 225-231, Mar. 2010.
- STRAUSS, J.; HORVATH, H. K.; ADBALLAH, B. M.; KINDERMANN, J.; MACH, R. L.; KUBICEK, C. P. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and pos-transcriptional level. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 32, n. 1, p. 169-178, Apr. 1999.
- SU, S. S. Y.; MITCHELL, A. P. Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. **Genetics**, Baltimore, v. 133, n. 1, p. 67-77, Jan. 1993.
- SUN, J.; GLASS, N. L. Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 9, e25654, Sept. 2011.
- TIAN, C.; LI, J.; GLASS, N. L. Exploring the bZIP transcription factor regulatory network in *Neurospora crassa*. **Microbiology**, Reading, v. 157, p. 747-759, Mar. 2011.

- TIAN, C.; KASUGA, T.; SACHS, M. S.; GLASS, N. L. Transcriptional profiling of cross pathway control in *Neurospora crassa* and comparative analysis of the Gcn4 and CPC1 regulons. **Eukaryot. Cell**, Washington, v. 6, p. 1018-1029, June 2007.
- TILBURN, J.; SARKAR, S.; WIDDICK, D. A.; ESPESO, E. A.; OREJAS, M.; MUNGROO, J.; PEÑALVA, M. A.; ARST, H. N. Jr. The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline- expresses genes by ambient pH. **EMBO J.**, London, v. 14, n. 4, p. 779-790, Feb. 1995.
- TREITEL, M. A.; CARLSON, M. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 92, n. 8, p. 3132-3136, Apr. 1995.
- VAUTARD-MEY, G.; FEVRE, M. Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not the nuclear targeting of the fungal glucose regulator CRE1. **Curr. Genet.**, New York, v. 37, n. 5, p. 328-332, May 2000.
- VAUTARD-MEY, G.; FÈVRE, M. Carbon and pH modulate the expression of the expression of the fungal glucose repressor encoding genes. **Curr. Microbiol.**, New York, n. 46, n. 2, p. 146-150, Feb. 2003.
- VANKUYK, P. A.; DIDERICH, J. A.; MacCABE, A. P.; HERERRO, O.; RUIJTER, G. J.; VISSER, J. *Aspergillus niger* mstA encodes a high-affinity sugar/H⁺ symporter which is regulated in response to extracellular pH. **Biochem. J.**, London, v. 379, p. 375-383, Apr. 2004.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiol. Genet. Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.
- VOTH, W. P.; YU, Y.; TAKAHATA, S.; KRETSCHMANN, K. L.; LIEB, J. D.; PARKER, R. L.; MILASH, B.; STILLMAN, D. J. Forkhead proteins control the outcome of transcription factor binding by actiactivation. **EMBO J.**, London, v. 26, n. 20, p. 4324-4334, Sept. 2007.
- WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. **Nature**, London, v. 412, n. 6847, p. 607-614, Aug. 2001.
- WEILAND, J. J. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. **Fungal Genet. Newslett.**, Kansas City, v. 44, p. 60-63, Feb. 1997.
- YANG, X.; TALIBI, D.; WEBER, S.; POISSON, G.; RAYMOND, M. Functional isolation of the *Candida albicans* FCR3 gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. **Yeast**, Chichester, v. 18, n. 13, p. 1217-1225, Sept. 2001.
- YAMASHIRO, C. T.; EBBOLE, D. J.; LEE, B. U.; BROWN, R. E.; BOURLAND, C.; MADI, L.; YANOFISKY, C. Characterization of *rco-1* of *Neurospora crassa*, a pleiotropic gene affecting growth and development that encodes a homolog of TUP1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 16, n. 11, p. 6218-6228, Nov. 1996.
- ZIV, C.; GOROVITS, R.; YARDEN, O. Carbon source affects PKA-dependent polarity of *Neurospora crassa* in a CRE-1-dependent and independent manner. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 45, n. 2, p. 103-116, Feb. 2008.
- ZOU, C. G.; TU, H. H.; LIU, X. Y.; TAO, N.; ZHANG, K. Q. PacC in the nematophagous fungus *Clonostachys rosea* controls virulence to nematodes. **Environ. Microbiol.**, Oxford,

v. 12, n. 7, p. 1868-1877, July 2010.

A Genome-wide Screen for *Neurospora crassa* Transcription Factors Regulating Glycogen Metabolism*

Rodrigo Duarte Gonçalves‡, Fernanda Barbosa Cupertino‡, Fernanda Zanolli Freitas‡, Augusto Ducati Luchessi§, and Maria Célia Bertolini‡¶

Transcription factors play a key role in transcription regulation as they recognize and directly bind to defined sites in promoter regions of target genes, and thus modulate differential expression. The overall process is extremely dynamic, as they have to move through the nucleus and transiently bind to chromatin in order to regulate gene transcription. To identify transcription factors that affect glycogen accumulation in *Neurospora crassa*, we performed a systematic screen of a deletion strains set generated by the *Neurospora* Knockout Project and available at the Fungal Genetics Stock Center. In a wild-type strain of *N. crassa*, glycogen content reaches a maximal level at the end of the exponential growth phase, but upon heat stress the glycogen content rapidly drops. The gene encoding glycogen synthase (*gsn*) is transcriptionally down-regulated when the mycelium is exposed to the same stress condition. We identified 17 deleted strains having glycogen accumulation profiles different from that of the wild-type strain under both normal growth and heat stress conditions. Most of the transcription factors identified were annotated as hypothetical protein, however some of them, such as the PacC, XlnR, and NIT2 proteins, were biochemically well-characterized either in *N. crassa* or in other fungi. The identification of some of the transcription factors was coincident with the presence of DNA-binding motifs specific for the transcription factors in the *gsn* 5'-flanking region, and some of these DNA-binding motifs were demonstrated to be functional by Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) experiments. Strains knocked-out in these transcription factors presented impairment in the regulation of *gsn* expression, suggesting that the transcription factors regulate glycogen accumulation by directly regulating *gsn* gene expression. Five selected mutant strains showed defects in cell cycle progression, and two transcription factors were light-regulated. The results indicate that there are connections linking different cellular processes, such as metabolism control, biological clock, and

cell cycle progression. *Molecular & Cellular Proteomics* 10: 10.1074/mcp.M111.007963, 1–13, 2011.

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for the understanding of fundamental aspects of eukaryotic biology. The knowledge of its genome sequence (1) has allowed the identification of proteins required for gene regulation, such as the transcriptional regulatory proteins. An examination of the classes of transcription factors in the *N. crassa* genome reveals that the organism carries elements shared by simple and complex metazoan models (2). The availability of a set of deletion strains, each carrying a deletion in a specific ORF encoding a transcription factor, allows the screening for genes linked to a particular phenotype. Here we used this mutant strains set to identify transcription factors that either directly or indirectly regulate glycogen metabolism in *N. crassa*.

In many organisms, glycogen is a carbon and energy reserve carbohydrate with an intricate metabolism regulation that senses nutrient availability and other environmental conditions. The amount of glycogen found in a particular situation results from the balance between glycogen synthase and glycogen phosphorylase activities. These enzymes regulate, respectively, the synthesis and degradation of this compound and they are both regulated by phosphorylation. Besides reversible changes in their activities, glycogen levels are also correlated with physiological conditions. In addition, other proteins may also be involved in glycogen accumulation because protein activation resulting from different signaling pathways affects glycogen storage (3, 4).

In *N. crassa*, glycogen content reaches a maximal level at the end of the exponential growth phase. However, under stress conditions, such as heat shock, glycogen content drops rapidly (5, 6). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* accumulates glycogen under heat shock (7), demonstrating that yeast and *N. crassa* show opposite responses concerning this environmental condition. The glycogen decrease observed in *N. crassa* might result from the regulation, at transcriptional level, of enzymes involved in the carbohydrate metabolism, as transcription of the gene encoding glycogen synthase (*gsn*) decreases under heat stress (5, 8). The *gsn* promoter has one *cis*-acting STRE DNA

From the Addresses: ‡Instituto de Química, UNESP, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil; §Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas, Rua Pedro Zaccaria, 1300, 13484-350, Limeira, SP, Brazil
Received January 17, 2011, and in revised form, July 15, 2011

Published, MCP Papers in Press, July 18, 2011, DOI 10.1074/mcp.M111.007963

TABLE I
Oligonucleotides used in this study

Primer	Sequence ^a	Source	Name	Position (nt)
90-F	5'-CATATGTCGTCCACACCAGCCCAG-3'	ORF NCU00090	—	1 to 21
90-R2	5'-GGATCCTTACTTGTGAAGTGGAGCCTG-3'	ORF NCU00090	—	639 to 622
PacC-F	5'-GACCCAACAGCCCAACTT-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>pacC</i> probe	–1918 to –1901
GSN-RP3	5'-GCAACGAATACTCCCATG-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>pacC</i> probe	–1789 to –1806
GSN-FP4	5'-CTGATTGGGAAAGGTCAGA-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>nit2</i> probe	–1645 to –1626
GSN-RP2	5'-CTGTTGACCTGCGTTAAC-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>nit2</i> probe	–1269 to –1286
XLNR-F2	5'-TGAGGGTGAGAAAGTTGC-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>xlnR</i> probe	–2173 to –2156
XLNR-R2	5'-TATTCTGCAACGGAATCC-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>xlnR</i> probe	–2034 to –2053

^a *Nde*I and *Bam*HI restriction sites are underlined in the sequences. Positions are according to the ATG start codon of translation. Stop codon inserted in the ORF sequence is shown in bold.

motif, which is specifically bound by nuclear proteins activated under heat shock. In *S. cerevisiae*, STRE is recognized by two transcription factors, the zinc finger proteins Msn2p and Msn4p (Msn2/4p), which mediate the cellular response to multiple stresses and are components of the environmental stress response (9). We have previously combined biochemical techniques and a proteomic approach coupled to mass spectrometry in an attempt to identify *N. crassa* proteins that are activated upon heat shock and bind to the STRE motif of the *gsn* promoter (10). Only hypothetical proteins having domains that might be involved in transcription regulation were identified, and none of them had a DNA-binding domain.

To identify transcription factors regulating glycogen metabolism in the fungus *N. crassa*, we used a mutant strains set with single-gene deletions of known or putative transcription factors to search for mutant strains having glycogen accumulation profiles different from that in the wild-type strain. The mutant strains were analyzed under normal growth temperature (30 °C) and under heat shock stress (45 °C). The results described in this work showed that most of the transcription factors identified have been annotated in the *N. crassa* database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) as hypothetical proteins. However, many are proteins that have been functionally characterized, either in *N. crassa* or in other fungi. This indicates that glycogen metabolism regulation in eukaryotic cells comprises a complex regulatory network involving metabolic and nutrient sensing, which under certain circumstances could lead to impairment of cellular development.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Neurospora crassa Strains and Growth Conditions—The *N. crassa* strain FGSC 9718 (*mus-51::bar mat a*), and a set of 147 mutant strains individually knocked-out in genes encoding transcription factors were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC, University of Missouri, Kansas City, Missouri, <http://www.fgsc.net>) (11). The deletion strains comprise a set of mutants where each open reading frame (ORF)¹ has been disrupted from start to stop codon by the insertion of the *hph* gene (hygromycin B phosphotransferase) as a marker (12).

¹ The abbreviations used are: ORF, open reading frame; SREBP, sterol regulatory element binding protein; STRE, Stress Response Element; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride.

The strains were cultivated in Vogel's minimal medium (13) supplemented with 2% sucrose. After 10 days of culture, conidia were suspended in sterile water and counted. For the heat shock experiments, conidia (10⁷/ml) were first germinated in 60 ml of Vogel's minimal medium supplemented with 2% sucrose, at 30 °C and 250 rpm during 24 h. After this time an aliquot was removed, filtered, frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C until use. The remaining culture was filtered and transferred into fresh Vogel's medium preheated at 45 °C. After 30 min, the mycelia were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C.

Glycogen and Protein Quantification—Mycelia pads were ground to a fine powder in a prechilled mortar in liquid nitrogen, and extracted into lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM tosyl-L-lysine chloromethyl ketone, 1 mM benzamidin, and 1 μg/ml of each pepstatin and aprotinin). Cellular extracts were clarified by centrifugation at 3,000 × g, for 10 min at 4 °C, and the supernatants were used for glycogen and protein quantifications. Glycogen content was measured following the protocol described by Hardy and Roach (14), with slight modifications. Briefly, 100 μl of the crude extract was precipitated with 20% TCA (final concentration). The supernatant was separated after centrifugation (5,000 × g, 10 min, 4 °C), the glycogen was precipitated with 500 μl of 95% cold ethanol, collected by centrifugation, washed twice with 66% ethanol, dried, and digested with α-amylase (10 mg/ml) and amyloglucosidase (30 mg/ml). Free glucose was measured with a glucose oxidase kit, and the glycogen content was normalized to the total protein concentration. Total protein was quantified by the Hartree method (15), using BSA as standard.

RNA Extraction and Northern Assay—Total RNA was prepared using the LiCl method according to Sokolovsky *et al.* (16). Total RNA (15 μg) was electrophoresed on a 1.5% agarose-formaldehyde denaturing gel (17), at 65 V during 5 h, and then transferred to neutral nylon membranes (Hybond N, GE Healthcare) in 2 × SSC. The blots were probed with the full-length *gsn* cDNA (10⁶ to 10⁸ cpm), radiolabeled with [α -³²P]-dATP (3,000 μCi/mmol) by random priming (NEB kit, Biolabs) in 10 ml of ULTRAhyb hybridization solution (Ambion, Austin, TX), at 42 °C overnight. After hybridization, the blot was washed twice in 2 × SSC, 0.1% SDS for 10 min, and twice in 0.1 × SSC, 0.1% SDS for 15 min, and exposed to an x-ray film.

pacC cDNA Cloning and Production and Purification of the Recombinant Protein—For production of the truncated recombinant PACC transcription factor a 639-bp fragment of the ORF NCU00090 was amplified by PCR from a cDNA plasmid library (pYADE5-Nc) with the oligonucleotides 90-F and 90-R2 (Table I). The underlined sequences correspond to the *Nde*I and *Bam*HI sites, respectively. The amplified fragment was cloned into the *Nde*I-*Bam*HI sites of the pET28a vector leading to the plasmid construction pET-ΔPACC for the expression of a truncated protein containing the N-terminal 213 amino acids fused with His-tag. The plasmid construction was confirmed by DNA se-

quencing. For expression of the PACC recombinant protein, the plasmid construction was used to transform competent *E. coli* cells from BL21 (DE3) pLysS strain. Cells were grown at 37 °C in LB medium containing appropriate antibiotics and the recombinant protein was induced by addition of 0.4 mM final concentration of IPTG for 4 h, 37 °C. Cells were harvested by centrifugation, suspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 20% v/v glycerol, 0.5 mM PMSF, 25 mM benzamidine and 50 mM NaF) and lysed by sonication. The supernatant was clarified by centrifugation and subjected to affinity chromatography. The recombinant protein was eluted with linear imidazole gradient (20–500 mM) and dialyzed against dialysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 100 mM KCl, 20% v/v glycerol, 1 mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol). Purified protein was analyzed by SDS-PAGE with Coomassie Brilliant Blue staining (18) and quantified (15).

Preparation of Crude Cellular Extract—Mycelium of the wild-type strain grown at 30 °C was used to prepare the cellular extract. About 10 mg of frozen samples were ground to a fine powder under liquid nitrogen in a prechilled mortar, homogenized in a 20 ml of lysis buffer (15 mM HEPES-KOH pH 7.9, 10% w/v glycerol, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol, 0.5 mM PMSF, 10 µg/ml each of antipain and pepstatin A, 25 mM benzamidine, 50 mM NaF) and stirred with glass beads in 8 cycles of 30 s of agitation and 30 s on ice. Crude cellular extract was obtained after centrifugation (3,200 × g, 2 min, 4 °C), dialyzed against buffer D (15 mM HEPES-KOH pH 7.9, 15% w/v glycerol, 100 mM KCl, 1 mM EDTA) at 4 °C for 2 h, and cleared by centrifugation (20,000 × g, 20 min, 4 °C) before loading onto a HiTrap Heparin-Sepharose FF column (GE Healthcare). Total proteins were eluted by using a 0.1–1.5 M KCl linear gradient and the protein fractions were dialyzed against buffer D plus 0.5 mM PMSF, 25 mM benzamidine and 50 mM NaF, frozen in liquid N₂ and stored at –80 °C. Total protein was quantified (15).

Electrophoretic Mobility Shift Assay—DNA-protein binding reactions were carried out in 1 × binding buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.9, 20 mM KCl, 10% v/v glycerol, 1 mM dithiothreitol, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 12.5 mM benzamidine, 5 µg/ml of each antipain and pepstatin A) containing 2–4 µg poly(dI-dC).(dI-dC) as unspecific competitor, and either 2.0 µg of PACC recombinant protein or 35 µg of crude cellular extract. The radiolabeled DNA probe (~10⁴ cpm) was added and reactions were incubated during 20 min at room temperature. Free probe was separated from DNA-protein complexes by electrophoresis on a native 4% polyacrilamide gel in 0.5 × Tris borate-EDTA (TBE) buffer (300 V, 10 mA, 10 °C). After electrophoresis, the gel was dried and autoradiographed. For competition assays, an excess of specific DNA competitor was added to the binding reactions 10 min prior the incubation with the radiolabeled probe.

DNA Probes and Competitors for EMSA—To produce the 134-bp *nit2*, 146-bp *pacC*, and 139-bp *xlnR* probes, DNA fragments containing the *nit2*, *pacC*, and *xlnR* *cis* elements from the *gsn* promoter, respectively, were amplified from the IV9A-1 plasmid (GenBank#AF417205) using the oligonucleotides described in Table I in the presence of [α -³²P]-dATP (3,000 Ci/mmol). The DNA probes were purified on a 2% low-melting point agarose gel. Unlabeled *nit2*, *pacC* and *xlnR* probes, used as specific DNA competitors, were quantified by measuring the absorbance at 260 nm, and added to the binding reaction in 10-fold molar excess.

Flow Cytometry Analysis—Conidia were harvested by centrifugation after growing in Vogel's minimal solid medium with 2% sucrose, and a total of 5 × 10⁴ cells were suspended in 0.5 ml of PI solution (0.1% v/v Triton X-100, 0.1% sodium citrate, 0.9 U/ml RNase A, 50 µg/ml propidium iodide). The cell suspension was kept in the dark for 1.5 h at room temperature. A FACSCalibur™ flow cytometer equipped with CellQUEST™ software (Becton Dickinson, San Juan, CA) was used to analyze cell size using a Forward Scatter detector

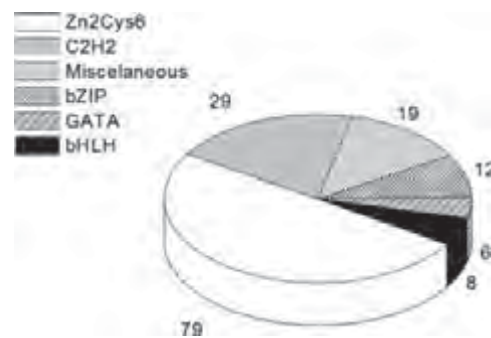


Fig. 1. **Families of *N. crassa* transcription factors.** Distribution in percentage of transcription factor families represented by mutant strains analyzed here.

