



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP

Instituto de Química de Araraquara



*Caracterização Funcional dos Elementos de Transcrição do
Gene da Glicogênio Sintase (gsn) de Neurospora crassa*

Fernanda Zanolli Freitas

Orientadora – Profa. Dr Maria Célia Bertolini

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto
de Química, UNESP, Araraquara, para a
obtenção do Título de Doutor no Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia, Área de
Concentração de Biotecnologia

ARARAQUARA - SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

F866c Freitas, Fernanda Zanolli
Caracterização funcional dos elementos de transcrição do gene da glicogênio sintase (*gsn*) de *Neurospora crassa* / Fernanda Zanolli Freitas. – Araraquara : [s.n], 2007
180 f. : il.

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

1. Bioquímica. 2. Biologia molecular. 3. Transcrição gênica. 4. Choque térmico. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

Fernanda Zanolli Freitas

1. Dados Pessoais

- 1.1. Nascimento: 07/03/1974
- 1.2. Nacionalidade: brasileira
- 1.3. Naturalidade: Colina, SP.
- 1.4. Estado civil: solteira
- 1.5. Filiação: Carlos Humberto Freitas
Maria Aparecida Zanolli Freitas
- 1.6. Profissão: Farmacêutico Bioquímico
- 1.7. Identidade: 24.244.602-4
- 1.8. C.P.F.: 175.522.318-82
- 1.9. Endereço Residencial: R. Adriano Augusto Cabral, 300
14770-000, Colina, SP.
- 1.10. Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara, UNESP
Depto Bioquímica e Tecnologia Química
R. Prof. Francisco Degni, s/n
14800-900, Araraquara, SP.

2. Formação Acadêmica

- 2.1. Doutorado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, concluído em 02 de fevereiro de 2007.
- 2.2. Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, concluído em 07 de novembro de 2001.
- 2.3. Farmacêutico Bioquímico, pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, UNESP, concluído em 26 de julho de 1997.

3. Prêmios e Títulos

3.1. 2004 David Perkins Scholarship Award

Neurospora crassa Committe - Asilomar, Califórnia, USA, 02 de abril de 2006.

3.2. Honra ao Mérito

Instituto de Química de Araraquara, UNESP – Araraquara, SP, 29 de maio de 2006.

4. Publicações

4.1. Artigos completos publicados em periódicos

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. Genet. Genomics**, Berlim, v. 272, n. 5, p. 550-561, Dec. 2004.

RIZZATTI, A. C. S.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C.; PEIXOTO-NOGUEIRA, S.C.; TERENCEZ, H. F.; JORGE, J. A.; POLIZELI, M. L. T. M. Regulation of xylanases in *Aspergillus phoenicis*: a physiological and molecular approach. **Anton. Leeuw. Int. J. G.**, submetido na forma revisada, 2007.

4.2. Artigos resumidos publicados em periódicos

FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Identification of Proteins Binding to the cis Regulatory STRE Element of the *gsn* Promoter. A Mass Approach. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 53, 2006.

“O tempo e a paciência são dois eternos beligerantes”
(Leon Tolstoi)

Dedico estas páginas primeiramente a Deus, pela oportunidade de segurar Suas mãos durante esta caminhada, mantendo em mim a força e perseverança necessária para findar meus estudos com tamanho êxito.

Dedico também às pessoas que mais amo nesta vida: meus pais, minhas queridas irmãs (de quem muito tenho orgulho) e minha avó materna...

Ao Mateus

Pela paciência inesgotável nos momentos mais difíceis, pelas palavras amigas e pelo carinho imenso durante todos estes anos em que estamos juntos.

“... Não se preocupe em "entender". Viver ultrapassa todo entendimento. Renda-se, como eu me rendi. Mergulhe no que você não conhece como eu mergulhei. Eu sou uma pergunta. O jogo de dados de um destino é irracional ? É impiedoso...”

"... **Não entendo**. Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender. Entender é sempre limitado. Mas não entender pode não ter fronteiras. Sinto que sou muito mais completa quando não entendo. Não entender, do modo como falo, é um dom. Não entender, mas não como um simples de espírito. O bom é ser inteligente e não entender. É uma benção estranha, como ter loucura sem ser doida. É um desinteresse manso, é uma doçura de burrice. Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco. Não demais: mas pelo menos entender que não entendo...”

(Clarice Lispector, A Hora da Estrela)

“...O que me tranqüiliza é que tudo o que existe, existe com uma precisão absoluta. O que for do tamanho de uma cabeça de alfinete não transborda nem uma fração de milímetro além do tamanho de uma cabeça de alfinete. Tudo o que existe é de uma grande exatidão. Pena é que a maior parte do que existe com essa exatidão nos é tecnicamente invisível. O bom é que a verdade chega a nós como um sentido secreto das coisas. Nós terminamos adivinhando, confusos, a perfeição...”

(Clarice Lispector, A Descoberta do Mundo)

Agradecimentos

Sem dúvida nenhuma, esta tese de Doutorado é resultado de um trabalho árduo no qual me envolvi durante todo tempo e cujos frutos colhidos foram extremamente gratificantes. Como todas as outras teses, existiram momentos felizes, momentos de frustrações, momentos de tensão e momentos de mais puro êxtase. Lembro-me até hoje do dia em que consegui fazer meu primeiro EMSA. Fiquei trancada na sala de onde revelamos filmes no laboratório, suando, chorando e rindo ao mesmo tempo, sem saber se aquela mancha escura que eu estava olhando era mesmo um resultado positivo ou somente um borrão. Bom, “aquilo” graças a Deus não era um borrão. Este episódio aconteceu quando eu ainda cursava o Mestrado e juntamente com as pessoas com quem convivi durante estes anos, foi tão importante para o meu amadurecimento profissional que hoje, encerrando o Doutorado, gostaria de deixar para elas alguns agradecimentos especiais.

À minha orientadora, Profa. Dr. Maria Célia Bertolini, pela nossa convivência durante estes anos, que resultou em grande amadurecimento intelectual de minha parte. Pelas conversas, puxões de orelha, amizade, idéias, pela honestidade e pelo ensino, meu sincero muito obrigada!

Ao meu amigo Dr. Renato M. de Paula, pela nossa amizade, pela ajuda na introdução de novas metodologias, pelas importantes discussões, pela paciência, pelas soluções “furtadas sorrateiramente” e pelos momentos de grande descontração.

Ao amigo Eduardo Hilário, sempre presente no laboratório, por me ensinar a falar a linguagem do AKTA, pelas risadas, pelo companheirismo, por sua inestimável ajuda nos computadores, enfim, por tudo.

À minha Grande amiga Elaine, pela amizade, pelas risadas e sobretudo pela paciência. Grande amiga, de Bertolete para Bertolete: decididamente eu falo muito!

Para as minhas amigas Margareth e Ana Paula, pelas nossas risadas, pelas ajudas nos gráficos e géis 2D, pela nossa grande amizade.

Para a minha super assistente Flávia Magazzoni, que não contesta nada e aceita me ajudar em “tudo”, pelas construções realizadas, por ainda não ter perdido a paciência com a construção 6, por não ter desistido e querer continuar aprendendo comigo, pela chance de conhecê-la melhor e construir uma nova e importante amizade.

Para as novas amigas que surgiram no laboratório: as “Grandes” Patrícia, Gisele e Juquinha, Luiz e Rodrigo, pelos meios de cultura “emprestados”, “autoclavagens”, pelas boas risadas...

Aos colegas de laboratório que já se foram Maria Teresa, Rosana, Patrícia Maida, Alessandra Jim e Luciano.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, pelos conhecimentos transmitidos durante os cursos realizados. Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva e ao Prof. Dr. Sandro Roberto Valentini, pela participação no Exame Geral de Qualificação e pelas sugestões apresentadas.

À Profa. Dr. Nádia Monesi, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, que acompanha meu trabalho desde o Mestrado, pelos auxílios nos estudos de promotor e pelo grande incentivo dado na aplicação do curso “Eukaryotic Gene Expression Course”. Muito obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química: Fernando, Zilda, Valdenir, Fátima e especialmente ao Tarcísio, pela nossa amizade, pelo imprescindível trabalho no nosso laboratório e pelos muitos frascos de Gatorade...

Às funcionárias da Biblioteca, sobretudo à Camila, pelo auxílio prestado. Às meninas da Seção de Pós-Graduação Sandra, Patrícia, Célia Coelho, Neusinha, Geni e Vilma.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pelo importante suporte financeiro concedido para o curso “Eukaryotic Gene Expression Course”, realizado em agosto de 2005, em Cold Spring Harbor, NY, o qual foi de grande relevância para minha formação acadêmica.