(FSC-H), and cell complexity using a Side Scatter detector (SSC-H). Propidium iodide incorporation was measured using a fluorescence detector, with an excitation wavelength of 488 nm and an emission wavelength of 585/42 nm. Ten thousand events were evaluated per sample. The experiments were repeated at least three times.

Bioinformatic Tools—Online bioinformatic tools were used to predict the biochemical parameters of the selected transcription factors. The nucleotide sequences of the knocked-out ORFs coding the transcription factors were identified in the fungus genome at the Broad Institute home page (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>). The polypeptide sequences were compared against the database of sequences available at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), using the BlastP tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) to identify sequences with known function similar to the search sequence. For the theoretical estimates of the isoelectric point and molecular weight, the ProtParam tool at the ExPASy server was used (ca.expasy.org). The presence of protein domains was investigated using the *N. crassa* genome at the FGSC (<http://www.fgsc.net/scripts/strainsearchform.asp>), SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), and Pfam 22.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk>) web sites. The presence of classical Nuclear Localization Signals (cNLS) was determined by PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>), and the presence of *cis* DNA elements in the *gsn* promoter was determined by MatInspector (www.genomatix.de).

RESULTS

We screened a set of *N. crassa* mutant strains, each carrying a deletion in a single gene encoding a transcription factor. Fig. 1 shows the transcription factor families to which the proteins belong. Most belong to the Zn₂Cys₆ fungal binuclear cluster family, which is fungus-specific and the largest class of transcription factors in *N. crassa* (2). The second largest class of transcription factors analyzed in this work is the C₂H₂ family, found in both prokaryotic and eukaryotic organisms. A considerable number of miscellaneous factors were screened, including the CAAT-binding transcription factors, and transcription factors carrying the forkhead, homeobox, RING finger, and WD repeat domains. These factors usually play important roles in the cell cycle biology of eukaryotic organisms. A smaller number of transcription factors belonging to the bZIP, GATA, and bHLH families was also screened (2).

Transcription Factors Controlling Glycogen Accumulation—Previous results from our group have shown that wild-type *N.*

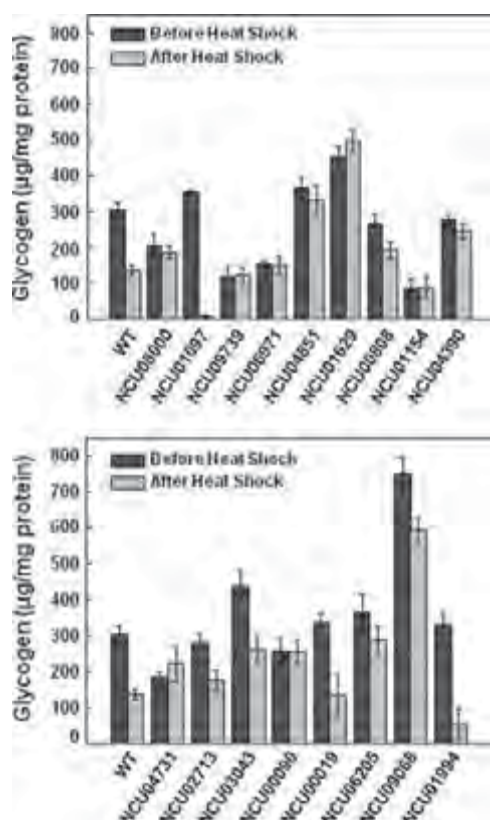


FIG. 2. **Glycogen accumulation before and after heat shock in selected mutant strains.** Glycogen was extracted from mycelia submitted or not to heat shock (transfer from 30 °C to 45 °C), digested with α -amylase (10 mg/ml) and amyloglucosidase (30 mg/ml), and the free glucose was enzymatically determined with a glucose oxidase kit. Results represent the average of at least three independent experiments. WT, FGSC 9718 strain.

crassa accumulates glycogen at high levels at the end of the exponential growth phase while growing under its regular temperature (30 °C), and that the glycogen content decreases when the mycelium is exposed to heat shock (45 °C) (5, 6). To identify transcription factors regulating glycogen metabolism in the fungus *N. crassa*, we used a mutant-strain set with single-gene deletions of putative or already known transcription factors to search for mutant strains having glycogen accumulation profiles different from that found in the wild-type strain. The mutant strains were analyzed under normal growth temperature (30 °C) and heat shock stress (45 °C).

Of the 147 mutant strains analyzed, 17 presented patterns of glycogen accumulation different than the wild-type strain (Fig. 2). Five strains (knocked-out in the ORFs NCU08000, NCU09739, NCU06971, NCU01154, and NCU00090) were selected because they did not show differences in their glycogen content either before or after heat shock. Note that at both temperatures, low levels of glycogen accumulated in the strains with deleted NCU09739, NCU06971, and NCU01154 ORFs. The strains with deleted NCU04851, NCU00808, NCU04390, NCU02713, NCU03043, and NCU06205 ORFs

were selected because they showed less pronounced reduction in glycogen levels after heat shock, compared with the wild-type strain. Two mutant strains (mutated in the ORFs NCU01097 and NCU01994) showed extremely large glycogen content reductions after heat shock. Interestingly, the strains mutated in the ORFs NCU01629, and NCU04731 accumulated more glycogen under the heat shock condition than under the normal growth condition. Finally, a hyper-accumulation of glycogen was observed in the NCU01629 and NCU09068 ORFs deleted strains in both temperatures. All of these mutant strains showed impaired control of glycogen accumulation, compared with the wild-type strain, suggesting that the transcription factors missing in the mutant strains might be involved in the regulation of glycogen accumulation.

The biochemical and molecular characteristics of the selected transcription factors are shown in Table II. Most belong to the Zn_2Cys_6 zinc finger family, the largest class in *N. crassa* (2). Four proteins belong to the C_2H_2 zinc finger family, and two to the GATA zinc finger, a family only found in eukaryotic organisms. The bHLH and bZIP transcription factor families both have one member among the selected proteins, and proteins having either the forkhead domain or the Tup-N-terminal and WD repeats, which belong to the miscellaneous factor family (2), were also selected in our screen. Fifteen selected transcription factors have cNLS, which are amino acid sequences that target cargo proteins into the nucleus, either monopartite or bipartite (19). Two transcription factors (ORFs NCU09739 and NCU06205) do not have amino acid sequences characteristic of cNLS. One transcription factor, annotated as hypothetical protein, might have a nonclassical NLS (ORF NCU09739), and the *rco-1* (regulation of conidiation) gene product is the *S. cerevisiae* Tup1 homolog (ORF NCU06205, described below).

Most of the selected transcription factors have not yet been characterized at the protein level, and were annotated as hypothetical proteins in the *N. crassa* database (Table II), whereas many of them have been described as being involved with growth and development in the fungus (12). Only a few proteins have functional roles that have already been extensively studied. One is the *N. crassa* NIT2 protein (ORF NCU09068), a GATA transcription factor that interacts with the Zn_2Cys_6 NIT4 protein to activate expression of nitrate and nitrite reductases (20). Another is the *S. cerevisiae* Tup1 ortholog RCO-1 protein (ORF NCU06205), functionally characterized as a regulatory protein that mediates mycelial repression of conidiation gene expression (21). The gene annotated as *pacC* (ORF NCU00090) is the *pacC/RIM101* ortholog, extensively studied in *Aspergillus nidulans* and *S. cerevisiae* as encoding a transcription factor involved in pH regulation by activating genes in alkaline conditions and repressing those genes expressed in acidic conditions (22). The *ctf-1 α* gene (ORF NCU08000) product is the well-characterized cutinase transcription factor Ctf1 α ortholog, which was described as upregulating genes encoding cutinase enzymes in other fila-

TABLE II

Classification of the transcription factor family, annotation, biochemistry, and structural characteristics of the proteins selected

The identification of each strain was made according to the FGSC number. Theoretical estimate of physical and chemical characteristics and identification of cNLS were performed according to ProtParam tools (www.expasy.org/tools/protpar-ref.html) and PsortII (<http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>), respectively. MW, molecular weight; pI, isoelectric point; cNLS, classical Nuclear Localization Signals; M, monopartite; B, bipartite; NI, not identified.

FGSC#	ORF	Transcription factor family	Theoretical MW/pI	cNLS	Annotation ^a	Gene	Reference
11004	NCU08000	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	105.43/6.78	33-PTPKRKK (M) 600-KRHRR (M)	Cutinase transcription factor 1 α	<i>ctf-1α</i>	23
11039	NCU01097	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	90.23/6.34	36-KRVKAVTQACHTCRRYK (B)	Hypothetical protein	NI	-
11062	NCU09739	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	75.09/7.85	NI	Hypothetical protein	<i>ada-7</i>	-
11067	NCU06971	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	103.16/6.44	87-PIRRIS (M) 128-RKKR (M)	Transcriptional activator XlnR	<i>xlnR</i>	28
11089	NCU04851	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	119.36/7.87	268-PKEKRW (M) 221-PKRRNRPAVSCIPCRGRI (B)	Hypothetical protein	NI	-
11102	NCU01629	C ₂ H ₂ zinc finger	45.91/8.82	240-PRPKRQQ (M)	Hypothetical protein	NI	-
11123	NCU00808	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	66.25/5.79	185-PRIKTKK (M)	Hypothetical protein	NI	-
11126	NCU01154	GATA zinc finger	51.01/8.89	402-KRKK (M)	Hypothetical protein	<i>sub-1</i>	-
11134	NCU04390	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	93.67/6.6	89-PQPPRRRKKK (M) 94-RRKKKPKHERDLRLKKY (B)	Hypothetical protein	<i>col-22</i>	-
11139	NCU04731	bHLH	117.54/6.17	276-PNSRRKK (M)	Hypothetical protein	<i>sah-2</i>	33
11348	NCU02713	C ₂ H ₂ zinc finger	31.2/8.99	107-KRPR (M)	Hypothetical protein	<i>csp-1</i>	30
11355	NCU03043	C ₂ H ₂ zinc finger	41.73/ 8.57	312-KKHK (M) 361-RRHKK (M)	Protein FlbC	NI	-
11397	NCU00090	C ₂ H ₂ zinc finger	67.3/7.19	280-PFDARKR (M) 285-KRQFDLNDFFGSVKRR (B)	pH response transcription factor	<i>pacC-1</i> <i>pacC/RIM101</i>	37
11437	NCU00019	Forkhead domain	74.61/7.86	33-PSKRRKK (M) 454- PASSRRKK (M)	FKH1 protein	NI	-
11371	NCU06205	Tup-N-Terminal & WD repeats	66.08/6.42	NI	Transcriptional repressor	<i>rco-1</i>	21
11392	NCU09068	GATA zinc finger	109.29/8.89	287-PIKARKD (M) 325-RKTSIDETSKRNPNRKR (B)	Nitrate catabolic enzyme regulatory protein	<i>nit-2</i>	39
11342	NCU01994	bZIP	36.01/5.26	140-PAQSRRK (M) 144- RRKAQNRAAQRAFRRERKE (B)	Hypothetical protein	NI	-

^a Annotation was performed according to Borkovich *et al.* (2) and the *N. crassa* database at the FGSC site (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>).

mentous fungi, such as *Fusarium solani* (23, 24) and *F. oxysporum* (25). The NCU03043 gene product revealed homology (68% identity) with the FLE1 protein of *Podospora anserina* (26) and the FlbC protein of different fungi including *A. clavatus* and *A. fumigatus* (27). Both FLE1 and FlbC are transcription factors involved in fungi development. Finally, the XlnR ortholog encoded by the ORF NCU06971 is a global transcriptional activator controlling the expression of genes encoding xylanolytic and cellulolytic enzymes, which was first isolated in *A. niger* (28).

Although most of the transcription factors identified in our screen were annotated as hypothetical proteins, some showed homology with proteins that have already been studied. The ORF NCU02713 deleted strain corresponds to the *N. crassa* *csp-1* (conidial separation-1) mutant previously isolated by Selitrennikoff *et al.* (29), which showed improper separation of conidia from hyphae. This gene was recently described to encode a light-inducible transcription factor (30). The protein codified by the ORF NCU01994 is the *Candida albicans* Fcr3 (fluconazole resistance 3) ortholog transcription factor (31). The Fcr3 protein was able to complement a *S. cerevisiae* mutant strain lacking the transcription factors Pdr1

and Pdr3, which control the expression of several genes involved in Pleiotropic Drug Resistance. The NCU00019 gene product belongs to the forkhead (or Fox, for Forkhead box) transcription factor family, which has been identified in many metazoans as playing important roles in diverse biological processes (32). The ORF NCU04731 encodes a protein having 52% identity with the *S. pombe* Sre1 transcription factor, a sterol regulatory element binding protein (SREBP) functionally conserved among different fungi. Fungal SREBPs are hypoxic transcription factors required for adaptation to a low oxygen environment (33). Finally, the ORFs NCU01097, NCU09739, NCU04851, NCU01629, NCU00808, NCU01154, and NCU04390 encode hypothetical proteins without any previously described function.

***gsn* Expression in Selected Mutant Strains** — To investigate whether the glycogen accumulation pattern of mutant strains could be related to *gsn* regulation, gene expression analysis was performed by Northern blot. Previous results from our group have shown a decrease in *gsn* transcript levels when mycelium of the wild-type *N. crassa* were transferred from 30 °C to 45 °C (5, 8). In the present study, *gsn* gene expression in the selected mutant strains was analyzed before and

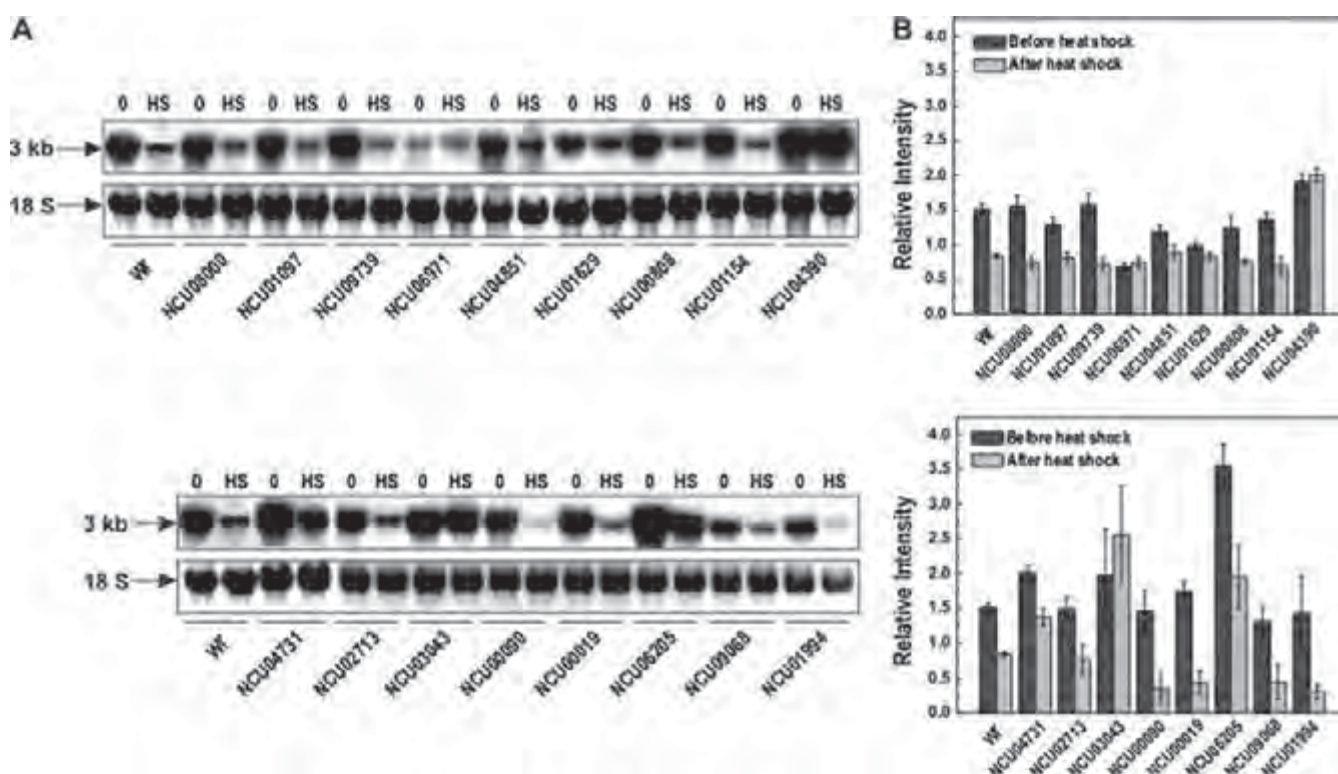


FIG. 3. *gsn* gene expression assay by Northern blot before and after heat shock in the selected mutant strains. Mycelia were cultivated at 30 °C for 24 h and then shifted to 45 °C. Samples were collected before (0) and after (HS) temperature shift and total RNA was extracted. Total RNA (15 µg) was separated by electrophoresis in a denaturing formaldehyde gel, transferred to nylon membrane and probed with the [α - 32 P] radiolabeled full-length *gsn* cDNA. A, upper panel, gel autoradiography, lower panel, the 18 S rRNA was used as loading control after ethidium bromide staining of the same gels. B, densitometric analysis of the *gsn* gene expression relative induction (ImageJ software). Results represent the average of at least three independent experiments. WT, FGSC 9718 strain.

after exposure to 45 °C. Many of the mutant strains presented a *gsn* transcription profile similar to that observed in the wild-type strain, in which a lower *gsn* expression was observed after heat shock (Fig. 3). However some mutants showed differences, either because the transcript levels were slightly reduced after heat shock (as seen, for example, for strains with deleted NCU04851, NCU01629, and NCU04731 ORFs), or because the transcript levels were strongly reduced after heat shock (as for strains with deleted NCU00019 and NCU01994 ORFs), as compared with the wild-type strain. Surprisingly, some of the mutant strains showed equal transcript levels both before and after heat shock (strains with NCU06971, NCU04390, and NCU03043 deleted ORFs), indicating loss of *gsn* gene expression regulation after heat stress. Also, high transcript levels for NCU04390 ORF deleted strain (both before and after heat shock) and NCU06205 ORF deleted strain (before heat shock) were detected.

An attempt to correlate the *gsn* expression profile with the glycogen accumulated under both environmental conditions analyzed in this work indicated that in several mutant strains the amount of glycogen correlated with *gsn* transcript levels (Fig. 3). For example, the NCU06971 ORF deleted strain showed equal amounts of glycogen and the same transcript

levels before and after heat shock. In addition, the amount of glycogen and the *gsn* transcript levels before heat shock were lower than that found in the wild-type strain. A good correlation was also observed for the strains mutated in the ORFs NCU04851, NCU04390, and NCU0199. However, the hyper-accumulation of glycogen observed in the ORF NCU09068 mutant strain may not solely result from *gsn* expression, as low transcript levels were observed under both environmental conditions. Thus, the transcription factors could act either directly on gene expression or indirectly, by regulating a gene whose product affects gene expression.

A search for putative transcription factor binding sites on the *gsn* 5'-flanking region was performed using the *MatInspector* tool. One putative binding site for the CTF α , PacC, and NIT2 proteins was found at positions -2248, -1803, and -1558 bp, respectively, two putative binding sites for the Sre1 (positions -1758 and -2024) and XlnR (positions -2071 and -2252) orthologue were found, and five sites were identified for the Mig1 orthologue at positions -2305, -2026, -1592, -1487, and -317, relative to the ATG start codon (Fig. 4). The *S. cerevisiae* Mig1 transcription factor, the Cre1/CreA protein orthologue in filamentous fungi, is a major protein that drives the complex Ssn6-Tup1 by repressing a set of glucose-repressible genes (34). Interestingly, the Tup1 protein is the *N.*

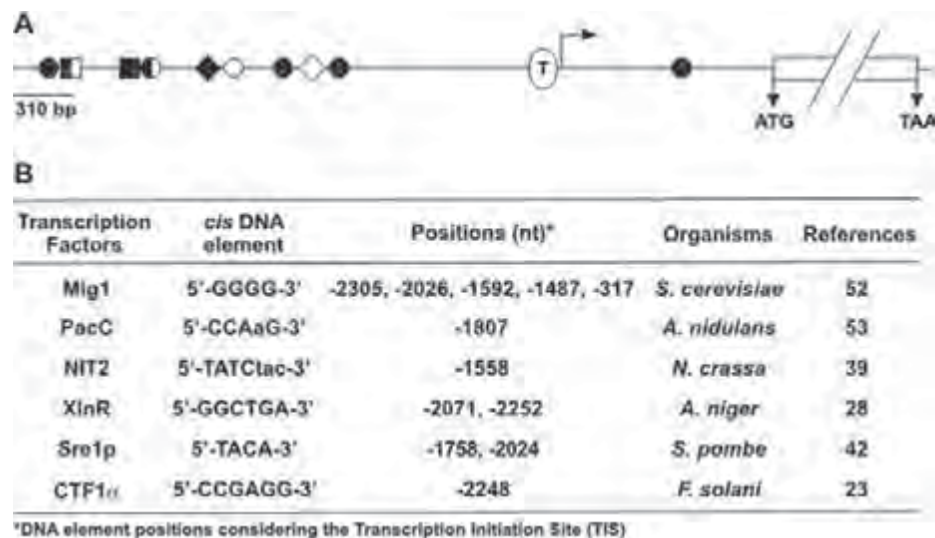


FIG. 4. **Representation of the *gsn* gene 5'-flanking region.** A, the relative position of the DNA motifs recognized by the transcription factors Mig1 (●), PacC (◆), NIT2 (◇), XlnR (■), Sre1p (○), and CTF1 α (□) are indicated. The TATA-box sequence is indicated by T. The *gsn* ORF is delimited by the ATG start codon and the TAA stop codon. The Transcription Initiation Site (TIS) is represented by an arrow. B, regulatory DNA elements found in the *gsn* gene 5'-flanking region.

crassa RCO-1 protein (NCU06205) ortholog, which was identified in the present study as a putative transcription factor involved in the regulation of glycogen metabolism.

Binding of the Transcription Factors to the *gsn* Promoter—Gel shift analysis was performed to investigate whether some of the selected transcription factors having putative *cis* motifs in the *gsn* promoter were able to recognize and bind to DNA fragments containing their respective motifs. As shown in Fig. 5, the recombinant PACC protein bound to the *pacC* probe and formed a unique and strong DNA-protein complex (Fig. 5A, lane 2), which was reduced in the presence of a 10-fold molar excess of unlabeled *pacC* probe (Fig. 5A, lane 3). This finding shows that the *pacC* *cis* element present in the *gsn* promoter is an active binding site for the PACC transcription factor. The NIT2 and XlnR putative binding sites were analyzed using crude cellular extract (CCE) prepared from mycelium from the wild-type strain fractionated by affinity chromatography. Two chromatographic fractions were analyzed in binding reactions with the *nit2* probe, as shown in Fig. 5B. DNA-protein complexes were observed in the two fractions (Fig. 5B, lanes 2 and 4), which were removed in the presence of 10-fold molar excess of the unlabeled probes (Fig. 5B, lanes 3 and 5). One fraction was used to analyze the *xlnR* probe and a specific complex was observed (Fig. 5C, lane 2), which was also reduced in the presence of 10-fold molar excess of the unlabeled probe (Fig. 5C, lane 3). Taken together, the results indicate that the transcription factors analyzed were able to bind to their *cis* elements present in the *gsn* promoter, suggesting they may have a role in glycogen metabolism regulation.

Flow Cytometric Analysis—Flow cytometric analysis was used to investigate the cell size, cell complexity, and level of

propidium iodide (PI) incorporation of the selected mutant strains. PI is a red fluorescent compound that binds to DNA and can be used to evaluate DNA content in individualized cells by flow cytometry. The intensity of fluorescence is proportional to the quantity of DNA available to PI intercalation. The DNA content in a cell can vary as a function of the cell cycle phase, therefore the comparative intensity of fluorescence is $G0/G1 < S < G2/M$. Apoptotic cells carry condensed and fragmented DNA promoting a lower fluorescence than cells at G0/G1. This analysis was performed for 10,000 cells from each mutant strain, and compared with the wild-type strain. Fig. 6 shows the results obtained from the Forward Scatter and Side Scatter detectors, which reveal cellular size and complexity, respectively. From all strains analyzed, the NCU02713, NCU03043, NCU06205, and NCU09739 ORFs deleted strains presented altered light scattering profiles, compared with the wild-type strain. The NCU02713 ORF deleted strain showed a discrete increase of cells that was smaller and slightly less complex. The NCU03043 and NCU09739 ORFs deleted strains presented expressive increase of smaller size cells and decreased complexity, whereas the NCU06205 ORF deleted strain showed a distinct increase of smaller cells together with some decrease in complexity. It is important to mention that the parameter of complexity (*i.e.* shape of the nucleus, the amount and type of cytoplasmic granules and membrane roughness) can be affected by cell size.

Fig. 7 shows the results obtained from mutants that showed changes on fluorescence profile by PI treatment. All mutants with defective morphology presented some alteration in PI incorporation, as revealed by overlapping the mutants and wild-type strain profiles (*right panels*). The areas M1 and M2

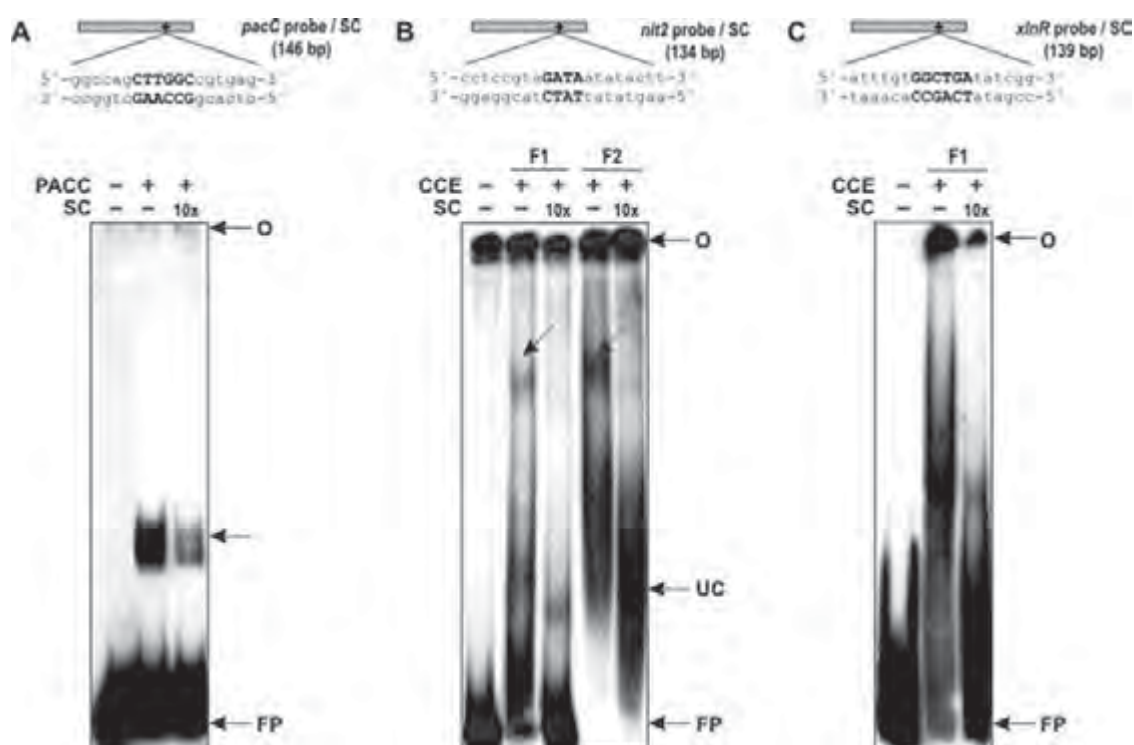


FIG. 5. Binding of proteins from *N. crassa* WT strain to fragments of the *gsn* promoter. A, upper panel, schematic representation of the *pacC* probe with the PACC motif (small black diamond) and part of its neighboring sequences. Lower panel, gel shift analysis of PACC motif using 2 µg of the His-ΔPACC recombinant protein. Lane 1, *pacC* probe, no protein added. The DNA-complexes are indicated by arrows. B and C, upper panels, schematic representation of the *nit2* and *xlnR* probes, respectively, with their motifs (small black diamond) and part of their neighboring sequences. Lower panels, gel shift analysis of NIT2 and XLNR motifs using Heparin-Sepharose chromatographic fractions (F1 and F2). An amount of 35 µg of each fraction obtained by affinity chromatography of crude cellular extract was assayed. Lane 1, *nit2* and *xlnR* probes, no protein added; Lanes 2 and 4, binding in the absence of the specific competitors; Lanes 3 and 5, binding in the presence of the specific competitors. CCE, crude cellular extract; UC, unspecific complex; O, gel origin; SC, specific competitor; FP, free probe.

represent cells at transition phases G0/G1 and G2/M of the cell cycle, respectively. The NCU02713 ORF deleted strain presented a high PI content for cells at the G2/M transition phase, indicating that this strain can carry some cellular impairment associated with the G2/M phase. The NCU03043 and NCU06205 ORFs deleted strains showed similar profiles, with a high content of cells between the M1 and M2 areas. This area represents cells at the S phase, indicating that these strains can carry impairments associated with the S phase or related to the S/G2 transition phase. The NCU09739 ORF deleted strain presented a high content of cells prior to the M1 area. Here, low PI incorporation might be a consequence of either loss of DNA content because of an irregular cell cycle, or DNA fragmentation associated to apoptosis. It is noteworthy that the mutant strains shown in Fig. 7 display visible and severe growth defects, such as low conidiation and reduction in both the extension and production of aerial hyphae, compared with the wild-type strain, indicating that the proteins are required for normal vegetative growth and development.

DISCUSSION

The release of the complete *N. crassa* genome (1) and the availability of a mutant strains collection with each strain

deleted in a single gene have allowed us to perform a screening aimed to investigate specific aspects of the fungus cell biology. In this type of screen, the phenotype analyzed corresponds to a loss of function, so that conclusions can be drawn concerning the involvement of a particular gene product in the phenotype scored as emphasized in a similar screen in *S. cerevisiae* (35). In this work, we detected alterations in glycogen accumulation in *N. crassa* strains deleted in transcription factors, to identify not yet previously described transcriptional regulators of glycogen metabolism. Transcription factors often control gene transcription through binding to specific DNA-binding sites, which can either promote (activate) or repress (inhibit) the recruitment of the transcription initiation machinery. To fully understand a gene function, it is helpful to understand the regulatory network context in which the gene participates, and that includes identification of the transcription factors involved in its regulation.

The fungus *N. crassa* has been widely used as a model organism, as it exhibits both asexual development and sexual differentiation. Following the availability of its genome sequencing, it has emerged as a suitable model organism for higher eukaryote studies because of its multicellularity and the high number of genes without orthologues available in public

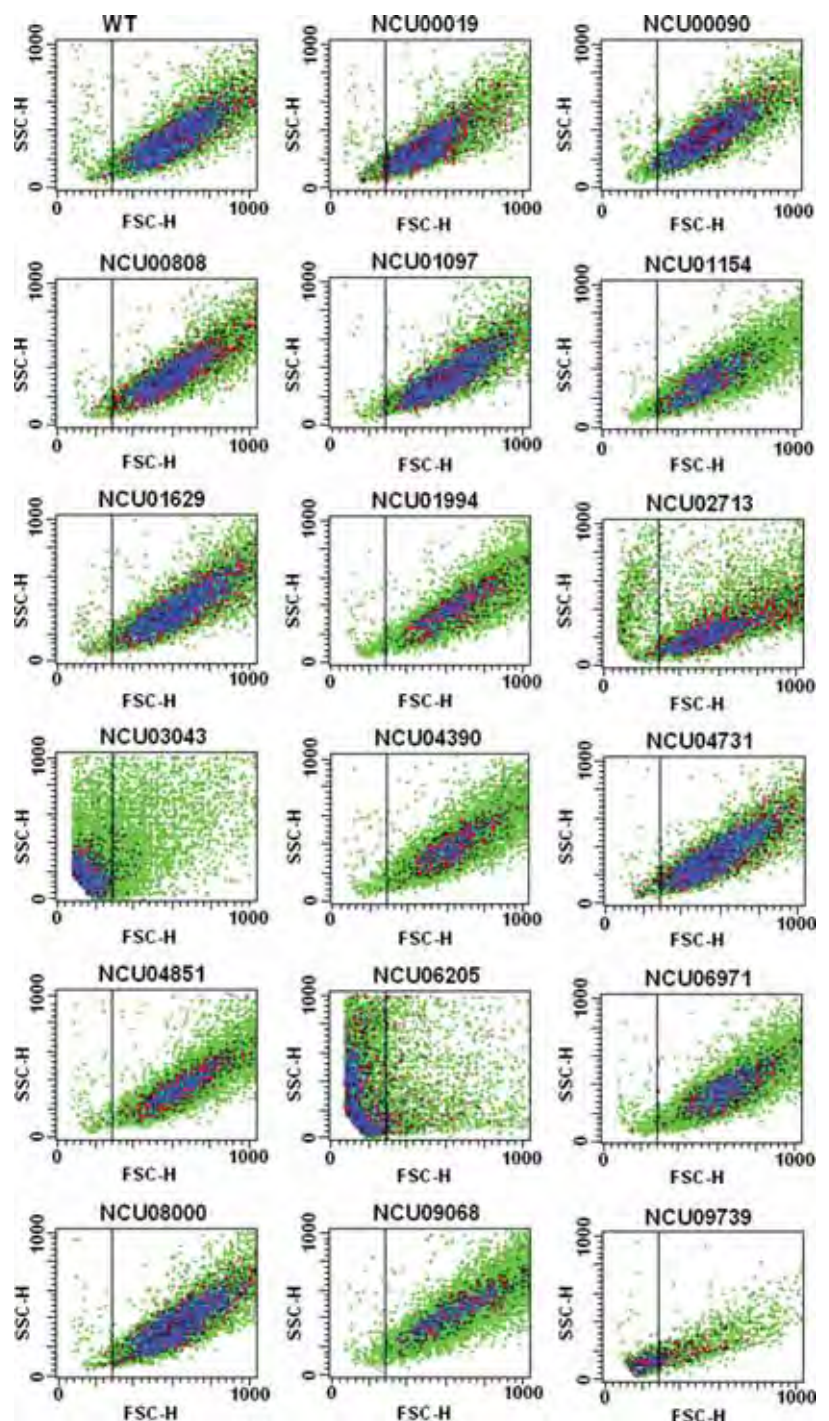


FIG. 6. **Morphological analysis of the mutant strains by flow cytometry.** Analysis of cell size (FSC-H) and cell complexity (SSC-H) was performed using 10,000 events. Results from one of at least three independent experiments are shown.

databases. It is typically a haploid organism, undergoing only a very transient diploid stage immediately prior to meiosis. In addition, the existence of gene-silencing mechanisms, such as the Repeat Induced Point Mutation, that eliminate duplicated sequences (36), makes it an advantageous organism in the type of screen performed in the present work, which is based on mutant strains having single gene deletion.

Herein we used a quantitative assay to measure glycogen accumulation in a set of strains with deleted transcription

factors. Our results demonstrate that transcription factors belonging to different families regulate glycogen metabolism during vegetative growth and also under a stress condition such as heat shock. It should be noted that the amount of glycogen that is accumulated results from the balance between glycogen synthase and glycogen phosphorylase activities. These enzymes are regulated in an opposite way; phosphorylation activates glycogen phosphorylase and inhibits glycogen synthase. In *N. crassa* glycogen synthase activity is

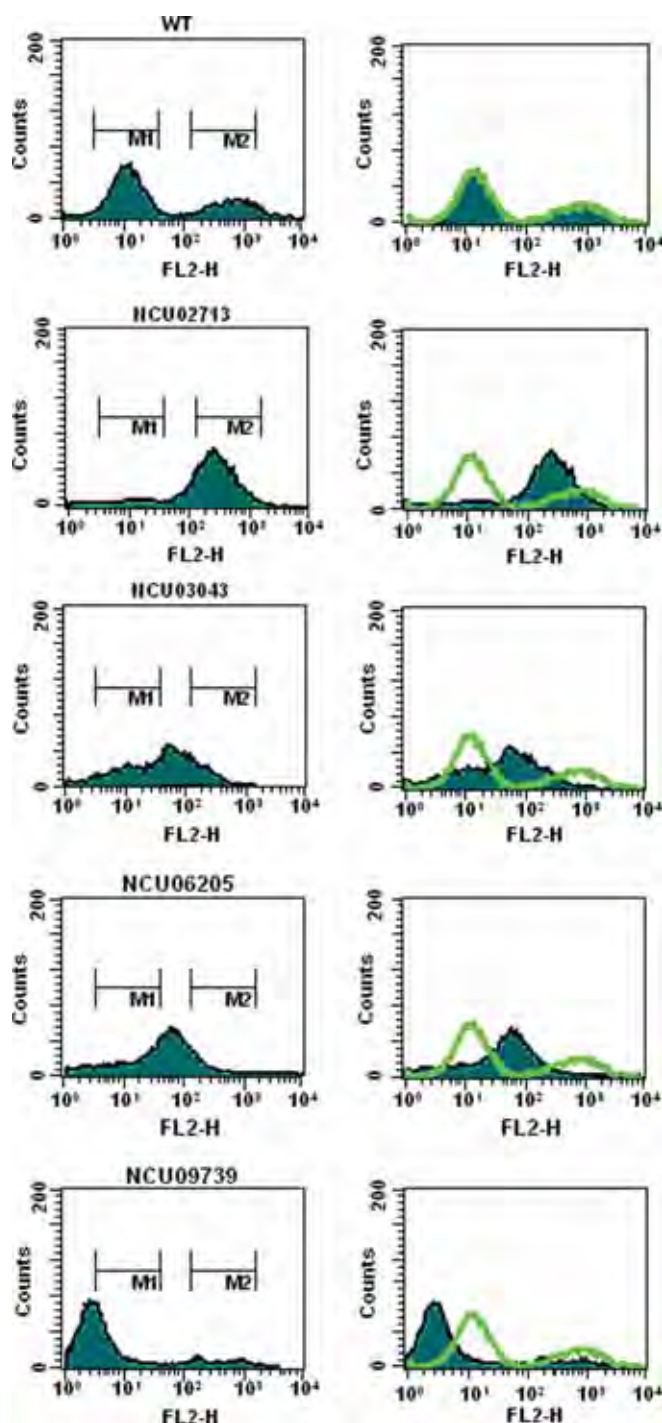


FIG. 7. Analysis of propidium iodide (PI) incorporation by the selected mutant strains using flow cytometry. PI fluorescence (FL2-H) was measured for 10,000 events. The M1 and M2 areas reveal cells at the G0/G1 and G2/M phases of the cell cycle, respectively. The area between M1 and M2 is related to cells at the S phase of the cell cycle. The sub-M1 area is related to cells with low PI incorporation. Results from one of at least three independent experiments are shown.

inhibited under heat shock (45 °C) whereas glycogen phosphorylase activity is activated under the same condition (5, 6). Many of the transcription factors identified in our screen have

been functionally characterized in different organisms, and some of them may play a role in the control of glycogen metabolism. This hypothesis is reinforced by the existence of DNA-binding sites specific for the transcription factors found in the *gsn* gene 5'-flanking region.