Aos meus familiares queridos: ao Sr Carlos e à D. Cida (meus pais), minhas irmãs Flávia e Bia e minha avó materna D. Matilde, que sempre me recebem com um sorriso imenso no rosto quando chego em casa e que rezaram tanto para que eu chegasse até aqui. Ao Mateus, meu grande companheiro, ao Sr. Luiz e à D. Vera, pelas conversas pândegas, pela companhia, pelo carinho e pelos excelentes finais de semana...

Sobretudo a Deus, que com sua benevolência imensa permitiu que eu chegasse até aqui...

Índice

DADOS CURRICULARES	i
AGRADECIMENTOS	vi
ABREVIATURAS	xii
RESUMO	13
ABSTRACT	16
INTRODUÇÃO	19
1. O fungo <i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudo	20
2. Uma visão geral sobre o metabolismo do glicogênio	24
3. Regulação do metabolismo do glicogênio. Aspectos moleculares e regulatórios da enzima glicogênio sintase	27
4. Controle transcricional da enzima glicogênio sintase	33
OBJETIVOS	46
MATERIAIS E MÉTODOS	48
MATERIAIS	49
1. Linhagens	49
2. Meios de Cultura	50
3. Soluções e tampões utilizados	51
4. Oligonucleotídeos <i>primers</i>	54
5. Reagentes	54
MÉTODOS	55
1. <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (EMSA)	55
1.1. Expressão do gene <i>gsn</i> nas linhagens selvagem, <i>mcb</i> e <i>cr-1</i> e choque térmico	55
1.2. Isolamento de núcleos de <i>N. crassa</i>	55
1.3. Preparo dos extratos nucleares	56
1.4. Sondas de DNA e competidores específicos para os elementos de DNA STRE e HSE contidos na região 5' flangeadora do gene <i>gsn</i>	56
1.4.1. Preparo das sondas HSE, HSE1, HSE2 e STRE1 para analisar os elementos de DNA presentes na região promotora do gene <i>gsn</i>	56
1.4.2. Preparo das sondas STRE2/HSEi, STRE2 e HSEi para analisar os elementos de DNA contidos no <i>intron1</i> da região 5'-UTR do gene <i>gsn</i>	57
1.4.3. Preparo da sonda contendo o elemento STRE1 mutado (mSTRE1)	58
1.4.4. Competidores específicos e inespecíficos para as sondas utilizadas	58
1.5. Sonda de DNA e competidor específico para o consenso STRE3 presente na região 3' flangeadora do gene <i>gsn</i>	58
1.6. Sondas de DNA e competidores específicos para os consensos CRE presentes na região 5' flangeadora do gene <i>gsn</i>	59
1.7. Marcação das sondas de DNA	60
1.8. Ensaio de mobilidade em gel (EMSA)	60

2. Análise da expressão do gene <i>gsn</i> e acúmulo de glicogênio durante o choque térmico	60
2.1. Condições de cultivo das linhagens	61
2.2. Extração de RNA total	61
2.3. Análise da expressão gênica por <i>Northern blot</i>	61
2.3.1. Sondas utilizadas	62
2.4. Determinação do conteúdo de glicogênio	62
3. Determinação do promotor basal <i>gsn</i> na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
3.1. Preparo das construções plasmidiais	63
3.2. Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.3. Determinação da atividade β -galactosidase na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	66
3.3.1. Ensaio qualitativo para detecção da atividade β -galactosidase	67
3.3.2. Determinação quantitativa da atividade β -galactosidase	67
4. Determinação do promotor basal <i>gsn</i> no fungo <i>Neurospora crassa</i>	68
4.1. Preparo das construções plasmidiais	68
4.2. Transformação de conídios e seleção dos transformantes	69
4.3. Determinação qualitativa do conteúdo de glicogênio nos transformantes de <i>N. crassa</i>	71
5. Isolamento de proteínas nucleares que ligam ao elemento STRE1 do promotor <i>gsn</i>	71
5.1. Fracionamento do extrato nuclear por cromatografia de afinidade e análise das frações coletadas por EMSA	73
5.2. <i>Southwestern blotting</i>	73
5.3. Estimativa da massa molecular (MM) e do ponto isoelétrico (pI) das proteínas alvos	73
5.4. SDS-PAGE acoplado à eletroforese bidimensional	75
5.5. Espectrometria de massas através de ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI)	76
5.5.1. Redução e alquilação das proteínas <i>in gel</i> (apenas para as amostras que não foram tratadas previamente com agentes redutores e alquilantes)	76
5.5.2. Digestão das proteínas <i>in gel</i> e extração dos peptídeos tripticos	77
RESULTADOS	78
1. Interação entre proteínas nucleares e os elementos transcrpcionais STRE e HSE do promotor <i>gsn</i>	79
2. Reconhecimento dos elementos HSE e STRE localizados no <i>intron1</i> da região 5'-UTR do gene <i>gsn</i> por proteínas nucleares de choque térmico	82
3. Interação entre proteínas nucleares e o elemento STRE da região 3' flanqueadora do gene <i>gsn</i> na situação de choque térmico	84
4. Expressão do gene <i>gsn</i> e acúmulo de glicogênio em <i>N. crassa</i> durante a situação de choque térmico	85
5. Determinação do promotor basal <i>gsn</i> na levedura <i>S. cerevisiae</i>	85
6. Determinação do promotor basal <i>gsn</i> no fungo <i>N. crassa</i>	90
7. Tentativa de isolamento e identificação das proteínas do extrato nuclear HS30 que interagem com o elemento de transcrição STRE do promotor <i>gsn</i>	92
8. Análise da expressão do gene <i>gsn</i> em linhagens mutantes na via de sinalização do AMPc	101
9. Análise funcional dos elementos de transcrição CRE	103
DISCUSSÃO	110
1. Caracterização dos elementos transcrpcionais regulatórios presentes nas regiões flanqueadoras do gene <i>gsn</i>	111
2. Caracterização preliminar das regiões do promotor <i>gsn</i> importantes para a transcrição gênica	114
3. Identificação de proteínas envolvidas no controle transcrricional do gene <i>gsn</i> durante o choque térmico	116
4. Influência da via de sinalização mediada por AMPc na regulação da expressão do gene <i>gsn</i>	120

CONCLUSÕES	124
BIBLIOGRAFIA	127
ANEXO 1	149
ANEXO 2	172

Abreviaturas

ACN	acetonitrila
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
bp	<i>base pair</i>
BSA	soroalbumina bovina
CBP	<i>CRE-binding proteins</i>
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato
cpm	cintilações por minuto
CRE	cAMP Response Element
D.O.	densidade ótica
dATP	desoxiadenosina trifosfato
DBD	<i>DNA-binding domain</i>
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GMPc	guanosina monofosfato cíclico
GTP	guanosina trifosfato
HEPES	ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-2-etanossulfônico
HSE	Heat Shock Element
IAA	iodoacetamida
IEF	<i>isoelectric focalization</i>
kb	kilobase
kDa	kilodalton
MALDI	ionização por Dessorção a Laser Auxiliada por Matriz
MM ou MW	Massa Molecular ou <i>Molecular Weight</i>
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pI	Ponto isoelétrico
PIPES	piperazina -1,4-bis(ácido 2-etanossulfônico)
PMSF	fluoreto de metilfenilssulfonil
SDS	dodecil sulfato de sódio
STRE	Stress Response Element
TCA	ácido tricloroacético
TFA	ácido trifluoracético
TIS	<i>transcription initiation site</i>
TLCK	N- <i>p</i> -tosil-L-lisina clorometilcetona
TOF	<i>time of fly</i>
UDP	uridina difosfato
UDPG	uridina difosfato glicose
UTR	<i>untranslated region</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

Resumo



As células eucarióticas são capazes de responder e de se adaptar a diferentes condições ambientais estressantes tais como o choque térmico, modulando sua atividade metabólica. Na levedura *Saccharomyces cerevisiae* o choque térmico é conhecido por induzir múltiplos genes relacionados a esta forma de estresse, através dos elementos transativadores Hsf1p (Heat Shock Protein) e Msn2/4p, os quais se ligam, respectivamente, às seqüências consensos HSE e STRE, ativando a transcrição. A seqüência nucleotídica do gene da glicogênio sintase (*gsn*) de *Neurospora crassa* foi previamente isolada em nosso laboratório e uma análise da expressão gênica mostrou que a transcrição do gene foi diminuída na situação de choque térmico (30 para 45°C). Uma análise da região 5' flanqueadora revelou a presença dos elementos de DNA CRE, HSE e STRE tanto na região promotora do gene quanto na 5'-UTR.

Neste trabalho, nós investigamos o envolvimento destes elementos de DNA na regulação da transcrição na condição de choque térmico, através de ensaios de mobilidade em gel (EMSA) usando como sondas, fragmentos de DNA contendo os elementos transcripcionais citados anteriormente. Para isto, foram utilizados como fonte de proteínas extratos nucleares brutos ou fracionados em coluna de Heparina-Sepharose, preparados a partir de micélios coletados antes e após choque térmico (amostras HS30). Os resultados obtidos mostraram a presença de proteínas capazes de reconhecer e ligar aos elementos de DNA testados sob a condição estressante analisada. A especificidade das bandas de mobilidade reduzida foi confirmada por diferentes ensaios de competição, tais como 1) adição prévia de sondas de DNA não marcadas antes da reação de ligação, 2) adição de oligonucleotídeo de DNA dupla fita contendo o elemento STRE do promotor *gsn* como competidor específico, 3) utilização de uma sonda de DNA contendo o elemento STRE do promotor *gsn* mutado e 4) utilização da sonda HSE não marcada como competidor num ensaio de competição cruzada com a sonda STRE do promotor *gsn*.

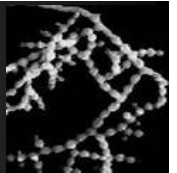
O envolvimento dos elementos regulatórios CRE na regulação da transcrição gênica foi analisado utilizando uma linhagem selvagem do fungo e duas linhagens mutantes na via de sinalização mediada por AMPc, uma apresentando alta atividade PKA (*mcb*) e outra incapaz de produzir AMPc, e portanto, apresentando baixa atividade PKA (*cr-1*). Os resultados obtidos após autoradiografia mostraram que em todas as linhagens analisadas existem proteínas nucleares capazes de reconhecer e ligar aos elementos CRE, indicando que todos os elementos analisados podem ser funcionais e que a regulação da expressão gênica pode envolver mecanismos dependentes de AMPc.

O papel da via de sinalização mediada por AMPc na modulação da expressão do gene *gsn* também foi estudado utilizando as linhagens mutantes de *N. crassa*. Ensaios de Northern blot utilizando RNA total das diferentes linhagens do fungo e EMSA utilizando como sonda o elemento STRE do promotor *gsn* e proteínas nucleares preparadas a partir das

diferentes linhagens do fungo mostraram que esta via de sinalização encontra-se envolvida na modulação da expressão gênica, tanto na presença quanto na ausência do estresse térmico.

Para a determinação das características bioquímicas das proteínas nucleares que ligam ao elemento STRE do promotor *gsn*, diferentes abordagens foram usadas, incluindo EMSA acoplado a hibridização por Southwestern, determinação das suas prováveis massas moleculares (MM) e prováveis pontos isoelétricos (pI), além de EMSA acoplado a análises proteômicas, tais como eletroforese bidimensional e espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF). O extrato nuclear bruto e as frações protéicas ativas isoladas por cromatografia de afinidade foram usados nos ensaios de Southwestern blot. A autoradiografia revelou a presença de proteínas com intervalo de MM entre 30 e 50 kDa, o qual foi posteriormente confirmado através de SDS-PAGE acoplado a EMSA. Os pIs das proteínas também foram estimados, utilizando focalização isoelétrica acoplada a EMSA. Os resultados mostraram a presença duas frações protéicas, apresentando intervalos distintos de pI (3,54 a 4,08 e 6,77 a 7,31), sugerindo a presença de pelo menos duas proteínas diferentes no extrato nuclear, capazes de reconhecer o elemento STRE do promotor *gsn*. Em outro tipo de experimento, as informações obtidas nos ensaios de MM e pI foram combinadas para isolar proteínas nucleares a partir de eletroforese bidimensional. As regiões contendo as proteínas de interesse foram removidas do gel, digeridas com tripsina e os peptídeos foram analisados por espectrometria de massas. Dentre as proteínas identificadas até o momento, algumas se mostraram alvos interessantes para estudos futuros devido à presença de domínios protéicos que permitem interações do tipo proteína-proteína e DNA-proteína.

Abstract



Eukaryotic cells respond and adapt to environmental stressing conditions such as heat shock, by modulating metabolic responses to counteract them. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* heat shock activates multiple stressing related genes by the *trans* acting elements Hsfp (Heat shock factors) and Msn2/4p, which bind to the *cis* regulatory elements HSE (Heat Shock Element) and STRE (Stress Responsive Element), respectively, and activates the gene transcription. We have previously isolated the gene encoding the *Neurospora crassa* glycogen synthase (*gsn*) and demonstrated that the gene transcription was decreased under heat shock (30 to 45°C). An analysis of the *gsn* 5' flanking region showed the presence of the DNA elements CRE, HSE, and STRE, in the promoter region and in the 5'-untranslated region.

In this work we investigated the involvement of these DNA elements in gene transcription regulation under heat shock condition by performing electrophoretic mobility shift assays (EMSA) using, as probes, DNA fragments containing the regulatory elements, and crude or Heparin-Sepharose fractionated nuclear extracts prepared from mycelia collected before and after 30 min of heat shock (HS30 sample). Our results showed the presence of nuclear proteins capable to recognize and bind to the DNA regulatory elements under heat stress. The specificity of the DNA shifts were confirmed by using 1) unlabelled DNA probes as specific competitor, 2) the *gsn* promoter STRE double-stranded oligonucleotide as specific competitor, 3) a mutated *gsn* promoter STRE probe, and 4) the HSE unlabelled probe in a cross-reaction competition assay with the *gsn* promoter STRE probe.

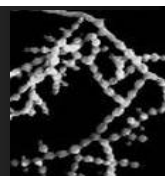
The involvement of the regulatory CRE elements in the modulation of the *gsn* gene transcription was investigated by using EMSA in the wild type strain, and also in two *N. crassa* mutant strains defective in the cAMP-signaling pathway: one having hyperactive PKA (*mcb*), and other unable to produce cAMP, and thus, having low PKA activity (*cr-1*). Autoradiographies showed the presence of nuclear proteins binding to the DNA probes for all nuclear extract tested, submitted or not to heat shock, indicating that the DNA elements are functional, and that the gene regulation may involve mechanisms dependent on the cAMP-signaling pathway.

We have also studied, in this work, the role of cAMP-signaling pathway in the *gsn* gene expression by using *N. crassa* mutant strains in this signaling pathway. Northern blot analysis of the mutant strains and EMSA using as probe the *gsn* promoter STRE and nuclear extracts prepared from the mutant strains showed that the cAMP pathway is involved in the modulation of *gsn* gene transcription both under stressing and non-stressing conditions.

To determine the biochemical characteristics of the nuclear proteins that bind to the *gsn* promoter STRE, we have performed different approaches including EMSA coupled with Southwestern hybridization, determination of the putative molecular weight (MW) and pI of the proteins candidates, and EMSA coupled with proteomic assays, such 2D gels and mass spectrometry (MALDI, TOF/TOF). The crude nuclear extract and the active fractions isolated

after Heparin-Sepharose affinity chromatography were used. By Southwestern assays, proteins with MW ranging from 30 to 50 kDa were detected. The MW range was further confirmed after analyzing, by EMSA, the SDS gel fraction corresponding to such MW interval. The proteins pIs were estimated by coupling IEF with EMSA, and the results showed the presence of proteins belonging to two different pIs intervals, one from 3.54 to 4.08 and the other from 6.77 to 7.31, suggesting the existence of at least two different proteins that recognize and bind the *gsn* promoter STRE. In another approach, the MW and pI informations were used to isolate the proteins existing in the selected region from 2D gels. The spots were sliced out from the gel, proteins were trypsin digested and the peptides were analyzed by mass spec. Among the proteins identified by mass spec, interesting targets could be selected to be further analyzed due to the presence of domains that allow interactions such as protein-protein and DNA-protein.

Introdução



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

O reino dos fungos possui aproximadamente 1,5 milhões de espécies, sendo a maioria delas filamentosas (HAWKSWORTH, 2001). Os fungos são provavelmente o grupo de organismos mais útil em termos biotecnológicos e são usados para sintetizar uma grande variedade de compostos economicamente importantes, como enzimas, antibióticos dentre outros. Estes microrganismos desempenharam papel muito importante no progresso da bioquímica, genética e biologia molecular quando BEADLE & TATUM (1941) definiram o papel de genes envolvidos no metabolismo celular do fungo *Neurospora crassa*, baseados na hipótese “um gene – uma enzima”. Estas descobertas permitiram com que *N. crassa* se tornasse um modelo experimental bastante popular na época para estudos bioquímicos, genéticos, fisiológicos e moleculares, não só pela sua facilidade de manipulação e desenvolvimento, como também pelo amplo conhecimento adquirido de sua genética e de seus sistemas bioquímicos.