The transcription factor PacC responds to changes in extracellular pH by activating specific alkaline genes and repressing specific acid genes (37). Here, we demonstrated that this transcription factor binds to *gsn* promoter. The transcription factor XlnR is described as a transcriptional activator controlling the expression of genes encoding xylanolytic and cellulolytic enzymes in filamentous fungi (28). Our results indicate the latter transcription factor may also control the expression of genes encoding enzymes required for the metabolism of other carbon sources, such as the enzymes involved in glycogen metabolism, thus up-regulation of *gsn* expression results in glycogen accumulation. Interestingly, it has been shown that the XlnR-induced expression of genes encoding xylanolytic enzymes is modulated by the carbon catabolite repressor Cre1/CreA transcription factor in *Aspergillus* (38). The Cre1/CreA fungal protein is the *S. cerevisiae* Mig1 transcription factor orthologue that has five putative binding sites in the promoter *gsn*, suggesting that this transcription factor is a protein that deserves further investigation concerning the regulation of glycogen metabolism.

Another transcription factor identified in our screen is the *N. crassa* NIT2 protein (AreA in *A. nidulans*), a member of the GATA factors family, already characterized in *N. crassa* as a positive regulator of genes encoding enzymes for nitrogen source catabolism under nitrogen limiting conditions (39). Based on our results, we can suggest that this transcription factor acts as a repressor of carbon metabolism, because the knocked-out strain showed loss of glycogen accumulation regulation, despite having low *gsn* gene expression as compared with the wild-type strain. A link between carbon and nitrogen regulation was reported by Lockington *et al.* (40), who described the effect of both carbon and nitrogen sources on the amount of cellulases secreted in *A. nidulans*. Although the result was preliminary, the authors suggested the existence of a link in the regulation of the carbon and nitrogen utilization pathways in filamentous fungi.

Although most transcription factors here identified belong to the zinc finger family, at least one member of the bHLH, bZIP, forkhead, and WD repeat proteins was also identified. Interestingly, the bHLH transcription factor identified in this work (NCU04731) has, at the C-terminal region, a domain found in ER membrane-bound transcription factors called SREBP. The SREBPs can be distinguished from other bHLH proteins by the presence of a tyrosine instead of an arginine residue in their basic regions (41). The first SREBP fungal orthologue was identified in *S. pombe* (42), and more recently it was characterized in other fungal species, such as *Candida albicans* (43), *A. fumigatus* (44), and *Cryptococcus neoformans* (45). The ability to respond to sterol is conserved be-

tween mammalian and fungal SREBPs, however the fungal proteins are hypoxic transcription factors required for growth by regulating genes under low-oxygen conditions (33). The knocked-out *N. crassa* strain for this transcription factor showed impaired glycogen accumulation compared with the wild-type strain, which did not correlate with *gsn* gene expression. Considering that glycogen accumulates under anaerobic conditions, a potential involvement of this transcription factor in this metabolic process cannot be ruled out and deserves further investigation.

A very interesting transcription factor identified in our screen is the RCO-1, characterized in *N. crassa* as a regulatory protein that mediates mycelial repression of conidiation gene expression (21). It is a homologue of *S. cerevisiae* Tup1, a multidomain protein that mediates transcriptional repression of genes concerned with a variety of processes. In *S. cerevisiae*, Tup1 and Ssn6 proteins comprise a protein complex that is required for repression of several apparently unrelated genes, including glucose-repressible genes. They need to be physically associated in order to be recruited to promoters by *trans*-acting DNA-binding proteins (34). Our results indicate that this transcription factor could also control glycogen metabolism as a repressor of *gsn* gene expression in order to favor free glucose inside the cell. Recent results have shown that RCO-1 participates in photoadaptation in *N. crassa* by repressing gene transcription after a long exposure to light (46), showing that a mutation that affects the conidiation process also presents clock effects (47).

As previously mentioned, the *csp-1* gene product identified in our screen is also a light-inducible transcription factor (30), and a strain mutated in this gene developed superficially normal-looking conidia that failed to completely separate and remained tightly linked (29). The fact that both proteins (RCO-1 and CSP-1) play roles in conidiation and in circadian rhythms, and that the strains mutated in these proteins showed improper glycogen accumulation, led us to speculate on the existence of a connection between circadian clocks and glycogen metabolism, similar to what was described for trehalose in *N. crassa* (48). In the latter case, the gene encoding trehalose synthase is a clock-controlled gene (*ccg-9*), thus connecting the requirement for trehalose in clock regulation. In *Drosophila*, Zheng and Sehgal (49) demonstrated that the AKT and TOR-S6K pathways, which are the major regulators of nutrient metabolism, cell growth, and senescence, affect the brain circadian clock that drives behavioral rhythms. Another recent example of a link between metabolism and circadian rhythms was described by Doi *et al.* (50), providing direct evidence of the action of the circadian clock in the regulation of mammalian glycogen metabolism. The authors demonstrated that the CLOCK transcription factor regulates the circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of *Gys2* (glycogen synthase 2), which is the rate-limiting enzyme of glycogenesis in the liver.

The fact that deletion of some of the transcription factors affects cell cycle progression, as demonstrated by flow cytometry assay, is especially interesting. New cell cycle transcription factors have been discovered, which constitute an important tool for studies concerning the regulation of cell cycle transcription. Using a systematic screen to reveal new *S. cerevisiae* cell cycle transcription factors, White *et al.* (51) identified a series of transcription factors having functional roles in different biological processes, including glucose and lipid metabolism. Although the results obtained in our screen did not directly show a role for the transcription factors we identified, they constitute a valuable group of candidate proteins acting as regulators in glycogen metabolism control. Our results open new opportunities for investigating key issues concerning glycogen metabolism regulation, such as how glycogen metabolism could be connected to cell-cycle regulation, biological clock, and other aspects of cellular metabolism. A better understanding of such connections will bring insights into the importance of the energy balance in biological processes.

Acknowledgments—We thank Dr. Rui Curi from Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, Brazil, for the flow cytometry assays.

* This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) by grants to M. C. Bertolini and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). R. D. G. and F. B. C. are graduate fellows supported by CAPES and FAPESP, respectively, F. Z. F. is a post-doctoral fellow from FAPESP, and M. C. B. is a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) fellow.

¶ To whom correspondence should be addressed: Instituto de Química, UNESP, R. Professor Francisco Degni, s/n, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil. Tel.: 55-16-3301-9675; Fax: 55-16-3301-9692; E-mail: mcbertol@iq.unesp.br.

|| Both authors contributed equally to this work.

REFERENCES

- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Borkovich, K. A., Selker, E. U., Read, N. D., Jaffe, D., FitzHugh, W., Ma, L. J., Smirnov, S., Purcell, S., Rehman, B., Elkins, T., Engels, R., Wang, S., Nielsen, C. B., Butler, J., Endrizzi, M., Qui, D., Ianakiev, P., Bell-Pedersen, D., Nelson, M. A., Werner-Washburne, M., Selitrennikoff, C. P., Kinsey, J. A., Braun, E. L., Zelter, A., Schulte, U., Kothe, G. O., Jedd, G., Mewes, W., Staben, C., Marcotte, E., Greenberg, D., Roy, A., Foley, K., Naylor, J., Stange-Thomann, N., Barrett, R., Gnerre, S., Kamal, M., Kamvysselis, M., Mauceli, E., Bielke, C., Rudd, S., Frishman, D., Krystofova, S., Rasmussen, C., Metzenberg, R. L., Perkins, D. D., Kroken, S., Cogoni, C., Macino, G., Catcheside, D., Li, W., Pratt, R. J., Osmani, S. A., DeSouza, C. P., Glass, L., Orbach, M. J., Berglund, J. A., Voelker, R., Yarden, O., Plamann, M., Seiler, S., Dunlap, J., Radford, A., Aramayo, R., Natvig, D. O., Alex, L. A., Mannhaupt, G., Ebbole, D. J., Freitag, M., Paulsen, I., Sachs, M. S., Lander, E. S., Nusbaum, C., and Birren, B. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859–868.
- Borkovich, K. A., Alex, L. A., Yarden, O., Freitag, M., Turner, G. E., Read, N. D., Seiler, S., Bell-Pedersen, D., Palletta, J., Plesofsky, N., Plamann, M., Goodrich-Tanrikulu, M., Schulte, U., Mannhaupt, G., Nargang, F. E., Radford, A., Selitrennikoff, C., Galagan, J. E., Dunlap, J. C., Loros, J. J., Catcheside, D., Inoue, H., Aramayo, R., Polymenis, M., Selker, E. U., Sachs, M. S., Marzluf, G. A., Paulsen, I., Davis, R., Ebbole, D. J., Zelter, A., Kalkman, E. R., O'Rourke, R., Bowring, F., Yeaton, J., Ishii, C., Suzuki, K., Sakai, W., and Pratt, R. (2004) Lessons from the genome

- sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 1–108
3. Hardy, T. A., Huang, D., and Roach, P. J. (1994) Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 27907–27913
4. Freitas, F. Z., de Paula, R. M., Barbosa, L. C. B., Terenzi, H. F., and Bertolini, M. C. (2010) cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 43–52
5. de Paula, R., de Pinho, C. A., Terenzi, H. F., and Bertolini, M. C. (2002) Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 241–253
6. Noventa-Jordão, M. A., de Lourdes, M., Polizeli, T. M., Bonini, B. M., Jorge, J. A., and Terenzi, H. F. (1996) Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. *FEBS Lett.* **378**, 32–36
7. Parrou, J. L., Teste, M. A., and François, J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* **143**, 1891–1900
8. Freitas, F. Z., and Bertolini, M. C. (2004) Genomic organization of the *Neurospora crassa* *gsn* gene. Possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of gene transcription during heat shock. *Mol. Genet. Genomics* **272**, 550–561
9. Martinez-Pastor, M., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H., and Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**, 2227–2235
10. Freitas, F. Z., Chapeaurouge, A., Perales, J., and Bertolini, M. C. (2008) A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. *Proteomics* **8**, 2052–2061
11. McCluskey, K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**, 245–262
12. Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A., and Dunlap, J. C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10352–10357
13. Vogel, H. J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* **13**, 42–43
14. Hardy, T. A., and Roach, P. J. (1993) Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **268**, 23799–23805
15. Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422–427
16. Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., and Russo, V. E. A. (1995) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newslett.* **37**, 41–43
17. Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
18. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685
19. Lange, A., Mills, R. E., Lange, C. J., Stewart, M., Devine, S. E., and Corbett, A. H. (2007) Classical nuclear localization signals: definition, function, and interaction with importin alpha. *J. Biol. Chem.* **282**, 5101–5105
20. Feng, B., and Marzluf, G. A. (1998) Interaction between major nitrogen regulatory protein NIT2 and pathway-specific regulatory factor NIT4 is required for their synergistic activation of gene expression in *Neurospora crassa*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3983–3990
21. Yamashiro, C. T., Ebbola, D. J., Lee, B. U., Brown, R. E., Bourland, C., Madi, L., and Yanofsky, C. (1996) Characterization of *rco-1* of *Neurospora crassa*, a pleiotropic gene affecting growth and development that encodes a homolog of Tup1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6218–6228
22. Peñalva, M. A., and Arst, H. N., Jr. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 426–446, Table of Contents
23. Li, D., and Kolattukudy, P. E. (1997) Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys₆Zn₂ binuclear cluster DNA-binding motif. *J. Biol. Chem.* **272**, 12462–12467
24. Li, D., Sirakova, T., Rogers, L., Ettinger, W. F., and Kolattukudy, P. E. (2002) Regulation of constitutively expressed and induced cutinase genes by different zinc finger transcription factors in *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*). *J. Biol. Chem.* **277**, 7905–7912
25. Rocha, A. L., Di Pietro, A., Ruiz-Roldán, C., and Roncero, M. I. (2008) Ctf1, a transcriptional activator of cutinase and lipase genes in *Fusarium oxysporum* is dispensable for virulence. *Mol. Plant Pathol.* **9**, 293–304
26. Coppin, E. (2002) The *fle1* gene encoding a C₂H₂ zinc finger protein co-ordinates male and female sexual differentiation in *Podospora anserina*. *Mol. Microbiol.* **43**, 1255–1268
27. Adams, T. H., Wieser, J. K., and Yu, J. H. (1998) *Asexual sporulation in Aspergillus nidulans*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 35–54
28. van Peij, N. N., Gielkens, M. M., de Vries, R. P., Visser, J., and de Graaff, L. H. (1998) The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3615–3619
29. Selitrennikoff, C. P., Nelson, R. E., and Siegel, R. W. (1974) Phase-specific genes for macroconidiation in *Neurospora crassa*. *Genetics* **78**, 679–690
30. Lambregts, R., Shi, M., Belden, W. J., Decaprio, D., Park, D., Henn, M. R., Galagan, J. E., Bastürkmen, M., Birren, B. W., Sachs, M. S., Dunlap, J. C., and Loros, J. J. (2009) A high-density single nucleotide polymorphism map for *Neurospora crassa*. *Genetics* **181**, 767–781
31. Yang, X., Talibi, D., Weber, S., Poisson, G., and Raymond, M. (2001) Functional isolation of the *Candida albicans* FCR3 gene encoding a bZip transcription factor homologous to *Saccharomyces cerevisiae* Yap3p. *Yeast* **18**, 1217–1225
32. Wang, M., Wang, Q., Zhao, H., Zhang, X., and Pan, Y. (2009) Evolutionary selection pressure of forkhead domain and functional divergence. *Gene* **432**, 19–25
33. Bien, C. M., and Espenshade, P. J. (2010) Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. *Eukaryot. Cell* **9**, 352–359
34. Smith, R. L., and Johnson, A. D. (2000) Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 325–330
35. Wilson, W. A., Wang, Z., and Roach, P. J. (2002) Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 232–242
36. Dunlap, J. C., Borkovich, K. A., Henn, M. R., Turner, G. E., Sachs, M. S., Glass, N. L., McCluskey, K., Plamann, M., Galagan, J. E., Birren, B. W., Weiss, R. L., Townsend, J. P., Loros, J. J., Nelson, M. A., Lambregts, R., Colot, H. V., Park, G., Collopy, P., Ringelberg, C., Crew, C., Litvinkova, L., DeCaprio, D., Hood, H. M., Curilla, S., Shi, M., Crawford, M., Koerhsen, M., Montgomery, P., Larson, L., Pearson, M., Kasuga, T., Tian, C., Bastürkmen, M., Altamirano, L., and Xu, J. (2007) Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. *Adv. Genet.* **57**, 49–96
37. Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D. A., Espeso, E. A., Orejas, M., Mungroo, J., Peñalva, M. A., and Arst, H. N., Jr. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779–790
38. Tamayo, E. N., Villanueva, A., Hasper, A. A., de Graaff, L. H., Ramón, D., and Orejas, M. (2008) CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 984–993
39. Fu, Y. H., and Marzluf, G. A. (1990) *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol. Cell Biol.* **10**, 1056–1065
40. Lockington, R. A., Rodbourn, L., Barnett, S., Carter, C. J., and Kelly, J. M. (2002) Regulation by carbon and nitrogen sources of a family of cellulases in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **37**, 190–196
41. Párraga, A., Bellolell, L., Ferré-D'Amaré, A. R., and Burley, S. K. (1998) Co-crystal structure of sterol regulatory element binding protein 1a at 2.3 Å resolution. *Structure* **15**, 661–672
42. Hughes, A. L., Todd, B. L., and Espenshade, P. J. (2005) SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. *Cell* **120**, 831–842
43. Lane, S., Zhou, S., Pan, T., Dai, Q., and Liu, H. (2001) The basic helix-loop-

- helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 6418–6428
44. Willger, S. D., Puttikamonkul, S., Kim, K. H., Burritt, J. B., Grahl, N., Metzler, L. J., Barbuch, R., Bard, M., Lawrence, C. B., and Cramer, R. A., Jr. (2008) A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* **4**, e1000200
 45. Bien, C. M., Chang, Y. C., Nes, W. D., Kwon-Chung, K. J., and Espenshade, P. J. (2009) *Cryptococcus neoformans* Site-2 protease is required for virulence and survival in the presence of azole drugs. *Mol. Microbiol.* **74**, 672–690
 46. Olmedo, M., Navarro-Sampedro, L., Ruger-Herreros, C., Kim, S. R., Jeong, B. K., Lee, B. U., and Corrochano, L. M. (2010) A role in the regulation of transcription by light for RCO-1 and RCM-1, the *Neurospora* homologs of the yeast Tup1-Ssn6 repressor. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 939–952
 47. Brody, S., Oelhafen, K., Schneider, K., Perrino, S., Goetz, A., Wang, C., and English, C. (2010) Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: Downstream effectors. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 159–168
 48. Shinohara, M. L., Correa, A., Bell-Pedersen, D., Dunlap, J. C., and Loros, J. J. (2002) *Neurospora* clock-controlled gene (*ccg-9*) encodes trehalose synthase: circadian regulation of stress responses and development. *Eukaryot. Cell* **1**, 33–43
 49. Zheng, X., and Sehgal, A. (2010) AKT and TOR signaling set the pace of the circadian pacemaker. *Curr. Biol.* **20**, 1203–1208
 50. Doi, R., Oishi, K., and Ishida, N. (2010) CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of Gys2. *J. Biol. Chem.* **285**, 22114–22121
 51. White, M. A., Riles, L., and Cohen, B. A. (2009) A systematic screen for transcriptional regulators of the yeast cell cycle. *Genetics* **181**, 435–446
 52. Lundin, M., Nehlin, J. O., and Ronne, H. (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the CG box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1979–1985
 53. Arst, H. N., and Peñalva, M. A. (2003) pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet.* **19**, 224–231

Ambient pH controls glycogen levels by regulating glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway

Authors' names: Fernanda Barbosa Cupertino¹, Fernanda Zanolli Freitas¹, Renato Magalhães de Paula² and Maria Célia Bertolini¹

Address: ¹Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 14800-900, Araraquara, SP, Brazil; ²Nalco Company, 7705 Hwy 90A, Sugar Land, TX, 77478, USA.