N. crassa é um fungo filamentoso, cujos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos definidos são bem compreendidos. Pertence à classe dos *Eumycetes*, subclasse *Ascomyceta*, família *Sordariaceae*, subfamília *Sphaeriales* (ESSER & KUENEN, 1967). Conhecido vulgarmente nas padarias francesas como “bolor rosa do pão”, este fungo foi descrito inicialmente no século XVII como contaminante comum de pães e outras substâncias ricas em carboidratos. Tem nutrição simples e se desenvolve bem em meios de cultura contendo apenas alguns sais e uma fonte de carbono, sendo sua única exigência nutricional a biotina (DAVIS & SERRES, 1970). Por ser de caráter heterotrófico, pode utilizar diversas fontes de carbono, como glicose, acetato, succinato, glicerol, manose, frutose, maltose, celobiose, sacarose, oligo e polissacarídeos e aminoácidos. 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 9,0 (THEDEI JUNIOR; DOUBOWETZ; ROSSI, 1994). Trata-se de um aeróbio restrito, não patogênico, com um tempo de duplicação de aproximadamente 150 min.

Quando cultivado em condições adequadas de nitrogênio, é possível observarmos estruturas de propagação denominadas conídios. Estes conídios podem ser produzidos por duas vias distintas, a macroconidiação e a microconidiação. Ambas as vias requerem interface água-ar e são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos, as quais se encontram localizadas nas extremidades das hifas aéreas e permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Na microconidiação, os esporos mononucleados são formados dentro das

hifas basais e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa (PERKINS; TURNER; BARRY, 1976). As hifas vegetativas são multinucleadas e possuem crescimento polarizado e ramificação constante (GOW, 1994; TRINCI, 1984; TRINCI; WIEBE; ROBSON, 1994; TURNER & HARRIS, 1997). Estas hifas possuem septos (HARRIS, 2001), os quais permitem o movimento de organelas entre os compartimentos. A freqüente fusão entre estas hifas produz uma rede complexa denominada micélio (HICKEY *et al.*, 2002) e promove a formação de heterocários onde múltiplos genomas podem contribuir para o metabolismo de um único micélio. As hifas aéreas são diferenciadas a partir das vegetativas em resposta à privação de nutrientes, dessecação e outras formas de estresse, formando uma cadeia de esporos assexuais multinucleados (macroconídios) para dispersão (SPRINGER & YANOFISKY, 1989). Outro tipo de esporos, assexuados e mononucleados (microconídios), também pode ser diferenciado diretamente de hifas vegetativas ou então, de microconidióforos (BISTIS; PERKINS; READ, 2003; MAHESHWARI, 1999; SPRINGER & YANOFISKY, 1989).

O ciclo de vida de *N. crassa* (Figura 1) compreende duas fases: vegetativa, onde aparecem as estruturas destinadas à propagação do fungo (conídios) e a sexual de reprodução, onde é possível verificar a presença dos corpos de frutificação. Sendo um fungo heterotático, *N. crassa* possui dois tipos de indivíduos sexualmente compatíveis, designados **A** e **a**. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto o outro pode se comportar como “macho” (doador de núcleos) ou “fêmea” (receptora de núcleos, denominada de protoperitécio) (FINCHAN; DAY; RADFORD, 1979).

Durante a fase vegetativa de crescimento do fungo, o micélio é composto por hifas de núcleos haplóides e a reprodução se faz por macroconídios e microconídios. A fase sexual acontece quando dois micélios de tipos opostos crescem juntos (A e a), sob condições limitantes de nitrogênio. Em resposta à privação deste nitrogênio, são originados corpos de frutificação (protoperitécios), adotados convencionalmente como órgãos reprodutores femininos. O protoperitécio consiste de uma ascogônia e a partir desta, hifas especializadas chamadas tricógino projetam-se em direção ao ar. A fertilização ocorre quando uma célula de tipo de acasalamento oposto, que pode ser um macroconídio, microconídio ou até mesmo um pequeno pedaço de micélio, entra em contato com o tricógino. Quando o contato acontece, ocorre plasmogamia e um ou mais núcleos da célula fertilizante migrarão através do tricógino até atingir a ascogônia. Nesse estágio ainda não ocorre fusão nuclear, mas apenas uma associação de núcleos aos pares, que começam a se dividir sincronicamente. O produto destas divisões resulta na formação de numerosas hifas ascógenas, que passam a crescer para fora da ascogônia. Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia

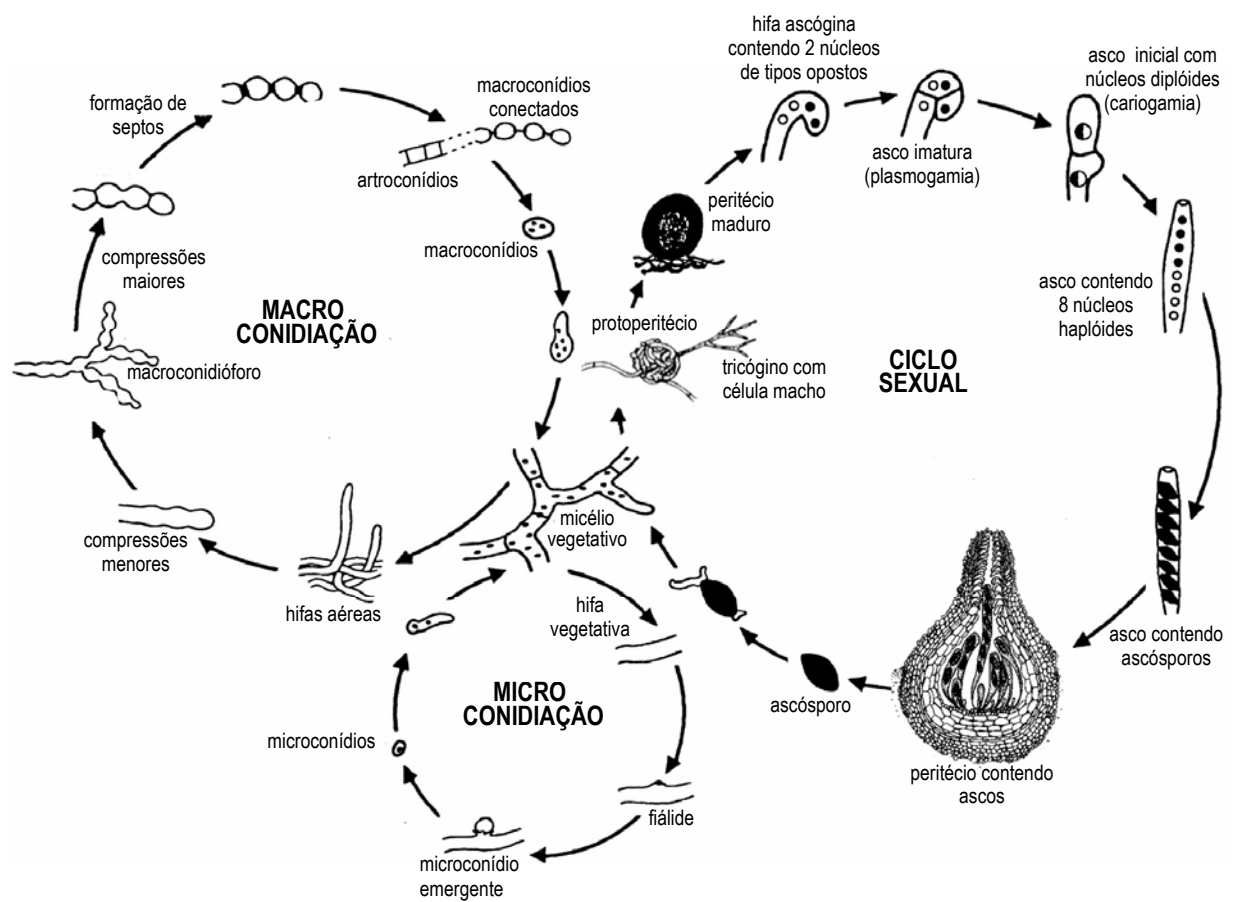


Figura 1. Ciclo de vida de *Neurospora*. (BORKOVICH *et al.*, 2004).

começa a desenvolver uma espécie de parede, que vai abrigar as hifas ascógenas recém formadas originando uma estrutura denominada peritécio maduro. Os núcleos de tipos opostos localizados na extremidade da hifa ascógena começam a se dividir, há formação de septos nesta região da hifa, com uma célula central contendo dois núcleos de tipos opostos, a qual é denominado asco inicial. Após a formação do asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haplóides. Estes quatro núcleos haplóides sofrem agora mitose, originando oito núcleos dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada tipo de acasalamento (A e a). Esses núcleos originarão esporos (ascósporos), que sob eventuais circunstâncias germinarão originando novo micélio (FINCHAN; DAY; RADFORD, 1979).

N. crassa possui um genoma haplóide de aproximadamente $3,7 \times 10^7$ bp (KRUMLAUF & MARZLUF, 1979). Recentemente, sua seqüência genômica foi determinada e se encontra totalmente anotada, trazendo importantes informações bioquímicas e genéticas (GALAGAN *et al.*, 2003; MANNHAUPT *et al.*, 2003). Seu genoma é organizado em 7 cromossomos, variando de 4 a 10 Mb (SCHULTE *et al.*, 2002), num total de aproximadamente 41 Mb, confirmando as estimativas de KRUMLAUF & MARZLUF (1979). Cerca de 10.000 ORFs foram identificadas, sendo este número 25% menor que o número de genes deduzidos para *Drosophila melanogaster* e 40% maior que o deduzido para *Saccharomyces cerevisiae*. Enquanto 41% das proteínas analisadas estão relacionadas com proteínas conhecidas, 30% são consideradas proteínas hipotéticas sem semelhanças com proteínas depositadas em bancos de dados (SCHULTE *et al.*, 2002), o que traduz o pouco conhecimento do genoma dos fungos. Aproximadamente 14% das proteínas anotadas apresentaram grau de identidade com proteínas de plantas e animais, revelando semelhanças biológicas entre fungos filamentosos e eucariotos superiores. Muitas proteínas preditas em *N. crassa* não possuem ortólogos nas leveduras *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, mas são semelhantes às proteínas em animais, plantas e outros fungos filamentosos (BORKOVICH *et al.*, 2004), o que sugere que este organismo seja um modelo de estudos melhor que o de leveduras para eucariotos superiores em muitos aspectos de biologia celular, considerando-se o fato de serem organismos multicelulares. Além disso, *N. crassa* possui numerosas proteínas que são preditas nas leveduras mencionadas, mas que se correlacionam melhor com as proteínas de animais ou de plantas (OSIEWACZ, 2002; BORKOVICH *et al.*, 2004). Na verdade, sua multicelularidade já tem contribuído bastante para elucidar processos celulares tais como o sistema de defesa de genomas, transporte de proteínas mitocondriais, reparo e metilação de DNA, silenciamento gênico (DAVIS, 2000), além de processos de diferenciação celular (DAVIS & PERKINS, 2002). Juntas, estas informações reforçam o quão promissor é o modelo de estudo *N. crassa* no que se refere a elucidar mecanismos bioquímicos e genéticos ainda desconhecidos.

2. Uma visão geral sobre o metabolismo do glicogênio

O glicogênio é a principal forma de armazenamento de carboidratos em diferentes tipos de células e sempre que necessário é degradado para a produção de energia. Trata-se de um polissacarídeo em que os resíduos de glicose estão unidos covalentemente por ligações glicosídicas α -1,4 lineares e ligações α -1,6 responsáveis pela ramificação da molécula. Sua síntese é bem conservada em eucariotos e envolve as mesmas enzimas, desde leveduras até humanos. São três as proteínas envolvidas na biossíntese deste polissacarídeo: (1) a *glicogênio sintase*, que catalisa as ligações α -1,4 lineares da molécula de glicogênio, através da transferência de resíduos de UDP-glicose (UDPG) à extremidade não redutora da molécula em crescimento (LELOIR, 1971); (2) a *glicosil-(4 $\rightarrow$ 6)-transferase*, que catalisa a formação das ligações ramificadas α -1,6 da molécula de glicogênio e (3) a *glicogenina*, uma proteína auto-glicosilável que funciona como um *primer* para o início da biossíntese do glicogênio (ALONSO *et al.*, 1995).

A síntese do glicogênio tem início com a produção de glicose-6-P (G6P) (Figura 2). A glicose é o nutriente preferido por muitos organismos e sua captação e utilização são processos bastante regulados. Uma vez dentro da célula, a glicose é convertida em G6P, numa reação catalisada pela hexoquinase. A G6P pode sofrer glicólise para produção de energia via fermentação ou oxidação, também pode seguir para o ciclo das pentoses para produção de pentoses e equivalentes redutores (NADPH), ou então, ser convertida em glicogênio e servir como reserva de unidades de glicose. Na síntese do glicogênio, G6P é primeiramente transformada em glicose-1-P (G1P) pela enzima fosfoglicomutase, a qual vai servir como substrato para a produção de UDPG ou ADPG (em bactérias) pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. Esta etapa é limitante na produção de glicogênio, uma vez que as moléculas de nucleotídeos glicosilados são as doadoras diretas de resíduos de glicose para que a enzima glicogênio sintase adicione resíduos de glicose à extremidade não redutora da cadeia polissacarídica em crescimento.

Um dos pré-requisitos para a glicogênio sintase alongar a molécula de glicogênio é a presença de um oligossacarídeo contendo pelo menos oito resíduos de glicose, o qual é fornecido pela glicogenina autoglicosilada em seus resíduos de tirosina. As ligações glicosídicas do tipo (α 1 $\rightarrow$ 6), responsáveis pela ramificação da molécula de glicogênio são catalisadas pela glicosil-(α 1 $\rightarrow$ 6)-transferase. Esta enzima transfere um fragmento terminal de seis a sete resíduos de glicose da extremidade não redutora da molécula nascente, criando ramificações importantes na molécula do polissacarídeo, pois, além de tornarem o polissacarídeo mais compacto e solúvel, também aumentam o número de extremidades não redutoras na molécula, favorecendo o acesso da glicogênio sintase e glicogênio fosforilase, que agem apenas sobre as extremidades não redutoras. A degradação da molécula de

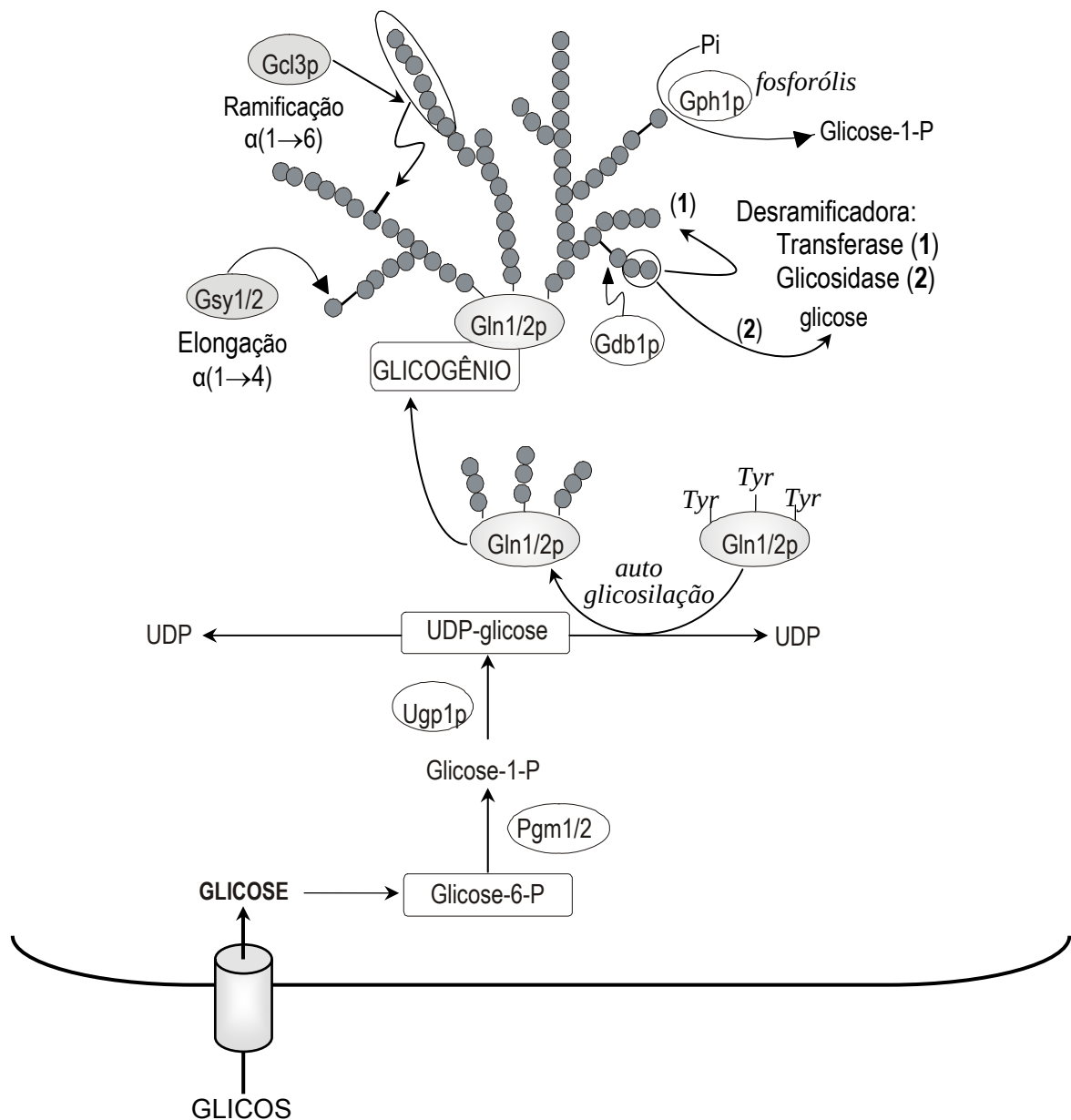


Figura 2. Via metabólica do glicogênio em *Saccharomyces cerevisiae*. As moléculas de glicose são transferidas para as moléculas de UDP originando UDPG, através de reações catalisadas pela fosfoglicomutase (*Pgm1/2p*) e UDPG-glicofosforilase (*Ugp1p*). A síntese do glicogênio começa com a autoglicosilação da glicogenina (*Gln1/2p*) em seus resíduos Tyr, produzindo uma cadeia $\alpha(1,4)$ -glicosil a qual sofre elongação pela glicogênio sintase (*Gsy1/2p*). As cadeias são ramificadas pela enzima ramificadora (*Glc3p*), que transfere um conjunto de 6-8 resíduos de glicose da extremidade de uma cadeia linear crescente para um resíduo glicosil interno e cria uma ligação ramificada $\alpha(1,6)$. A degradação do glicogênio ocorre pela ação combinada da glicogênio fosforilase (*Gph1p*), a qual libera G1P, e a enzima desramificadora (*Gdb1p*), a qual transfere um resíduo maltosil à extremidade de uma cadeia linear $\alpha(1,4)$ adjacente e libera glicose através da clivagem das ligações $\alpha(1,6)$ remanescentes (FRANÇOIS & PARROU, 2001).