Running title: Extracellular pH and *gsn* gene expression control

Keywords: Transcription factors, PACC, ChIP, gene expression, glycogen, *Neurospora crassa*

Corresponding author: Maria Célia Bertolini
Instituto de Química, UNESP
R. Professor Francisco Degni, 55
14800-900, Araraquara, SP, Brazil
Phone: +55-16-3301-9675
Fax: +55-16-3301-9692
e-mail: mcbertol@iq.unesp.br

Summary

The existence of a DNA motif for the *Aspergillus nidulans* pH responsive transcription factor PacC in the promoter of the gene encoding glycogen synthase (*gsn*) in *Neurospora crassa* prompted us to investigate whether this protein regulates glycogen accumulation. PacC in *A. nidulans* plays a role in the pH signaling pathway by inducing the expression of alkaline genes and repressing acidic genes. We show that *pacC* is over-expressed and *gsn* is down-regulated in wild-type *N. crassa* at pH 7.8 coincident with low glycogen accumulation. In the *N. crassa pacC^{KO}* strain the glycogen levels and *gsn* expression at alkaline pH were, respectively, similar to and higher than the wild-type strain at normal pH (5.8). The recombinant protein, containing the DNA-binding domain specifically bound to the PacC motif of the *gsn* promoter. In addition, DNA-protein complexes were observed with extracts from cells grown at normal and alkaline pH and confirmed by ChIP analysis. The PACC present in these extracts showed equal molecular mass, indicating that the protein is already processed at normal pH. The results show that the pH signaling pathway controls glycogen accumulation by regulating *gsn* expression and suggest the existence of a different mechanism for PACC activation in *N. crassa*.

Introduction

Neurospora crassa is a filamentous fungus that has been widely used as a model organism for studies on fundamental aspects of eukaryotic biology. The completion of its genome sequence (Galagan *et al.*, 2003) and, more recently, the availability of a set of mutant strains individually knocked-out in specific genes have enormously accelerated the investigation of many aspects of the biology of this organism. We have been using *N. crassa* to study how the metabolism of glycogen, a storage carbohydrate that functions as carbon and energy reserve, is regulated. Glycogen biosynthesis starts with the self-glucosylating initiator enzyme glycogenin (EC 2.4.1.186), termed GNN in *N. crassa* (de Paula *et al.*, 2005). After an oligosaccharide is synthesized, the elongation step is catalyzed by glycogen synthase (EC 2.4.1.11) and a branching enzyme (EC 2.4.1.18) that mediate the formation of α -1,4- and α -1,6-glycosidic bonds, respectively, characteristic of the glycogen molecule. Glycogen synthase is the rate-limiting enzyme in this process and is down-regulated by phosphorylation; however, the phosphorylated form can be activated by the allosteric effector glucose-6-phosphate (Rothman-Denes and Cabib, 1971).

In *N. crassa*, glycogen synthase (GSN) has been characterized at gene and protein levels. Under normal growth conditions, *gsn* expression is maximal at the end of the exponential growth phase, which coincides with the highest glycogen content. However, under stress conditions, such as heat shock, *gsn* expression is down-regulated and the enzyme is less active. This may explain the decrease in glycogen levels observed in cells exposed to heat shock (Noventa-Jordão *et al.*, 1996; de Paula *et al.*, 2002; Freitas and Bertolini, 2004). *gsn* expression and GSN phosphorylation are also regulated by the cAMP-protein kinase A (PKA) signaling pathway (Freitas *et al.*, 2010). Thus, the regulation of glycogen metabolism in *N. crassa* involves different proteins whose activation may be influenced by different signaling pathways. Analysis *in silico* of the *gsn* 5'-flanking region led to the identification of *cis* DNA-binding motifs specific for transcription factors acting via different signaling pathways. These motifs include a recognition site for the *A. nidulans* zinc-

finger transcription factor PacC (Gonçalves *et al.*, 2011), suggesting a possible role for pH in regulating glycogen synthesis.

PacC has been extensively studied in *A. nidulans* and plays an important role in the pH signaling pathway. This transcription factor mediates the cell adaptation to neutral-alkaline pH by activating genes that are preferentially expressed at alkaline pH and repressing those preferentially expressed at acidic pH (Tilburn *et al.*, 1995). In *A. nidulans*, PacC is activated by two successive proteolytic cleavage steps at the C-terminus, the first being pH-dependent and activated by the products of six *pal* genes while the second is proteasome-mediated and pH-independent (Diez *et al.*, 2002; Peñas *et al.*, 2007). The proteolysis lead to the active protein PacC²⁷ that contains a DNA-binding domain formed by three C₂H₂ zinc fingers capable of binding to the core consensus sequence 5'-GCCARG-3' present in the promoters of pH-regulated genes (reviewed in Arst and Peñalva, 2003a; Peñalva *et al.*, 2008).

The Rim101p, a PacC orthologue in *S. cerevisiae*, was initially identified as a positive regulator of meiosis and *rim101* mutants are sensitive to Na⁺ or Li⁺ ions and grow poorly at low temperatures (Su and Mitchell, 1993). The yeast protein therefore appears to have a broader role than simply that of promoting alkaline pH-inducible responses (Lamb and Mitchell, 2003). While Rim101p is associated with the pH response, there are important differences between PacC and Rim101p. For example, the yeast protein requires only a single cleavage step to be activated (Li and Mitchell, 1997) and, whereas PacC acts as a transcriptional activator under alkaline pH, Rim101p exerts its role as a repressor (Lamb and Mitchell, 2003). In addition, at least three pathways participate in the response to high pH stress in *S. cerevisiae* (reviewed in Ariño, 2010). Thus, the molecular mechanisms involved in the pH response differ among organisms.

PacC orthologues have been identified in numerous filamentous fungi and the role of PacC as a mediator of pH regulation in fungal pathogenicity was first described in *Candida albicans*, in which Rim101p governs pH responses, dimorphism, and pathogenesis (Davis, 2003). In *N. crassa*, the PACC pathway is involved in the glycosylation of Pi-repressible acid phosphatase (Nozawa *et al.*, 2003) and in the transcription of the *hsp70* gene (Squina *et al.*, 2010).

In this report, we demonstrated that the pH signaling pathway regulates glycogen metabolism in *N. crassa* by a process in which PACC may play a central role. As a PacC motif was identified in the *gsn* promoter, and since *N. crassa* has the six *A. nidulans pal* gene orthologues, we investigated the influence of pH on glycogen accumulation and the regulation of *gsn* expression. Gel mobility assays showed that recombinant PACC recognized and bound specifically to the *gsn* promoter; this binding was confirmed *in vivo* by ChIP analysis. We also found that PACC proteolysis may involve a different way from that described for the *A. nidulans* protein.

Results

Knockout of the N. crassa pacC gene and growth phenotype analysis

To investigate the role of PACC in the regulation of glycogen metabolism we generated a null deleted strain by replacing the entire *pacC* ORF (NCU00090, 1,866 bp) with the *bar* gene in a *mus-52*^{KO} background strain (Figure 1A). The gene replacement and correct integration were confirmed by PCR analysis of the transformants (Figure 1B). However, we were unable

to eliminate the *mus-52* mutation after crossing the transformants with a wild-type strain due to the close linkage between the *mus-52* and *pacC* genes. The morphological characteristics of the *pacC*^{KO} strain were analyzed by growth on VM agar plates and in race tubes. Since there were no apparent differences in the phenotypes of the *mus-51*^{KO} (used as the wild type in this work) and *mus-52*^{KO} strains (Ninomiya *et al.*, 2004) we concluded that the growth defects observed in the *pacC*^{KO} strain were caused specifically by the absence of the transcription factor. Linear growth analysis in race tubes showed that both strains grew better at acid (4.2) and normal (5.8) pH than at alkaline pH and that the *pacC*^{KO} strain was unable to grow at alkaline pH (7.8) (Figure 1C). We have also observed an accumulation of brown pigments after five days under normal growth conditions in flask (Figure 1D), characterized as melanin and described in other transcription factor mutant strains (Colot *et al.*, 2006).

Radial growth was analyzed in plates after 24 h of growth in VM medium and VM medium supplemented with yeast extract (Figures 1E and 2). The knockout strain displayed similar growth to the wild-type strain in both media at acid pH and slightly reduced growth at normal pH; the mutant strain did not grow at alkaline pH. The wild type and knockout strains showed enhanced hyphal branching and shorter aerial hyphae in both media at alkaline pH (Figure 2). However, the knockout strain displayed severe growth defects at alkaline pH, including a reduction in the extent and production of aerial hyphae. Together, these results show that PACC is required for growth under alkaline conditions.

Glycogen levels and gene expression under pH stress

The *gsn* gene is regulated at transcriptional and post-translational levels. We have previously reported that gene expression and glycogen levels were altered under stress conditions such as heat shock and carbon starvation (de Paula *et al.*, 2002; Freitas and Bertolini, 2004), both of which affect glycogen metabolism in *N. crassa*. The identification of a DNA motif for the pH signaling regulator PacC in the *gsn* promoter (Gonçalves *et al.*, 2011) prompted us to investigate whether this gene could be regulated by pH stress. Cells from both strains were germinated at pH 5.8 and then subjected to acid and alkaline pH stress after which samples were collected for glycogen quantification and RNA extraction. The glycogen levels in the *pacC*^{KO} strain were higher than in the wild-type strain at normal growth pH (pH 5.8) (Figure 3B), indicating that PACC is important for maintaining normal glycogen levels during vegetative growth. However, under acid stress (pH 4.2), both strains accumulated similar amounts of glycogen (Figure 3A and 3B), suggesting that PACC does not affect glycogen accumulation under this condition in agreement with the growth results shown in Figure 1C. At alkaline pH, there was a decrease in the glycogen levels of both strains compared to the levels at pH 5.8. The fact that the glycogen level in the *pacC*^{KO} strain after 30 min of alkaline stress was similar to that of the non-stressed wild-type strain (Figure 3B, time 0) emphasizes the role of PACC as a major regulator of glycogen accumulation under alkaline pH stress.

The glycogen levels were also quantified in wild-type cells that were returned to normal pH after being subjected to acid and alkaline pH stress (RE, recuperation). In both conditions, the cells were able to adapt to the normal pH although they did not regain the glycogen levels seen before stress (Figure 3A).

To investigate whether the effect of extracellular pH on glycogen accumulation resulted from changes in *gsn* expression we analyzed the levels of *gsn* mRNA during pH stress and recuperation at pH 5.8. During acidic stress, the wild-type *gsn* transcript levels decreased approximately two-fold after 60 min of incubation (Figure 4A) and did not recover after returning the cells to normal growth pH (Figure 4A, RE). When cells were transferred to

alkaline medium, *gsn* levels decreased markedly during 60 min of stress and recovered to normal levels after a 60 min incubation at pH 5.8 (Figure 4A). These results indicate that changes in extracellular pH control *gsn* expression. We also analyzed the *pacC* mRNA levels under pH stress and recuperation at pH 5.8 in the wild-type strain (Figure 4A). The *pacC* transcript size was ~3 kb. Whereas *pacC* expression was low at acid pH, at alkaline pH there was a marked increase in expression compared to that at physiological pH (5.8), mainly during the first 15 min of stress. Basal expression was achieved when the mycelia were transferred back to pH 5.8. The *gsn* mRNA levels were higher in the *pacC*^{KO} strain than in the wild type strain at all pH values (Figure 4B), suggesting a repressive role for PACC in *gsn* expression. This result explains, at least partially, the glycogen levels shown in Figure 3B.

Expression of the gene encoding glycogen phosphorylase (named here as *gpn*) was also analyzed in both strains under acid and alkaline pH stress. There were no differences in *gpn* expression between wild type and mutant strains (results not shown) indicating that only *gsn* expression is influenced by pH. Together, the results in Figures 3B and 4 suggest that alkaline pH induces *pacC* expression and a concomitant decrease in glycogen levels by down-regulating the *gsn* gene. These findings characterize *gsn* as an acid-specific gene.

Glycogen levels and gene expression under combined pH and heat stress

As previously described, heat shock (45 °C) down-regulates *gsn* expression, resulting in decreased glycogen accumulation compared to that observed at 30 °C (the normal temperature of growth) (de Paula *et al.*, 2002; Freitas and Bertolini, 2004). We therefore examined the effect of a combination of heat and pH stress on glycogen accumulation and the expression of *gsn* and *pacC* in the wild-type strain. For this, cells were germinated at pH 5.8 and transferred to media of different pH preheated to 45 °C. Glycogen levels were strongly reduced during heat shock, regardless of the pH (Figure 5A, black bars, HS). When heat stress was removed while maintaining the pH stress, normal glycogen levels were regained only in media with normal and acid pH (Figure 5A, compare with the results shown in Figure 3A for pH 4.2). The cells were unable to recover normal glycogen levels at alkaline pH (Figure 5A, pH 7.8) and they were the same as under heat stress.

The influence of pH and temperature stress on *gsn* expression was also analyzed, as an attempt to correlate with glycogen accumulation. The *gsn* transcript levels were reduced in cells subjected to heat shock, regardless the media pH (Figure 5B). However, when cells were transferred back to normal temperature (30 °C) and pH stress was maintained the *gsn* expression levels were recovered only at pH 4.2 and 5.8, but not at pH 7.8, in agreement with the results shown in Figure 5A. As with *gsn*, *pacC* expression was strongly repressed by heat stress at both pH values. In addition, gene expression was recovered after returning the cells to normal temperature (30 °C) at all pH values (Figure 5B). This interesting result suggests that the heat signaling pathway apparently elicits stronger cellular responses than the pH signaling pathway, at least for *pacC* expression. It is noteworthy the existence of six STRE (STress Response Elements) and four HSE (Heat Shock Elements) motifs in the *pacC* promoter, all of which are DNA elements known to be responsive to heat stress.

*Recombinant PACC binds to the *gsn* promoter*

To investigate whether the PacC DNA motif identified in the *gsn* promoter was, indeed, recognized by PACC, a gel mobility shift assay was performed using a truncated

recombinant PACC and a 146 bp DNA fragment containing the PacC core sequence (5'-CTTGGC-3') as probe. Recombinant PACC bound efficiently to the fragment corresponding to the PacC recognition motif in the *gsn* promoter (Figure 6A, lanes 2 and 6, respectively). DNA-protein binding was reduced in the presence of unlabelled specific competitor (Figure 6A, lanes 3 and 7). The specificity of the DNA-protein complexes was further confirmed by adding a 27 bp DNA oligonucleotide (oligo *pacC*) as a specific competitor (Figure 6A, lanes 4 and 8) and by supershift experiments. The addition of anti-PACC antibody to the reaction increased the molecular mass of the DNA-protein complex, which shifted close to the gel origin (Figure 6A, lanes 12 and 13).

The specificity of the DNA-protein complex was also confirmed by using a mutated *pacC* probe (*mpacC*) in which the 5'-CTTGGC-3' core sequence was changed to 5'-AAATTA-3' (Figure 6B). There was a marked reduction in the formation of DNA-protein complex and a weak complex was only visible after adding 2.0 µg of protein (Figure 6B, lanes 4 and 5), i.e., an amount of protein sufficient to produce a strong complex (compare Figure 6A, lane 6 with 6B, lane 4).

Binding of proteins from crude cellular extract to the PacC binding site of the gsn promoter

To investigate whether PACC binding to the *gsn* promoter was pH-dependent, gel shift assays were performed with crude cellular extracts from wild-type cells grown under normal (5.8) and alkaline (7.8) pH. The cellular extracts were fractionated by affinity chromatography, bound proteins were eluted with a KCl gradient and the fractions were analyzed for their ability to bind to the *pacC* probe previously used. Fractions with DNA-binding activities were identified in extracts from cells grown at both pH conditions (results not shown). One active chromatographic fraction from each pH was assayed for its binding to the PacC consensus site of the *gsn* promoter. DNA-protein complexes were observed when proteins were incubated with the DNA fragment (Figure 7A, lanes 2 and 7). When the same fragment was used as a specific competitor in 10-fold molar excess the complexes were shifted only when crude cellular extract prepared from mycelia grown at pH 5.8 was used as the protein source (Figure 7A, lane 3). However, the specific competitor oligo *pacC* was able to shift the DNA-protein complexes when proteins from both extracts were analyzed (Figure 7A, lanes 4-6, 10 and 11). The binding reaction was apparently stronger when cellular extract prepared from cells grown at alkaline pH was used as a protein source since the DNA-protein complex was shifted only at higher oligo *pacC* concentrations (20- and 30-fold molar excess). This result indicated the existence of an active PACC protein that specifically bound to the PacC motif even under normal growth pH (5.8). It is also interesting since low levels of *pacC* transcript could be detected in the wild-type cells grown at pH 5.8 (Figure 4A).

We also investigated whether the PACC present in the two cellular extracts had equal molecular mass since the same protein from *A. nidulans* grown at alkaline pH has a lower molecular mass than that observed at normal growth pH (Diez *et al.*, 2002). The presence of PACC in the cellular extracts was analyzed using polyclonal anti-PACC antibody. The protein was detected in both cellular extracts and, surprisingly, had the same molecular mass (< 60 kD), which was similar to that of the intermediate PacC form from *A. nidulans* grown at alkaline pH (53 kD) (Figure 7B). A single PACC form was identified in the cellular extract prepared up to 4 h after the cells were shifted to alkaline pH. There was little protein induction in extracts from 1 h after shifting. The processed PacC²⁷ protein described in *A. nidulans* grown at alkaline pH was not detected in *N. crassa*.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in the wild type strain were used to show that *N. crassa* PACC binds to the *gsn* promoter *in vivo* and to assess whether protein binding was pH-dependent. Figure 7C shows that endogenous PACC associated with the *gsn* promoter region containing the PacC motif. In addition, protein association was observed with genomic DNA extracted from cells grown at normal pH (5.8) and from cells 2 h after shifting to alkaline pH. Together, these results indicate that *N. crassa* PACC specifically associates with the *gsn* promoter even at pH 5.8, the pH for normal growth, thus confirming that the protein is active at this pH.

Discussion

Extracellular pH has an important role in cell biology as it regulates gene expression and consequently influences a variety of cellular processes, such as growth, differentiation and development. The regulation of gene expression by pH has been widely investigated in microorganisms because of the great variations in ambient pH that they face in their natural environments. The ambient pH signaling pathway has been exhaustively studied in the filamentous fungus *A. nidulans* and in several yeasts, including *S. cerevisiae*. In *A. nidulans*, pH regulation is mediated by the action of a cascade of proteins (*pal* gene products) that leads to activation of the transcription factor PacC. This protein, which has a central role in the pH signaling pathway, is activated at alkaline pH after two proteolytic cleavage steps and acts as a transcriptional activator of alkaline-expressed genes (reviewed in Peñalva and Arst, 2004).