glicogênio é catalisada pela enzima glicogênio fosforilase, onde as ligações glicosídicas ($\alpha 1 \rightarrow 4$) unindo dois resíduos de glicose no glicogênio são atacadas por fosfato inorgânico em uma reação de fosforólise, e um resíduo terminal de glicose é removido da molécula como α -D-G1P. Ela age repetitivamente sobre as extremidades não redutoras das ramificações da molécula de glicogênio até que restem apenas quatro resíduos de glicose distantes do ponto de ramificação. A etapa restante da degradação é controlada pela enzima oligo (1,6) $\rightarrow$ (1,4) glicotransferase (ou enzima desramificadora) que catalisa duas reações sucessivas: 1) transferência de três dos quatro resíduos de glicose restantes da ação da glicogênio fosforilase para a cadeia linear mais próxima através de sua atividade transferase, e 2) remoção do resíduo de glicose $\alpha(1 \rightarrow 6)$, 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 pela enzima fosfoglicomutase. No músculo esquelético, as moléculas de glicose resultantes da degradação do glicogênio sofrem glicólise para a produção de ATP enquanto que nas células hepáticas, a degradação do glicogênio tem como principal papel manter a concentração de glicose livre no sangue (NELSON & COX, 2000).

Nos microrganismos, as variações no conteúdo celular de glicogênio em resposta a diferentes situações ambientais indicam que seu metabolismo é controlado por um sistema regulatório complexo. Diversos trabalhos relatam importantes variações no conteúdo de glicogênio em *Saccharomyces cerevisiae*. Foi visto que durante a situação de crescimento vegetativo, as células de leveduras acumulam glicogênio quando a cultura inicia sua fase de crescimento estacionário (THEVELEIN, 1984; FRANÇOIS; NEVES; HERS, 1991). Outros exemplos de situações onde células de *S. cerevisiae* acumulam glicogênio incluem a exposição de uma cultura de levedura ao choque térmico (NI & LAPORTE, 1995), crescimento sob limitação de nutrientes (LILLIE & PRINGLE, 1980) e indução à esporulação e germinação de esporos (THEVELEIN, 1984; COLONNA & MAGEE, 1978; KANE & ROTH, 1974).

No fungo *N. crassa*, organismo aonde o metabolismo do glicogênio vem sendo estudado de maneira detalhada em nosso laboratório, NOVENTA-JORDÃO *et al.* (1996) e DE PAULA *et al.* (2002) mostraram que durante a situação de crescimento vegetativo do fungo, o glicogênio é acumulado nas células no final da fase exponencial de crescimento e que o mesmo é degradado quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento. Entretanto, células do fungo submetidas a diferentes condições de cultivo também apresentam variações no conteúdo de glicogênio. Em situações como a indução de uma cultura do fungo a conidiação, os níveis de glicogênio apresentam-se drasticamente reduzidos (DE PAULA *et al.*, 2002). Quando submetidas a uma situação adversa como choque térmico, as células de *N. crassa* mostraram degradar glicogênio e acumular trealose, sendo que exatamente o oposto

é observado quando as células são re-incubadas na temperatura fisiológica de crescimento (NOVENTA-JORDÃO *et al.*, 1996; DE PAULA *et al.*, 2002). Já em situações adversas como privação de fontes de carbono, os níveis de glicogênio e trealose das células encontram-se reduzidos, mas podem ser restabelecidos após a adição de glicose ao meio de cultura (DE PINHO *et al.* 2000; DE PAULA *et al.*, 2002).

3. Regulação do metabolismo do glicogênio. Aspectos moleculares e regulatórios da enzima glicogênio sintase

A síntese e a degradação do glicogênio em eucariotos são processos metabólicos regulados, nos quais as enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase constituem respectivamente, os principais sítios de regulação. Logo, as condições fisiológicas associadas com os níveis de acúmulo ou degradação de glicogênio estão correlacionadas com alterações rápidas e reversíveis nas atividades das enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase (FRANÇOIS; VILLANUEVA; HERS, 1988).

Várias seqüências nucleotídicas codificando para a enzima glicogênio sintase em diferentes organismos já foram descritas. A partir de células de mamíferos foram isolados o gene que codifica para a enzima de músculo humano (ORHO *et al.*, 1995) e cDNAs de diferentes tecidos tais como, fígado humano (NUTTAL *et al.*, 1994), músculo humano (BROWNER *et al.*, 1989), músculo de coelho (ZHANG *et al.*, 1989), fígado de coelho (WANG *et al.*, 1986) e fígado de rato (BAI *et al.*, 1990). Em microrganismos eucariotos já foram descritos os genes de *Saccharomyces cerevisiae* (FARKAS *et al.*, 1990 e 1991), *Neurospora crassa* (DE PAULA *et al.*, 2002) e *Dictyostelium discoides* (WILLIAMSON *et al.*, 1996), e em procariotos foram descritos os genes para *Escherichia coli* (KUMAR; LARSEN; PREISS, 1986) e *Salmonella typhimurium* (LEUNG & PREISS, 1987). Atualmente, com o advento da era genômica, várias seqüências nucleotídicas relacionadas à enzima glicogênio sintase, tanto de procariotos como de eucariotos encontram-se depositadas em bancos de dados.

Comparações estabelecidas entre as seqüências polipeptídicas das diferentes enzimas glicogênio sintase permitiram estabelecer paralelos entre as espécies eucarióticas. O grau de identidade estabelecido entre os aminoácidos da enzima da musculatura esquelética humana e a de coelho é de 97%, enquanto que entre fígado de rato e músculo esquelético humano é de apenas 70%. Já as enzimas sintases de fígado e músculo esquelético humano apresentaram uma identidade de 69% (BAI *et al.*, 1990; BROWNER *et al.*, 1989; ZHANG *et al.*, 1989; NUTTALL *et al.*, 1994). Na levedura *S. cerevisiae*, dois genes (*GSY1* e *GSY2*) codificando para duas isoformas da enzima glicogênio sintase foram

descritos. Ambas as isoformas são proteínas nutricionalmente reguladas, sendo que a isoforma codificada pelo gene *GSY2* é a forma predominante da enzima (FARKAS *et al.*, 1990 e 1991; UNNIKRISHNAN *et al.*, 2003). O gene *GSY1* codifica uma proteína (Gsy1p) com 707 aminoácidos e o gene *GSY 2* codifica a proteína Gsy2p com 704 aminoácidos (FARKAS *et al.*, 1991). *N. crassa* possui apenas um cDNA (*gsn*) codificando uma enzima com atividade glicogênio sintase com 706 aminoácidos e massa molecular de 80,9 kDa (DE PAULA *et al.*, 2002). Um alinhamento de seqüências revelou que a enzima de *N. crassa* apresenta 66% e 67% de identidade, respectivamente, com as enzimas Gsy1p e Gsy2p de *S. cerevisiae*, e 57% e 54% de identidade com as enzimas glicogênio sintases de músculo de coelho e fígado humano, respectivamente (DE PAULA *et al.*, 2002).