In *S. cerevisiae*, the pathway leading to activation of the Rim101p orthologue shares similarities with that of PacC. However the mechanism of alkaline pH adaptation is not exactly the same since Rim101p requires only a single cleavage step to be activated and, whereas PacC acts either as an activator or repressor, Rim101p is a repressor of the genes encoding the transcriptional repressors Nrg1p and Smp1p at alkaline pH. Nrg1p is required for the repression of alkaline pH-inducible genes, including the gene encoding Ena1 Na⁺-ATPase, a protein essential for growth at alkaline pH (Lamb and Mitchell, 2003). Thus, Rim101p is indirectly required for *S. cerevisiae* adaptation to alkaline stress. In addition to Rim101p-mediated alkaline pH regulation, there are also Rim101p-independent mechanisms involved in pH regulation in *S. cerevisiae*. One is the calcineurin pathway, the activation of which affects the expression of a number of genes through dephosphorylation of the transcription factor Crz1 (Serrano *et al.*, 2002). High pH stress triggers a transient rise in cytoplasmic calcium resulting in calcineurin activation and *ENA1* induction through Crz1 (Viladevall *et al.*, 2004). More recently, Platara *et al.* (2006) described another signaling pathway involving the protein kinase Snf1p that acts through the Mig2p repressor, i.e., a third regulatory pathway involved in the response to high pH stress.

The results described here indicate a role for *N. crassa* PACC as a regulator of glycogen metabolism through its ability to target GSN via a PacC binding site in the *gsn* promoter. The *pacC*^{KO} strain showed impaired growth at alkaline pH, in agreement with the better growth of *N. crassa* at acidic (5.8) compared to alkaline (7.8) pH. Our findings suggest the existence of a different mechanism of PACC activation under alkaline pH stress when compared to *A. nidulans* and *S. cerevisiae*.

PACC regulates glycogen levels under pH alkaline stress through regulation of gsn expression

We investigated the glycogen levels and *gsn* expression in response to extracellular pH changes. Our results provide evidence that both processes are under pH control in *N. crassa*. Cells of the wild-type strain grown at alkaline pH showed low intracellular glycogen accumulation and a reduction in *gsn* transcript levels. In contrast, the *pacC*^{KO} strain accumulated similar amounts of glycogen when compared to the non-stressed wild-type strain and showed high *gsn* transcript levels at alkaline pH. These results are sufficient to characterize *gsn* as a pH-regulated gene, and that it is an acid-specific gene. Many genes have been reported to be regulated by ambient pH (Espeso and Arst, 2000). In the case of *gsn*, the finding that wild type and mutant strains had similar amounts of glycogen at normal and alkaline pH, respectively, reinforced the criteria for a gene to be regulated by ambient pH (Arst and Peñalva, 2003b). The analysis of *pacC* gene expression in *N. crassa* showed that it was under pH control, as also described for *A. nidulans* (Tilburn *et al.*, 1995) and other filamentous fungi (Flaherty *et al.*, 2003; Meyer *et al.*, 2005; Merhej *et al.*, 2011). This observation supports the fact that, at alkaline pH, the over-expression of *pacC* controls glycogen levels by regulating *gsn*, but not *gpn*, expression.

The patterns of glycogen accumulation and gene expression under combined pH and heat stress were very interesting. Whereas glycogen and *gsn* transcript levels returned to normal in the wild type strain, this strain was unable to recover normal levels when exposed concomitantly to heat and alkaline stress. In addition, *pacC* was not induced under these conditions. The presence of STRE and HSE motifs in the *pacC* promoter suggests that this gene is regulated by heat shock. As with *gsn* down-regulation under heat stress (de Paula *et al.*, 2002; Freitas and Bertolini, 2004), *pacC* is another example of a gene in *N. crassa* having STRE and HSE binding sites in its 5'-flanking region being down-regulated at the transcriptional level by heat stress. The *gsn* promoter has one STRE motif, which was demonstrated to be involved in the gene transcription modulation when cells were exposed to heat shock (transferred from 30 °C to 45 °C) (Freitas and Bertolini, 2004).

In *S. cerevisiae* the STREs are described as *cis* regulatory motif that mediates the transcriptional activation of genes through the action of the stress response regulator proteins Msn2p/4p (Martinez-Pastor *et al.*, 1996). Orthologous proteins have not been identified in the *N. crassa* genome database, suggesting that in this organism STRE may modulate gene expression by an alternative mechanism (Freitas *et al.*, 2008). The activation of protein kinase A (PKA) leads to Msn2/4p phosphorylation and its cytoplasmic accumulation, thereby preventing the transcription of STRE-regulated genes (Gorner *et al.*, 1998). Recently, Casado *et al.* (2011) demonstrated that the exposure of *S. cerevisiae* to alkaline medium resulted in a decrease in cAMP that led to inhibition of the PKA pathway and the accumulation of Msn2/4p in the nucleus. These data indicate that the adaptative response to alkaline pH involves PKA-regulated Msn2/4p-mediated gene remodeling. Since *N. crassa* lacks Msn2/4p orthologues we hypothesize that the down-regulation of *pacC* under heat shock and alkaline pH results from the activation of proteins that mediate gene transcription regulation under heat stress through STRE. Whether the PKA signaling pathway is involved in this process remains to be demonstrated. We have previously reported that a *N. crassa* mutant strain with an inactive PKA pathway showed hyper-accumulation of glycogen during growth when compared to the wild-type strain (Freitas *et al.*, 2010). However, the *gsn* transcript level was not increased in this strain; rather, GSN was less phosphorylated *in vitro* and therefore more active, suggesting that GSN post-

translational modification is likely to be the main mechanism controlling glycogen accumulation during vegetative growth when the PKA pathway is inactive.

PACC binds to the gsn promoter in vitro and in vivo and is active at normal and alkaline pH

DNA shift experiments showed that truncated PACC having the DNA-binding domain was able to bind to a DNA fragment from the *gsn* promoter containing the PacC binding site. The DNA-binding reaction was specific, based on three criteria: (1) binding was strongly reduced when a DNA fragment mutated in the PacC core sequence was used, (2) a DNA oligonucleotide containing the PacC binding site competed in the binding reactions by reducing the DNA-protein complexes, and (3) anti-PACC antibody led to a DNA-protein supershift. Together, these findings revealed that the PacC binding site in the *gsn* promoter was the target for the binding of recombinant PACC. DNA-protein complexes were also observed when crude cellular extracts were used as protein sources. Interestingly, proteins from extracts prepared from cells grown at normal and alkaline pH were able to bind to the DNA fragment *in vitro* and *in vivo*, and the PACC present in these extracts had the same molecular mass (< 60 kD).

According to the model for pH-mediated regulation of gene expression in *A. nidulans* (Peñalva and Arst, 2004) full-length PacC (PacC⁷²) is synthesized as an inactive form and an alkaline signal is transduced by the *pal* signaling pathway, thereby activating PacC⁷² to PacC⁵³ and PacC²⁷ by two successive proteolytic steps. The *S. cerevisiae* Rim101p is similar in size to the *A. nidulans* protein but they differ in that the yeast protein is proteolytically processed at the C-terminus by a single cleavage step and the smaller size form (similar to PacC²⁷) has not been detected (Li and Mitchell, 1997). The results described here suggest that PACC is subject to only one proteolytic processing step since the molecular mass of the protein present in cells grown at alkaline pH was lower than the theoretical value of 67 kD. According to Peñas *et al.* (2007), *N. crassa* PACC has a conserved protease box that may lead to a processed form of PACC with a molecular mass of ~55 kD, the size found in our experiments. The most intriguing result concerning PACC was that the forms detected before and after pH stress had the same molecular mass, which indicates that alkaline pH is not the signal for proteolytic processing. Rather, the protein is already processed during growth at pH 5.8.

The finding that *N. crassa* has orthologues to all six Pal proteins, including PalH which, together with PalI, function as membrane pH sensors in *A. nidulans* (Peñalva and Arst, 2004), is particularly interesting. According to the model proposed for *A. nidulans*, the pH signal is transduced to downstream components by PalF phosphorylation and ubiquitination, leading to endocytosis of the PalF/PalH complex (Herranz *et al.*, 2005). By overexpressing PalF covalently attached to ubiquitin in a null *palH* background Hervás-Aguilar *et al.* (2010) have shown that PalF ubiquitination activates the signaling pathway under acidic conditions. The authors concluded that ubiquitination of PalF commands the cascade of intracellular events that mediate fungal adaptation to environmental pH.

Our results clearly demonstrated that in *N. crassa* ambient pH controls glycogen accumulation by regulating *gsn* expression, i.e., by regulating glycogen synthesis and not degradation. Although the data point to a central role for PACC many questions remain unanswered. One major concern is the fact that PACC shows the same molecular mass before and after alkaline pH stress, indicating that if there is any processing it must occur independently of ambient pH. Another question relates to the *in vivo* results showing that endogenous PACC binds to the *gsn* promoter even at pH 5.8. If there is protein association

at both pH values, how are the differences in *gsn* expression and glycogen content to be explained? Since *N. crassa* has all six Pal protein orthologues we might speculate that PalH may function as a pH sensor, as in *A. nidulans*, and that all six Pal homologues are active components of the pH signaling pathway. Finally, is PACC the only regulator of glycogen accumulation and *gsn* expression at alkaline pH? Other molecular mechanisms are known to be involved in adaptation to environmental pH in *S. cerevisiae* and *C. albicans* (Kullas *et al.*, 2007). The results described here reveal interesting differences between *N. crassa* and *A. nidulans* with regard to the pH signaling pathway that deserve to be investigated.

Experimental Procedures

Neurospora crassa strains and growth conditions

Neurospora crassa FGSC#9718 (*mat a*, *mus-51::bar*), the wild-type background strain used in these experiments, was purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC, University of Missouri, Kansas City, MO, USA, <http://www.fgsc.net>) (McCluskey, 2003). A *pacC* knockout mutant strain (*pacC*^{KO}) was generated following the knockout procedures described elsewhere (Ninomiya *et al.*, 2004) based on the strains FGSC#9568 (*mat a*, *mus-52::hyg*) and FGSC#2490 (*mat A*). All strains were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium, pH 5.8 (Vogel, 1995) containing 2% sucrose at 30 °C.

Conidia from 10 day cultures of wild-type and *pacC*^{KO} strains were suspended in sterile water and counted. For radial growth analysis, 10⁷ conidia ml⁻¹ were inoculated onto plates containing solid VM medium and VM medium supplemented with yeast extract at pH 4.2, 5.8 and 7.8 for 24 h. Images of colony morphology were captured after 24 h using an AxioCam ICc3 coupled to the stereoscope trinocular Discovery V8 (Zeiss) at 80 X magnification. For linear growth, conidia were inoculated in race tubes containing VM medium at pH 4.2, 5.8 and 7.8 and incubated at room temperature. Measurements were made every 24 h.

For pH stress experiments, 10⁹ conidia ml⁻¹ were first germinated in 4 L of VM medium (pH 5.8) at 30 °C, 250 rpm, for 24 h. After this period, the culture was filtered and the mycelia divided into three samples. One was frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C for further processing (control sample, not submitted to stress) while the remaining two samples were transferred into 1 L of fresh VM medium containing 0.5 % sucrose at pH 4.2 (for acid stress) and 7.8 (for alkaline stress). Samples (125 ml) from mycelia submitted to both pH conditions were harvested after different periods of incubation. For the experiments combining pH and heat stress, mycelia obtained from the wild-type strain after 24 h were filtered and divided into three samples that were transferred into 1 L of fresh VM medium containing 0.5 % sucrose at pH 4.2, 5.8 and 7.8 preheated to 45 °C. Samples (125 ml) were harvested after 30 min incubation and processed as before.

In both stress experiment samples from the wild-type strain were subjected to the recuperation conditions. The remaining mycelia from the pH stress experiments were filtered and transferred back into 400 ml of fresh VM medium at pH 5.8 and 30 °C. Samples were collected after 30, 60 and 120 min of recuperation. For experiments combining pH and heat stress the remaining mycelia were transferred back into 400 ml of fresh VM medium pre-heated at 30 °C at the three different pH. Cells from 120 ml samples were harvested after 30, 60 and 120 min of recuperation and processed. The micelial samples were used for glycogen quantification and RNA extraction.

Generation of a $pacC^{KO}$ mutant by gene replacement

A strain bearing a deletion in the *pacC* gene was generated as described by Ninomiya *et al.* (2004). Briefly, three PCR fragments were produced using the following pairs of primers: fragment 1, primers 0090-F1 and 0090-R2, fragment 2, 0090-F2 and 0090-R3, and fragment 3, primers 0090-F3 and 0090-R1 (Table S1). Fragments 1 and 3 contained a 1.5 kb upstream and downstream of the ORF NCU00090 (*pacC*, 1,866 bp), respectively, with an additional 20 bp overlapping sequence from the *bar* gene. Both fragments were amplified from wild-type strain genomic DNA. Fragment 2 contained the *bar* ORF (1 kb) plus overlapping sequences from the *pacC* gene at both ends and was amplified from the p1V9A-1 plasmid (Freitas and Bertolini, 2004). All three fragments were purified using a Qiagen gel purification kit, and 100 ng of each fragment was mixed and used to amplify a single fragment (4 kb) with the primers 0090-F1 and 0090-R1. All PCRs were done using Phusion High Fidelity *Taq* polymerase (NEB). The final PCR fragment was purified and used to transform 10 day conidia from the strain FGSC#9568. Transformants were selected by plating in medium containing Basta (200 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Correct integration of the fragment into the genome was detected by PCR using primers 0090-F1 and 0090-R4 that annealed downstream from the amplified fragment. One transformant containing the right integration was backcrossed with FGSC#2490 to generate a homokaryotic strain.

$pacC$ cDNA cloning and production and purification of the recombinant protein

The *pacC* gene encodes a 621 amino acid protein with a theoretical molecular mass of 67 kD. A *pacC* cDNA fragment (639 bp) encoding the N-terminal region containing the zinc finger C_2H_2 DNA-binding domain was amplified from the cDNA plasmid library pYADE5 (Brunelli and Pall, 1993) with the oligonucleotides 90-F and 90-R2 (Table S1), as previously described (Gonçalves *et al.*, 2011). For expression of the His- Δ PACC recombinant protein the *E. coli* BL21(DE3) pLysS strain harboring the pET- Δ PACC plasmid was used. A truncated protein encompassing amino acids 1 to 213 fused to an N-terminal His₆-tag was produced. Cells were grown at 37 °C in 1 L of LB medium to an OD₆₀₀ of 0.7 and induced with IPTG (final concentration 0.4 mM) for 4 h at 37 °C. The cells were harvested by centrifugation, suspended in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10 % v/v glycerol, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25 mM benzamidine and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ each of antipain, leupeptin and pepstatin A) containing 0.5 % Triton X-100 and 5 % Tween 20 and lysed by sonication (5 cycles of 30 s sonication and 30 s on ice). After centrifugation, the supernatant was subjected to affinity chromatography on a HisTrap HP column (GE Healthcare) using an ÄKTA Prime purification system. The recombinant protein was eluted with a linear gradient of imidazole (20-500 mM) in buffer A and dialyzed two times against 1 L of dialysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM KCl, 10 % v/v glycerol, 1 mM EDTA and 0.5 mM DTT). The purified protein was analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie brilliant blue staining (Laemmli, 1970) and was quantified by the Hartree (Hartree, 1972) method using BSA as standard. The purified His- Δ PacC protein was used to raise antibodies in rabbits.

Glycogen quantification and gene expression assays

Micelial pads were ground to a fine powder in a pre-chilled mortar in liquid nitrogen and extracted with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF,

0.1 mM TCLK, 1 mM benzamidine and 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ each of pepstatin and aprotinin). Cell extracts were clarified by centrifugation (3,000 x g, 10 min, 4 °C) and the supernatants were used for glycogen and protein quantification. Glycogen was extracted by digestion with amyloglucosidase (30 mg ml^{-1}) and α -amylase (10 mg ml^{-1}) after ethanol precipitation, as previously described (Freitas *et al.*, 2010). Free glucose was measured with a glucose oxidase kit and the glycogen content was normalized to the total protein concentration. Total protein was quantified by the Hartree method (Hartree, 1972).

For gene expression analysis by Northern blotting, total RNA was extracted with LiCl (Sokolovsky *et al.*, 1990) from micelial samples subjected to pH and combined pH and temperature stress. Total RNA (15 μg) was electrophoresed on a 1.2 % agarose-formaldehyde denaturing gel (Sambrook and Russel, 2001) at 65 V for 5 h and then transferred to neutral nylon membranes (Hybond N, GE HealthCare) in 2 x SSC. The blots were probed either with a 678 bp *gsn* cDNA or 639 bp *pacC* cDNA fragments (10^6 - 10^8 cpm) radiolabelled with [α - ^{32}P]-dATP (3,000 $\mu\text{Ci/mM}$) by random priming (NEBlot kit, Biolabs) in 10 ml of ULTRAhyb hybridization solution (Ambion) at 42 °C overnight. After hybridization, the blot was washed twice in 2 x SSC containing 0.1 % SDS for 20 min, and twice in 0.1 x SSC containing 0.1 % SDS for 20 min followed by exposure to an X-ray film.

The *pacC* gene was also analyzed at protein level by Western blot. Total proteins from cells of the wild-type strain cultured at pH 5.8 for 24 h (control) and that subjected to alkaline pH stress (pH 7.8) for 1, 2, 3 and 4 h were prepared as described for glycogen extraction using glass beads. Proteins (100 μg) were separated by 12 % SDS-PAGE gels [42] and electrophoretically transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting was performed with polyclonal anti-PACC antibody and band intensities were normalized to parallel blots probed with anti- α -tubulin antibody (Sigma). Blots were subsequently probed with HRP-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with luminol reagent.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

DNA-protein binding reactions were carried out in 30-80 μL of 1 x binding buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 20 mM KCl, 10 % v/v glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 12.5 mM benzamidine and 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ each of antipain and pepstatin A) containing 2 μg of poly(dI-dC).(dI-dC) as a non-specific competitor and 0.5-5 μg of His- ΔPACC recombinant protein. In some experiments, 35 μg of protein from chromatographic fractions (obtained as described below) was used. A radiolabeled DNA probe ($\sim 10^4$ cpm) was added and the reactions were incubated at room temperature for 20 min. Free probe was separated from DNA-protein complexes by electrophoresis on a native 5 % polyacrylamide gel in 0.5 x-TBE buffer at 300 V, 10 mA and 10 °C. After electrophoresis, the gel was dried and autoradiographed. For competition assays, an excess of specific DNA competitor was added to the binding reactions 10 min prior to incubation with the radiolabeled probe.

For the supershift experiments, 5 μg of recombinant His- ΔPACC protein was incubated with an excess of polyclonal anti-PACC antibody (title 1:500) for 10 min on ice prior to the addition of radiolabeled *pacC* probe and further 20 min incubation at room temperature.