A glicogênio sintase bacteriana não apresenta identidade com as enzimas sintases das células eucarióticas. Uma comparação estabelecida entre a seqüência de aminoácidos da proteína humana e da proteína responsável pela atividade glicogênio sintase em bactérias (KUMAR; LARSEN; PREISS, 1986; LEUNG & PREISS, 1986) não apresentaram semelhanças quanto à estrutura primária da proteína. Bactérias estocam carboidratos na forma de glicogênio, o qual é sintetizado numa reação análoga à catalisada pela enzima de eucariotos. Contudo, a enzima bacteriana contendo atividade sintase difere da enzima de eucariotos em seus substratos fornecedores de glicose ativada. Enquanto a enzima de eucariotos requer como fornecedor de glicose o nucleotídeo UDPG, a sintase bacteriana requer ADP-glicose (ADPG) como substrato (PREISS & ROMEO, 1994). Além disso, a enzima bacteriana não é sujeita à regulação pós-traducional por alosterismo e por modificações covalentes, mecanismos regulatórios existentes nas enzimas de eucariotos. Foi demonstrado que a enzima de *E. coli*, não apresenta sítios de ligação para o modulador alostérico G6P, característico das enzimas glicogênio sintase de eucariotos, mas possui em sua estrutura primária um resíduo de lisina (Lys17), próximo ao N-terminal da molécula, o qual se encontra relacionado com a ligação do substrato ADPG (FURUKAWA *et al.*, 1990). Este aminoácido faz parte da seqüência KTGG, semelhante à seqüência localizada ao redor da Lys38 das enzimas de músculo humano e de coelho, cuja seqüência é KVGG, e responsável pela ligação do nucleotídeo glicosilado UDPG (TAGAYA; NAKANO; FUKUI, 1985; MAHRENHOLZ; WANG; ROACH, 1988).

A enzima glicogênio sintase pode sofrer controle pós-traducional, via fosforilação multi-sítios através da ação de enzimas quinases e também modulação alostérica, através do ligante G6P (HUANG & CABIB, 1974; PENG; TRUMBLY; REIMANN, 1990). Sendo assim, duas formas da enzima glicogênio sintase, uma forma fosforilada (ou menos ativa) e uma forma desfosforilada (ou ativa), foram purificadas e caracterizadas (HUANG & CABIB, 1974; PENG; TRUMBLY; REIMANN, 1990). Estas formas podem ser distinguidas através de suas atividades na presença ou ausência de G6P. A fosforilação geralmente causa redução na

atividade enzimática, efeito que é revertido quando na presença de G6P. Enquanto a forma fosforilada é dependente de G6P e por este motivo, também chamada de forma **D** (dependente) ou **b**, a forma desfosforilada é independente de G6P e conhecida como forma **I** (independente) ou **a**. A glicogênio sintase é ativada da sua forma **D** para sua forma **I**, pela ação da enzima fosfatase, enquanto que as enzimas quinases são responsáveis por sua fosforilação e, portanto, inativação. Além da modulação por G6P, a glicogênio sintase também pode ter atividade alterada na presença dos inibidores ATP, UDP, fosfato inorgânico e outros intermediários metabólicos. As formas fosforiladas são mais susceptíveis ao efeito destes inibidores do que as formas desfosforiladas tanto que, *in vivo*, estes inibidores opõem-se efetivamente à ativação da forma fosforilada por G6P (PIRAS; ROTHMAN; CABIB, 1968).

As enzimas glicogênio sintase possuem diversos sítios de fosforilação, os quais funcionam como potentes alvos para as enzimas quinases. Alinhamento de seqüências entre diferentes enzimas glicogênio sintases mostraram que a região central da proteína é conservada e que as regiões N-terminais e C-terminais são as regiões variáveis, envolvidas no controle da enzima por fosforilação. A sintase de músculo de coelho é a enzima melhor caracterizada com pelo menos dois sítios de fosforilação na extremidade N-terminal e sete na extremidade C-terminal, num total de nove sítios de fosforilação (ROACH, 1990) designados 1a, 1b, 2, 2a, 3a, 3b, 3c, 4 e 5. Enquanto os sítios 2 e 2a encontram-se na extremidade N-terminal da molécula, a região C-terminal abriga um importante domínio regulatório, contendo os sítios de fosforilação restantes. A fosforilação dos sítios das regiões N- e C-terminais ocorre de maneira hierárquica na enzima, em ambas as extremidades. Na região N-terminal, o sítio 2a somente é fosforilado pela enzima caseína quinase I (CKI) após a formação do sítio de reconhecimento -S(P)-XX-S- (FLOTOW *et al.*, 1990), o qual é dado pela fosforilação prévia do sítio 2 por diferentes proteínas quinases (HUANG & KREBS, 1977; ROACH; DEPAOLI-ROACH; LARNER, 1978; CARLING & HARDIE, 1989). Na região C-terminal, a GSK3 fosforila seqüencialmente os sítios 4, 3c, 3b e 3a (PICTON *et al.*, 1980), sendo sua ação enzimática dependente da formação prévia do sítio de reconhecimento -S-X-X-X-S(P)- através da fosforilação do sítio 5 pela caseína quinase II (CKII) (FIOL *et al.*, 1987). SKURAT; WANG; ROACH (1994) mostraram que os sítios 2, 2a, 3a e 3b são os que mais contribuem para inativação da enzima por mecanismos de fosforilação e que os sítios 3a e 3b podem ser fosforilados em células COS por mecanismos independentes da fosforilação prévia do sítio 5, sem a participação da dupla GSK3/CKII.

Recentemente, outras proteínas quinases envolvidas no controle da atividade glicogênio sintase foram identificadas. SKURAT & DIETRICH (2004) abordaram um novo mecanismo de regulação após terem isolado um complexo protéico com atividade quinase atuando diretamente sobre o sítio 3a da enzima glicogênio sintase de músculo de coelho.

Este complexo é formado por duas proteínas, sendo uma delas (HAN11) de função ainda desconhecida e a outra (DYRK1A), uma representante da família DYRK tirosina quinase. WILSON *et al.* (2005) mostraram que a glicogênio sintase de músculo de coelho interage *in vivo* e é fosforilada pela forma recombinante da proteína quinase humana PASK. A PASK é uma proteína Ser/Thr quinase, pertencente à família de proteínas quinases que se caracterizam pela presença de um domínio regulatório sensível a nutrientes e moléculas pequenas, conhecido como domínio PAS. Ortólogos desta família de proteínas quinases já foram encontrados em moscas, ratos, leveduras e humanos (RUTTER; PROBST; MCKNIGHT, 2002; RUTTER *et al.*, 2001; HOFER *et al.*, 2001). Em *S. cerevisiae* foram encontrados dois genes codificando proteínas quinases com domínio PAS, denominados *PSK1* e *PSK2*. Células de leveduras apresentando os genes *PSK1* e *PSK2* defectivos caracterizam-se por acumular 5 a 10 vezes mais glicogênio que as células selvagens, devido a uma alta atividade glicogênio sintase *in vivo* (RUTTER; PROBST; MCKNIGHT, 2002).

Na verdade, o mecanismo de fosforilação da enzima glicogênio sintase pelas proteínas quinases através dos seus aminoácidos Ser e Thr é bastante complexo e envolve numerosas outras proteínas quinases, as quais também são importantes no controle da atividade enzimática *in vitro*. Entre elas, podemos destacar: 1) proteínas quinases dependentes de AMPc ou GMPc; 2) proteínas quinases estimuladas por cálcio, 3) proteínas quinases independentes de cálcio e AMPc (WANG *et al.*, 1986) e 4) proteínas quinases dependentes de ciclinas, em leveduras (HUANG; FARKAS; ROACH, 1996; HUANG *et al.*, 1998).

Comparada a glicogênio sintase de músculo de coelho, a isoforma Gsy2p de *S. cerevisiae* apresenta apenas três dos sítios de fosforilação C-terminais, sendo conservados somente os sítios 3a e 3b. Após a identificação dos três resíduos de aminoácidos que sofrem fosforilação (Ser650, Ser654 e Thr667) em leveduras, ensaios de mutagênese sítio-dirigida revelaram que somente os resíduos Ser650 e Ser654, os quais correspondem respectivamente aos sítios 3a e 3b na enzima de coelho, estão envolvidos na regulação da atividade da Gsy2p *in vivo* (HARDY & ROACH, 1993). A proteína quinase dependente de AMPc (PKA) mostrou estar envolvida no controle do estado de fosforilação da Gsy2p *in vivo* (HARDY & ROACH, 1993; FRANÇOIS; VILLANUEVA; HERS, 1988; HARDY; HUANG; ROCH, 1994), embora resultados *in vitro* tenham demonstrado que nenhum dos três sítios de fosforilação da Gsy2p são fosforilados pela PKA, indicando uma participação indireta desta quinase no controle da fosforilação da sintase.

Em *N. crassa*, DE PAULA *et al.* (2002) deduziram por alinhamento de seqüências que os resíduos Ser631, Ser635 e Thr644 da glicogênio sintase podem corresponder, respectivamente, aos sítios 3a, 3b e 4 das enzimas de mamíferos. Entretanto, os resíduos de aminoácidos modificados por fosforilação ainda não foram determinados na enzima do fungo.