Preparation and fractionation of crude cellular extract for EMSA

Cells from the wild-type strain exposed to alkaline stress (pH 7.8, 60 min) or not (pH 5.8, control) were used to prepare crude cellular extracts. About 10 mg of frozen mycelia were

ground to a fine powder in liquid nitrogen in a pre-chilled mortar, homogenized in 20 ml of lysis buffer (15 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 % v/v glycerol, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 25 mM benzamidine, 50 mM NaF and 10 µg ml⁻¹ each of antipain and pepstatin A) and stirred with glass beads in eight cycles that consisted of 30 s of stirring and 30 s on ice. Crude cellular extract was recovered after centrifugation (3,200 x g, 2 min, 4 °C), dialyzed against buffer D (15 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 15 % v/v glycerol, 100 mM KCl, 1 mM EDTA) at 4 °C for 2 h, and cleared by centrifugation (20,000 x g, 20 min, 4 °C) before loading onto a Heparin-Sepharose FF column (GE Healthcare). The proteins were eluted with a 0.1-1.5 mM KCl linear gradient and the protein fractions were dialyzed against buffer D containing 0.5 mM PMSF, 25 mM benzamidine and 50 mM NaF and then frozen in liquid nitrogen and storage at -80 °C. Total protein was quantified by the Hartree method (Hartree, 1972). Proteins from the chromatographic fractions (35 µg of total protein) were analyzed for their ability to bind to the DNA fragment of the *gsn* promoter containing the *pacC* binding site.

DNA probe and competitors for EMSA

A putative *cis* PacC motif (5'-GCCAAG-3') was identified in the *gsn* 5'-flanking region (starting at nucleotide -1807) by analysis *in silico* using the MatInspector tool (www.genomatix.de). To produce the *pacC* probe, a 146 bp DNA fragment containing the PacC motif was amplified from the pIV9A-1 plasmid (GenBank#AF417205) using oligonucleotides PacC-F and GSN-RP3 (Table S1) in the presence of [α -³²P]-dATP (3,000 Ci/mM) and purified on 2 % low-melting point agarose gel. A mutant probe (*mpacC*) was prepared by changing the element core sequence from 5'-CTTGGC-3' to 5'-AAATTA-3' by site-directed mutagenesis in a two-step PCR (Ausubel *et al.*, 1996). The oligonucleotide pairs mPacC-F/GSN-RP2 and pGSN-F/mPacC-R (Table S1) were used in the first reaction to amplify two fragments, and the oligonucleotide pair pGSN-F/GSN-RP2 was used in a second reaction to amplify the whole DNA fragment containing the mutation. The 311 bp fragment was subcloned into the vector pMOS-Blue (GE Healthcare) and the desired mutation was confirmed by DNA sequencing. For EMSA, the mutant probe (*mpacC*) was amplified by PCR in the presence of [α -³²P]-dATP using the oligonucleotides PacC-F and GSN-RP3 and then purified.

The unlabeled 146 bp *pacC* probe was used as a specific DNA competitor. A 27 bp DNA oligonucleotide was also used as a competitor after annealing the complementary oligonucleotides OligoPacC-F and OligoPacC-R (Table S1). The specific competitors were quantified by measuring the absorbance at 260 nm and then added to the binding reaction in a 15- to 40-fold molar excess for the specific competitor and a 1- to 15-fold molar excess for the DNA oligonucleotide.

ChIP analysis

ChIP assays were performed according to Tamaru *et al.* (2003), with modifications. Briefly, the wild-type strain was grown in liquid VM medium at 30 °C, 250 rpm, for 24 h, and subjected to pH stress as previously described. Micelial samples (125 ml aliquots) were subsequently transferred into 500 ml flasks and the chromatin was fixed by adding formaldehyde to 1 % final concentration followed by incubation for 30 min at 30 °C and 250 rpm. Formaldehyde was quenched by adding 125 mM glycine to each sample and then incubating at 30 °C, 250 rpm, for 10 min. Chromatin prepared from each sample was pre-

cleared with normal rabbit IgG (Upstate) and then immunoprecipitated with polyclonal anti-PACC antibody and protein A-agarose (Sigma) pre-blocked with sonicated salmon-sperm DNA. As a negative control, a reaction without anti-PACC antibody was done. The 146 bp DNA fragment associated with the PACC protein was amplified by PCR using the oligonucleotides PacC-F and GSN-RP3 and the reaction products were analyzed on a 2 % agarose gel. A plasmid containing the entire sequence of the *gsn* gene, including its 5'- and 3'-flanking regions, was used as a positive control for PCR.

Acknowledgements

We thank Stela Virgilio for helping with the morphological analysis and Antonio Tarcisio Delfino for technical assistance. This work was supported by grants and fellowships from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

References

- Ariño, J. (2010) Integrative responses to high pH stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**: 517-523.
- Arst, H.N. Jr., and Peñalva, M.A. (2003a) pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. *Trends Genet* **19**: 224-231.
- Arst, H.N. Jr., and Peñalva, M.A. (2003b) Recognizing gene regulation by ambient pH. *Fungal Genet Biol* **40**: 1-3.
- Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J., *et al.* (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Brunelli, J.P., and Pall, M.L. (1993) A series of yeast/*Escherichia coli* k expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision. *Yeast* **9**: 1309-1318.
- Casado, C., González, A., Platara, M., Ruiz, A., Ariño, J. (2011) The role of the protein kinase A pathway in the response to alkaline pH stress in yeast. *Biochem J* **438**: 523-533.
- Colot, H.V., Park, G., Turner, G.E., Ringelberg, C., Crew, C.M., Litvinkova, L., *et al.* (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 10352-10357.
- Davis, D. (2003) Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr Genet* **44**: 1-7.
- de Paula, R., de Pinho, C.A., Terenzi, H.F., Bertolini, M.C. (2002) Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. *Mol Genet Genomics* **267**: 241-253.
- de Paula, R.M., Wilson, W.A., Terenzi, H.F., Roach, P.J., Bertolini, M.C. (2005) GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*. *Arch Biochem Biophys* **435**: 112-124.

- Díez, E., Alvaro, J., Espeso, E.A., Rainbow, L., Suárez, T., Tilburn, J., *et al.* (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *EMBO J* **21**: 1350-1359.
- Espeso, E.A., and Arst, H.N. Jr. (2000) On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid-expressed gene. *Mol Cell Biol* **20**: 3355-3363.
- Flaherty, J.E., Pirttilä, A.M., Bluhm, B.H., Woloshuk, C.P. (2003) PAC1, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5222-5227.
- Freitas, F.Z., and Bertolini, M.C. (2004) Genomic organization of the *Neurospora crassa* *gsn* gene. Possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of gene transcription during heat shock. *Mol Genet Genomics* **272**: 550-561.
- Freitas, F.Z., Chapeaurouge, A., Perales, J., Bertolini, M.C. (2008) A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. *Proteomics* **8**: 2052-2061.
- Freitas, F.Z., de Paula, R.M., Barbosa, L.C.B., Terenzi, H.F., Bertolini, M.C. (2010) cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. *Fungal Genet Biol* **47**: 43-52.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Borkovich, K.A., Selker, E.U., Read, N.D., Jaffe, D., *et al.* (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859-868.
- Gonçalves, R.D., Cupertino, F.B., Freitas, F.Z., Luchessi, A.D., Bertolini, M.C. (2011) A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Mol Cell Proteomics in press* 10.1074/mcp.M111.007963-2.
- Gorner, W., Durchschlag, E., Martinez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B., *et al.* (1998) Nuclear localisation of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586-597.
- Hartree, E.F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* **48**: 422-427.
- Herranz, S., Rodríguez, J.M., Bussink, H.J., Sánchez-Ferrero, J.C., Arst, H.N. Jr., Peñalva, M.A., *et al.* (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12141-12146.
- Hervás-Aguilar, A., Galindo, A., Peñalva, M.A. (2010) Receptor-independent ambient pH signaling by ubiquitin attachment to fungal arrestin-like PalF. *J Biol Chem* **285**: 18095-18102.
- Kullas, A.L., Martin, S.J., Davis, D. (2007) Adaptation to environmental pH: integrating the Rim101 and calcineurin signal transduction pathways. *Mol Microbiol* **66**: 858-871.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lamb, T.M., and Mitchell, A.P. (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **23**: 677-686.
- Li, W., and Mitchell, A.P. (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**: 63-73.
- McCluskey, K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* **52**: 245-262.
- Meyer, V., Spielvogel, A., Funk, L., Tilburn, J., Arst, H.N. Jr., Stahl, U. (2005) Alkaline pH-induced up-regulation of the *afp* gene encoding the antifungal protein (AFP) of

- Aspergillus giganteus* is not mediated by the transcription factor PacC: possible involvement of calcineurin. *Mol Genet Genomics* **274**: 295-306.
- Merhej, J., Richard-Forget, F., Barreau, C. (2011) The pH regulatory factor Pac1 regulates *Tri* gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*. *Fungal Genet Biol* **48**: 275-284.
- Martinez-Pastor, M., Marchler, G., Schuller, C., Marchler, B.A., Ruis, H., Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**: 2227-2235.
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H. (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 12248-12253.
- Noventa-Jordão, M.A., Polizeli, M.L.T.M., Bonini, B.M., Jorge, J.A., Terenzi, H.F. (1996) Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. *FEBS Lett* **378**: 32-36.
- Nozawa, S.R., Ferreira-Nozawa, M.S., Martinez-Rossi, N.M., Rossi, A. (2003) The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene *pacc*-dependent pathway. *Fungal Genet Biol* **39**: 286-295.
- Peñalva, M.A., and Arst, H.N. Jr. (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annu Rev Microbiol* **58**: 425-451.
- Peñalva, M.A., Tilburn, J., Bignell, E., Arst, H.N. Jr. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends Microbiol* **16**: 291-300.
- Peñas, M.M., Hervás-Aguilar, A., Múnera-Huertas, T., Reoyo, E., Peñalva, M.A., Arst, H.N. Jr., et al. (2007) Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. *Eukaryot Cell* **6**: 960-970.
- Platara, M., Ruiz, A., Serrano, R., Palomino, A., Moreno, F., Ariño, J. (2006) The transcriptional response of the yeast Na⁺-ATPase *ENA1* gene to alkaline stress involves three main signaling pathways. *J Biol Chem* **281**: 36632-36642.
- Rothman-Denes, L.B., and Cabib, E. (1971) Glucose-6-phosphate dependent and independent forms of yeast glycogen synthetase. Their properties and interconversions. *Biochemistry* **10**: 1236-1242.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 3rd ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour.
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J.R., Ariño, J. (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol* **46**: 1319-1333.
- Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., Russo, V.E.A. (1990) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Newslett* **37**: 41-43.
- Squina, F.M., Leal, J., Cipriano, V.T., Martinez-Rossi, N.M., Rossi, A. (2010) Transcription of the *Neurospora crassa* 70-kDa class heat shock protein genes is modulated in response to extracellular pH changes. *Cell Stress Chaperones* **15**: 225-231.
- Su, S.S., and Mitchell, A.P. (1993) Identification of functionally related genes that stimulate early meiotic gene expression in yeast. *Genetics* **133**: 67-77.
- Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., et al. (2003) Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat Genet* **34**: 75-79.

- Tilburn, J., Sarkar, S., Widdick, D.A., Espeso, E.A., Orejas, M., Mungroo, J., *et al.* (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J* **14**: 779-790.
- Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barceló, A., *et al.* (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **279**: 43614-43624.
- Vogel, H.J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol Genet Bull* **13**: 42-43.

Figure legends

Fig. 1. *pacC* gene knockout and phenotypic analysis of the mutant strain. (A) Schematic illustration of the *pacC* gene knockout strategy. (B) Diagnostic PCR for validation of the *pacC* knockout. (C) Linear growth analysis. Apical extension of basal hyphae was determined in race tubes, as described in Material and Methods. The results shown are the average of three independent experiments. (D) Melanization. Strains were cultured in 250 ml⁻¹ flasks containing VM medium for 10 days (3 days at 30 °C in the dark and 7 days at room temperature in ambient light/dark). Melanization can be visualized as brown pigment formation in the *pacC*^{KO} strain. (E) Radial growth analysis. Basal hyphae growth was examined after cultivating the strains on plates containing solid VM medium, as described in Material and Methods. Growth was expressed as colony diameter.

Fig. 2. Phenotypes of the wild type and *pacC*^{KO} strains in different pH and nutritional growth conditions. The strains (10⁷ conidia/ ml⁻¹) were cultured on plates containing agar VM medium and VM medium supplemented with yeast extract (VM + YE) at pH 4.2, 5.8 and 7.8, in ambient light/dark for 24 h. Hyphae at the colony edge were observed using a stereoscope.

Fig. 3. Glycogen accumulation during acid and alkaline pH stress. (A) Glycogen content in the wild type strain. Glycogen was extracted from mycelia grown under physiological conditions (pH 5.8, control) and under acid (pH 4.2) and alkaline (pH 7.8) stress. After 120 min, the remaining cultures were transferred back to physiological conditions (pH 5.8). The results shown are the average of at least three independent experiments. (B) Glycogen content in the *pacC*^{KO} strain compared to the wild-type strain. 0, cell samples before the pH shift (control).

Fig. 4. *gsn* and *pacC* gene expression during acid and alkaline pH stress. Cells from the wild type and *pacC*^{KO} strains were cultivated at pH 5.8 for 24 h and shifted to pH 4.2 and pH 7.8. Samples were collected and used to extract total RNA. Total RNA (15 µg) was separated by electrophoresis in a denaturing formaldehyde gel, transferred to nylon membrane and probed with [α-³²P] radiolabeled 678 bp *gsn* cDNA or 639 bp *pacC* cDNA fragments (gel autoradiographies). The 28 S rRNA was used as a loading control after ethidium bromide staining. The results shown are the average of at least three independent experiments. (A) Analysis of the *gsn* and *pacC* genes in the wild-type strain at different times after pH shifting. After pH stress the remaining cultures were transferred back to physiological conditions (RE, recuperation, pH 5.8) and samples were collected. (B) Analysis of the *gsn* gene in the

pacC^{KO} strain compared to the wild-type strain at different times after pH shifting. 0, cell samples before pH shifting (control).

Fig. 5. Glycogen accumulation and gene expression during combined pH and heat shock stress. Glycogen and total RNA were extracted from wild-type mycelia cultivated at pH 5.8 and 30 °C for 24 h and then shifted to pH 5.8, 4.2 and 7.8 at 45 °C for 30 min. After 30 min, the remaining samples were transferred back to the physiological temperature (30 °C) at the three pH conditions and incubated for different times (RE, recuperation). (A) Accumulation of glycogen. (B) *gsn* and *pacC* gene expression. Total RNA (15 µg) was separated by electrophoresis in a denaturing formaldehyde gel, transferred to nylon membrane and probed with the [α -³²P] radiolabeled 678 bp *gsn* cDNA and 639 bp *pacC* cDNA fragments (gel autoradiographies). The 28S rRNA was used as a loading control after ethidium bromide staining. The results shown are the average of at least three independent experiments. 0, cell samples before pH shifting (control).

Fig. 6. Binding of recombinant PACC to the *gsn* promoter. (A) Upper panel, schematic representation of the *pacC* probe and the specific competitor oligo *pacC*. Lower panels, gel shift analysis using increasing amounts of recombinant PACC in the presence of specific competitors and polyclonal anti-PACC antibody. Lanes 1, 5 and 9, *pacC* probe, no protein added. Lanes 2, 6 and 10, gel shift analysis using 1.0, 2.0 and 5.0 µg of recombinant PACC. Lanes 3 and 7, gel shift analysis in the presence of the 146 bp specific competitor. Lanes 4 and 8, gel shift analysis using the specific competitor oligo *pacC*. Lanes 11 to 13, supershift assay using 5.0, 10.0 and 20.0 µl⁻¹ of anti-PACC antibody (1:500). (B) Upper panel, schematic representation of the mutated *mpacC* probe. Lower panel, gel shift analysis using 0.5 µg (lane 2), 1.0 µg (lane 3), 2.0 µg (lane 4) and 3.0 µg (lane 5) of recombinant PACC. Lane 1, *mpacC* probe, no protein added. O, gel origin; SC, specific competitor; FP, free probe.

Fig. 7. PACC binds specifically to the *gsn* promoter region in an alkaline pH-independent manner. (A) Gel shift analysis using crude cellular extracts fractionated on a Heparin-Sepharose column. Crude cellular extracts (CCE) from mycelia submitted or not to alkaline pH stress (pH 7.8) were fractionated by affinity chromatography. A protein fraction (35 µg) exhibiting DNA-binding activity was assayed in the presence of specific competitors. Lane 1, *pacC* probe, no protein added. Lanes 2 and 7, proteins from pH 5.8 and pH 7.8 samples, respectively, in the absence of competitors. Lanes 3 and 8, DNA band shift in the presence of the 146 bp *pacC* specific competitor. Lanes 4 to 6 and 9 to 11, DNA band shifts in the presence of increasing amounts of the 27 bp DNA oligo *pacC* as a specific competitor. O, gel origin; SC, specific competitor; FP, free probe. (B) PACC shows the same molecular mass at pH 5.8 and pH 7.8. Crude cellular extracts prepared from wild type *N. crassa* submitted or not to alkaline pH stress were analyzed by Western blotting using a polyclonal anti-PACC antibody. The protein α -tubulin (theoretical molecular mass 50 kD) was used as a loading control. (C) Chromatin immunoprecipitation assay using the polyclonal anti-PACC antibody. Genomic DNA samples from wild-type *N. crassa* submitted or not to pH stress were immunoprecipitated with the anti-PACC antibody and subjected to PCR to amplify a 146 bp DNA fragment of the *gsn* promoter containing the *pacC* motif. A plasmid construction containing the entire sequence of the *gsn* gene, including its 5'- and 3'-flanking regions, was used as a positive control. As a negative control, the immunoprecipitation reactions were performed without the anti-PACC antibody. L, 1 kb DNA ladder

Table 1- Oligonucleotides used in this study.

Primer	Sequence ^{a, b, c}	Source	Name	Position ^d
0090-F1	5'-CATGCTCATCCGCCGTC AACC-3'	<i>pacC</i> 5'-flanking region	-	-1505 to -1485
0090-R2	5'- CAATATCATCTTCTGTGCGACGGTTGCTGCTGTGACCG-3'	<i>pacC</i> 5'-flanking region	-	-1 to -19
0090-F2	5- CGGTCACACAGCAGCAACCGTCGACAGAAGATGATATTG-3'	pBARGEM7-2	<i>bar</i> ORF	-
0090-R3	5'- GCCTTCCTTACATGGGGAGCGTCGACCTAAATCTCGGT-3'	pBARGEM7-2	<i>bar</i> ORF	-
0090-F3	5'- ACCGAGATTTAGGTCGACGCTCCCCATGTAAGGAAGGC-3'	<i>pacC</i> 3'-flanking region	-	2042 to 2061
0090-R1	5'- TAGTATGCTGCGCGGCGATAC-3'	<i>pacC</i> 3'-flanking region	-	3455 to 3476
0090-R4	5'- GATTGGACAGAAGCAGGGAAG-3'	<i>pacC</i> 3'-flanking region	-	3565 to 3585
90-F	5'- <u>CATATG</u> TCGTCCACACCAGCCAG-3'	NCU00090 ORF	-	1 to 21
90-R2	5'- <u>GGATCC</u> <i>TTACT</i> TTGTGAAGTGGAGCCTG-3'	NCU00090 ORF	-	639 to 622
PacC-F	5'-GACCCAACAGCCCAACTT-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>pacC</i> probe	1918 to -1901
GSN-RP3	5'-GCAACGAATACTCCCATG-3'	<i>gsn</i> promoter	<i>pacC</i> probe	1773 to -1790
mPacC-F	5'-GCCGTCTTTGGGCCAG <i>AAATT</i> ACGTGAGATCGGGCCCGC-3'	<i>gsn</i> promoter	mpacC probe	-1828 to -1790
mPacC-R	5'-GCGGGCCCGATCTCACG <i>TAATTT</i> CTGGCCCAAAGACGGC-3'	<i>gsn</i> promoter	mpacC probe	-1790 to -1826
pGSN-F	5'-TTGGAAGACGGGACC-3	<i>gsn</i> promoter	mpacC probe	-2386 to -2370
GSN-RP2	5'-CTGTTGACCCTGCGTTACG-3'	<i>gsn</i> promoter	mpacC probe	-1269 to -1286
HSE-F	5'-GGGGAATTTGTGGCTGA-3'	<i>gsn</i> promoter	-	-2087 to -2071
OligoPacC-F	5'-CTTTGGGCCAGCTTGCCCGTGAGATCG-3'	<i>gsn</i> promoter	oligo <i>pacC</i>	-1823 to -1797
OligoPacC-R	5'-CGATCTCACGGCCAAGCTGGCCCAAAG-3'	<i>gsn</i> promoter	oligo <i>pacC</i>	-1797 to -1823

^aThe *Nde*I and *Bam*HI restriction sites are underlined in the 90-F and 90-R2 sequences, respectively. ^bThe TAA stop codon inserted in the ORF NCU00090 sequence is represented in bold and italic. ^cThe nucleotides mutated in the *pacC* motif are represented in bold. ^dPrimers are positioned according to the ATG start codon.

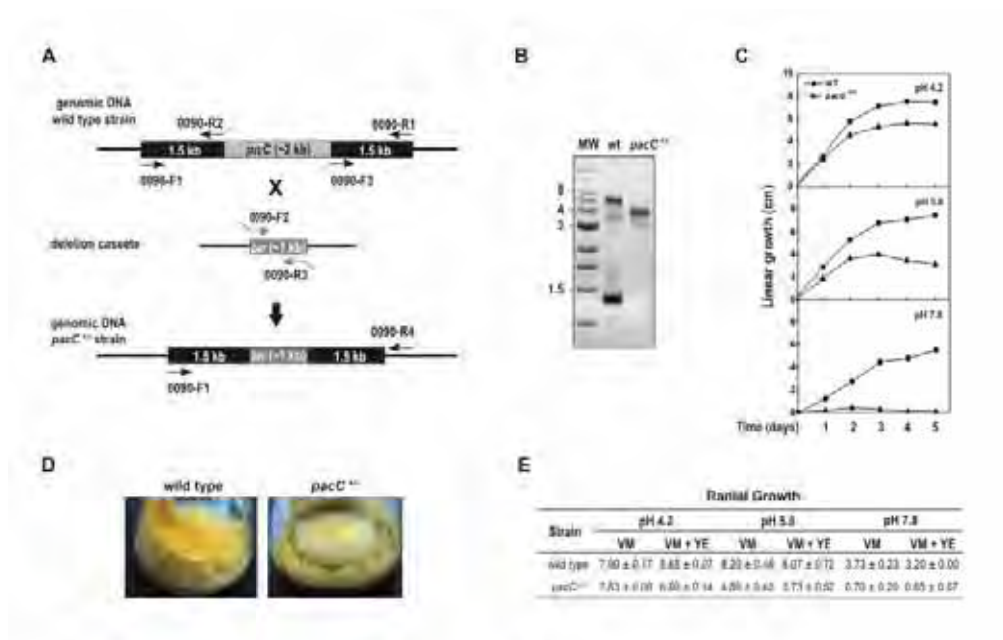


Fig. 1
Gupartina et al.

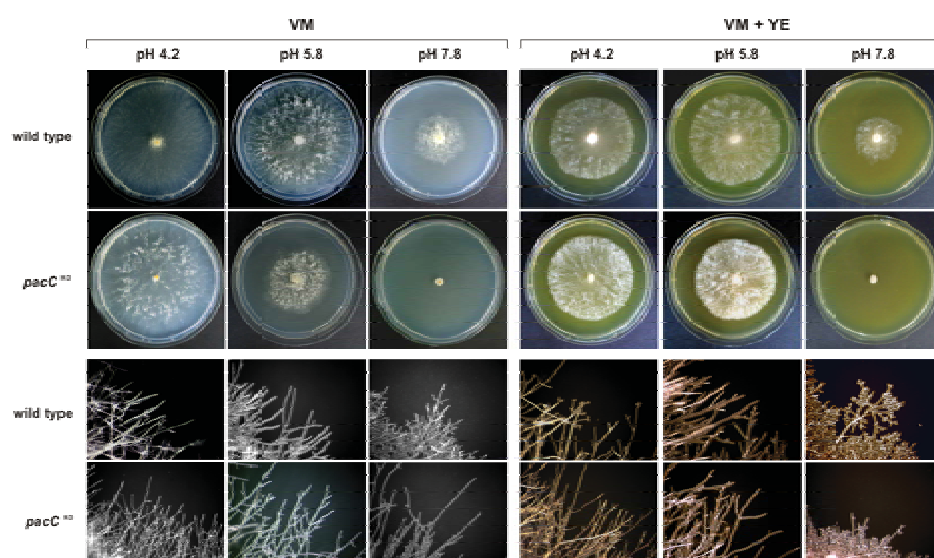


Fig. 2
Cupertino et al.

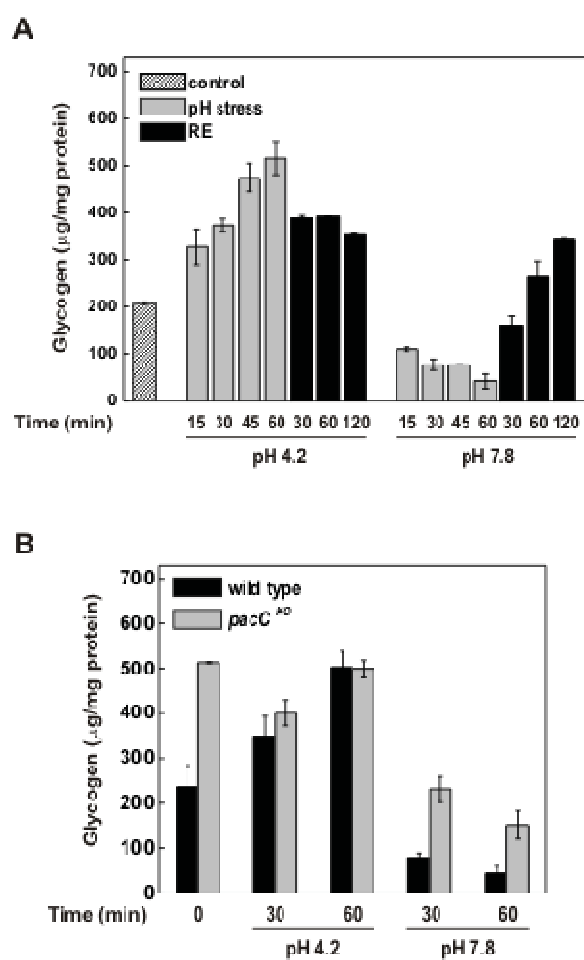
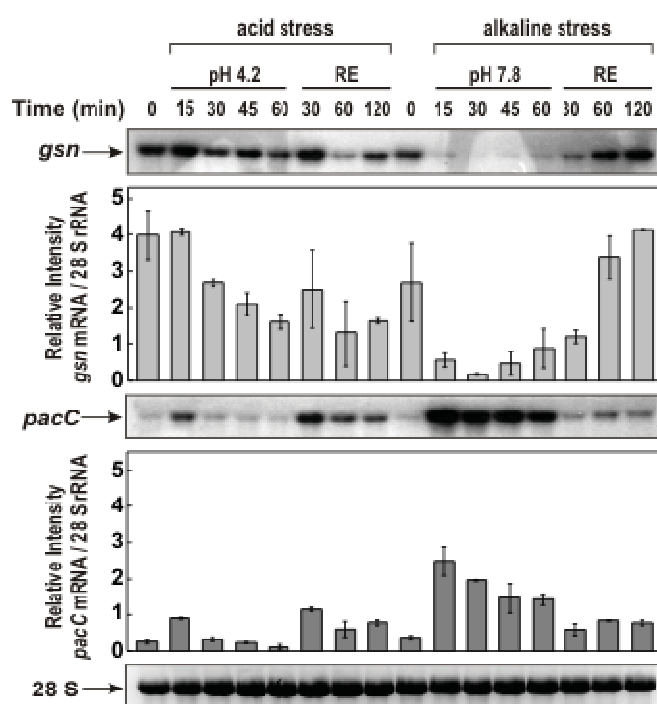


Fig. 3
Cupertino *et al.*

A



B

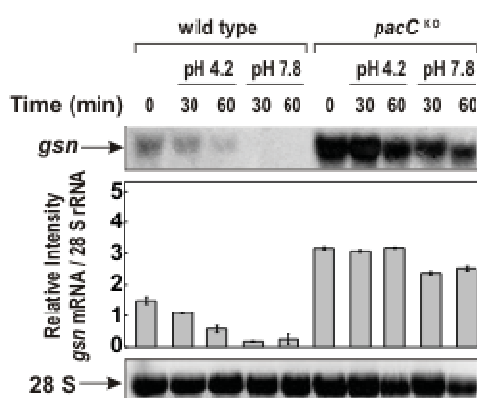
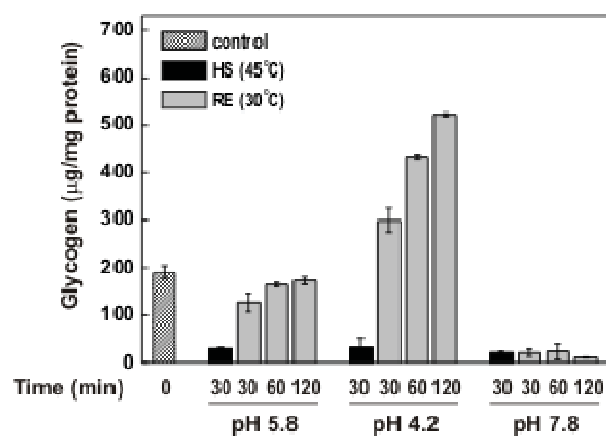


Fig. 4
Cupertino *et al.*

A



B

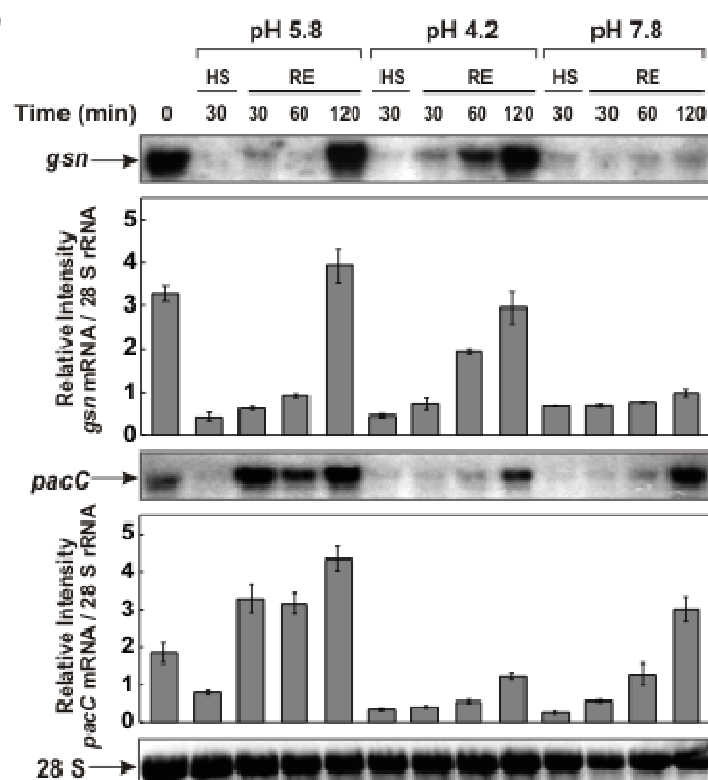


Fig. 5
Cupertino et al.

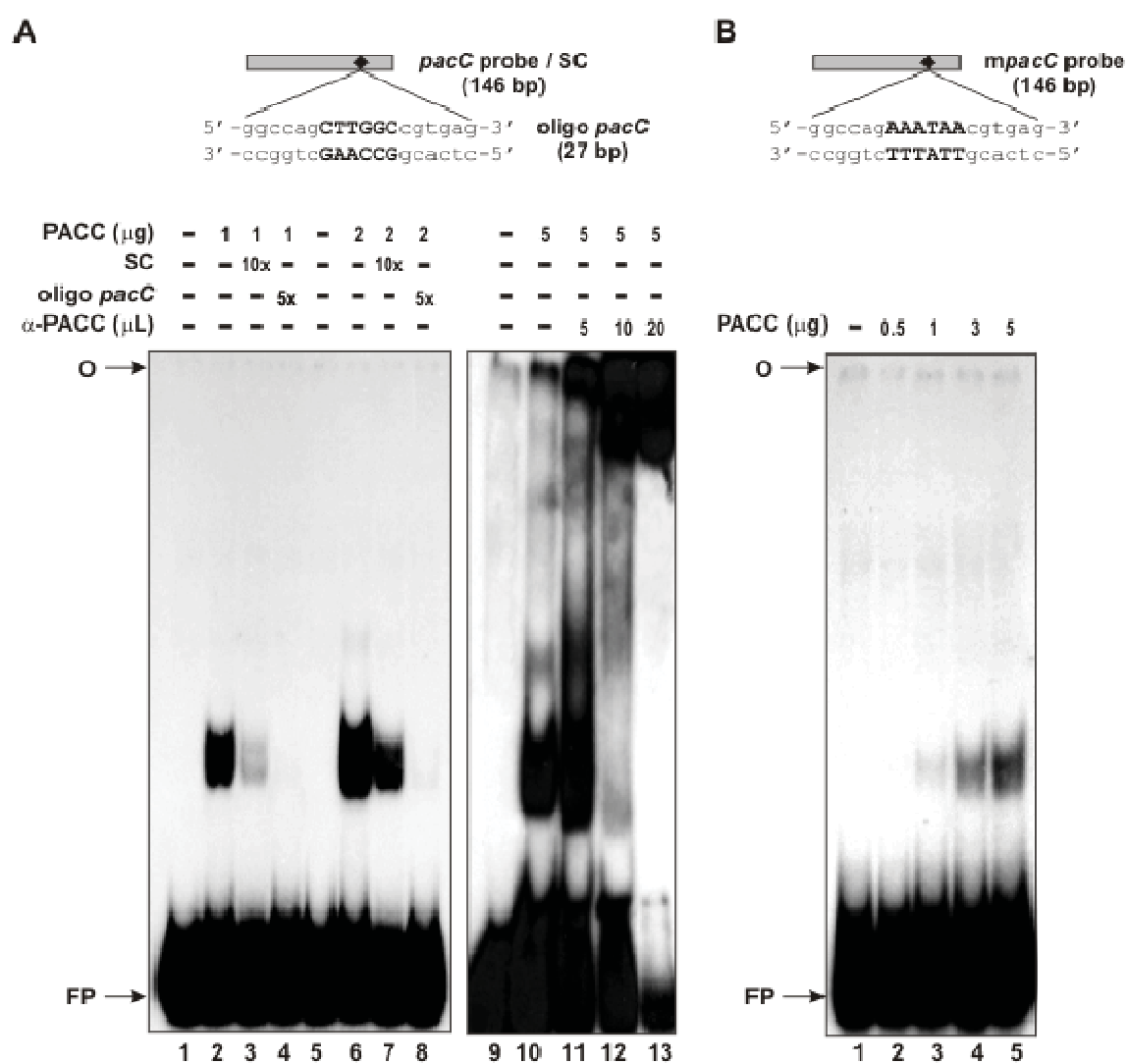


Fig. 6
 Cupertino *et al.*

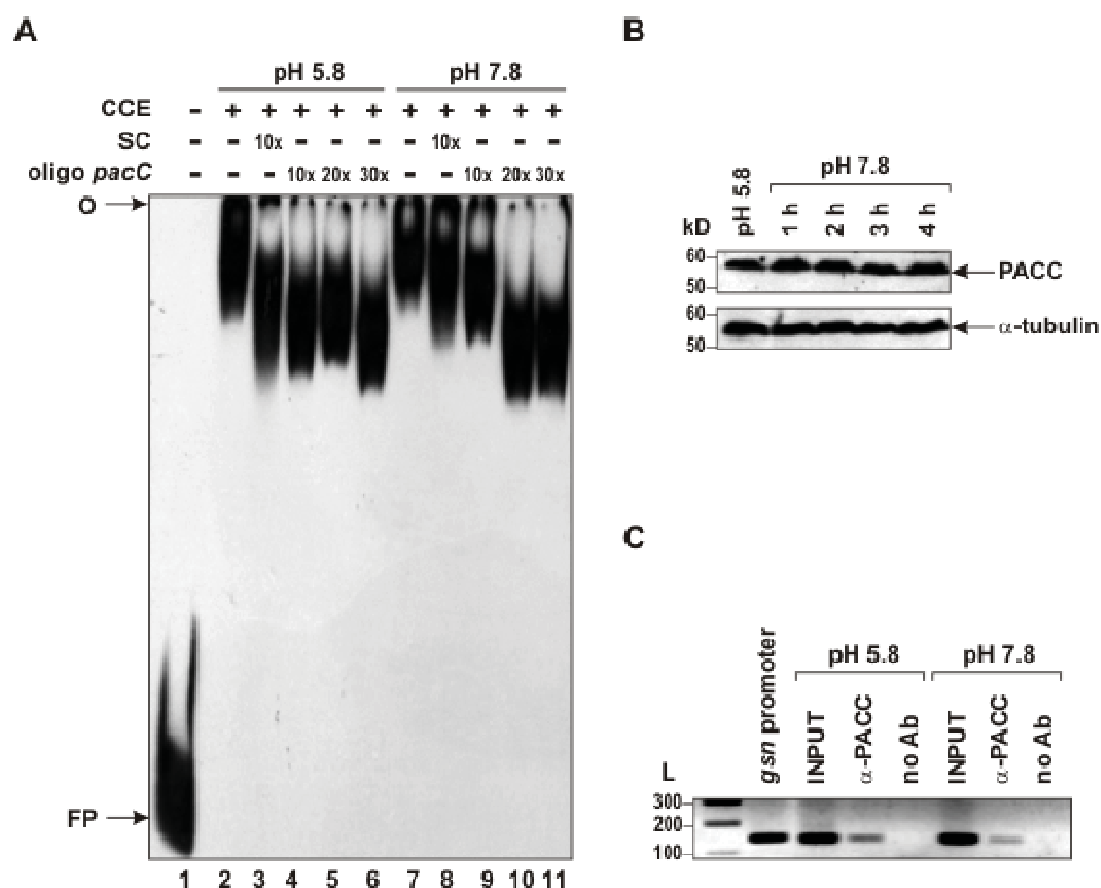


Fig. 7
Cupertino *et al.*