Os sítios 2 e 2a presentes na região N-terminal, assim como o sítio 1 da região C-terminal presentes nas enzimas de músculo de coelho (ZHANG *et al.*, 1989) e de fígado humano (NUTTALL *et al.*, 1994), estão ausentes na isoforma Gsy2p de *S. cerevisiae* (FARKAS *et al.*, 1991) e provavelmente, na enzima de *N. crassa* (DE PAULA *et al.*, 2002).

Em *S. cerevisiae*, existem diversos estudos confirmando a participação da via de sinalização do AMPc no controle da fosforilação da Gsy2p *in vivo*. CAMERON *et al.* (1988) relataram que células de levedura deficientes na subunidade regulatória da PKA (mutantes *bcy*) mostraram-se incapazes de responder a processos como esporulação, resistência ao choque térmico e acúmulo de glicogênio. Entretanto, quando os alelos *TPK* codificando a subunidade catalítica da PKA foram deletados nestas células (mutantes *bcy tpk^w*), estes fenótipos foram completamente suprimidos sugerindo a existência de uma via para o controle destas respostas nas leveduras independente de AMPc. CANNON; GITAN; TATCHELL (1990) mostraram que a incapacidade de acumular glicogênio nos mutantes *bcy* era devido ao estado de hiperfosforilação da proteína Gsy2p nestas células. Por outro lado, células de levedura mutantes *ras2* apresentaram um hiperacúmulo de glicogênio no início da fase estacionária de crescimento, o qual pode ser atribuído a uma redução global na taxa de fosforilação dependente de AMPc nestas células (FERNÁNDEZ-BAÑARES *et al.*, 1991). As proteínas Ras são proteínas que ligam nucleotídeos GTP e podem ser ativadas tanto por estímulos nutricionais quanto estressantes (BROACH & DESCHENES, 1990; ENGELBERT *et al.*, 1994). Estas proteínas ativam a adenilil ciclase resultando em altos níveis de AMPc intracelular e conseqüentemente, alta atividade PKA (TODA *et al.*, 1985).

Na Figura 3 estão representados os principais mecanismos bioquímicos que participam na regulação do metabolismo de glicogênio em *S. cerevisiae*. Além da PKA, outras proteínas quinases mostraram-se importantes na regulação do carboidrato. Estudos sistemáticos realizados com o objetivo de identificar proteínas quinases envolvidas na fosforilação da glicogênio sintase em células de levedura levaram à descoberta da proteína quinase Pho85p (HUANG; FARKAS; ROACH, 1996). A Pho85p é uma quinase dependente de ciclinas, envolvida tanto no ciclo celular quanto no controle do metabolismo (JOHNSTON & CARLSON, 1992), cujas funções dependem exclusivamente das ciclinas parceiras com as quais ela interage (MEASDAY *et al.*, 1997). Inicialmente, duas ciclinas (Pcl8p e Pcl10p) envolvidas juntamente com a Pho85p no controle do metabolismo de glicogênio em leveduras foram identificadas (HUANG *et al.*, 1998). O complexo Pho85p/Pcl10p mostrou ser capaz de fosforilar diretamente a Gsy2p nos resíduos Ser654 e Thr667 (WILSON; MAHRENHOLZ; ROACH, 1999). Estudos envolvendo a Pho85p e suas ciclinas parceiras mostraram que as ciclinas Pcl6p e Pcl7p, cujos papéis ainda não são bem estabelecidos na célula, também estão envolvidas no controle do acúmulo de glicogênio via Pho85p, uma vez que mutantes *pcl8 pcl10*, os quais são incapazes de acumular glicogênio, tem seu fenótipo selvagem para

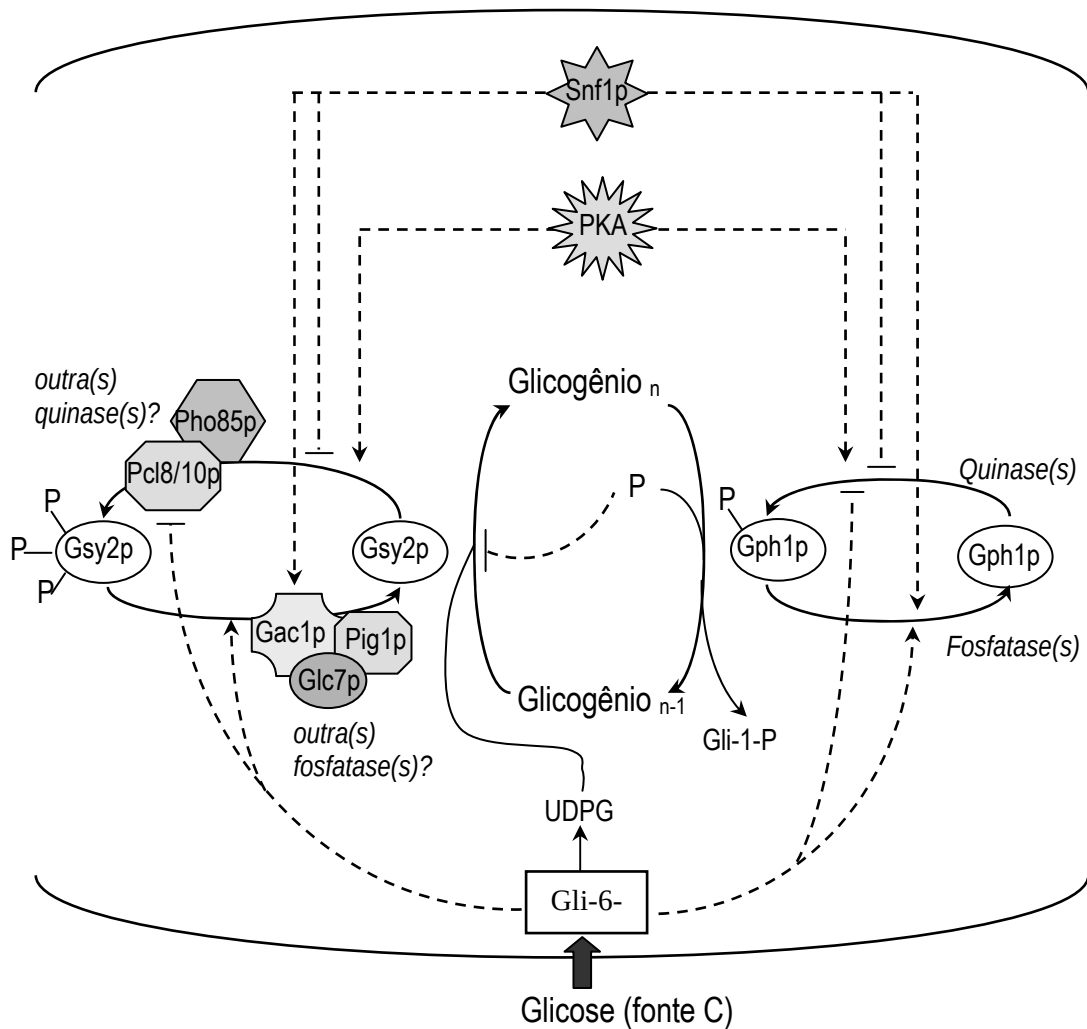


Figura 3 Controle bioquímico do metabolismo do glicogênio em *Saccharomyces cerevisiae*. PKA e Snf1p controlam antagonicamente o estado de fosforilação da Gsy2p e Gph1p. A proteína Pho85p, associada às ciclinas Pcl8p e Pcl10p, fosforila e inativa a Gsy2p. Uma ação contrária é catalisada pela fosfatase Glc7p e suas subunidades Gac1p e Pig1p. Proteínas quinases e fosfatases que controlam o estado de fosforilação da Gph1p ainda não foram identificadas. O principal efetor deste processo é a G6P, a qual age como um potente estimulador da desfosforilação e inibidor do processo de fosforilação. Pi também é outro efector importante no controle do glicogênio, agindo como substrato da Gph1p e inibidor da glicogênio sintase. As setas indicam as interações positivas, as barras as interações negativas e as linhas tracejadas, as interações diretas ainda não determinadas (FRANÇOIS & PARROU, 2001).

acúmulo de glicogênio restaurado quando os genes *PCL6* e *PCL7* são deletados (WANG *et al.*, 2001b).

Outra proteína quinase que mostrou ser importante para o acúmulo de glicogênio em células de levedura foi a Snf1p. A Snf1p é uma proteína quinase ortóloga à proteína quinase dependente de AMP (AMPK) de mamíferos (CARLING & HARDIE, 1989; CARLING *et al.*, 1994; MITCHELHILL *et al.*, 1994), a qual é requerida para a expressão de genes que codificam enzimas necessárias para o metabolismo de fontes de carbono alternativas, tais como glicerol e galactose. Esta quinase parece controlar de maneira indireta e positiva o metabolismo do glicogênio, provavelmente devido à regulação do estado de fosforilação da isoforma Gsy2p, uma vez que células mutantes *snf1*, as quais se caracterizam por não acumular glicogênio (THOMPSON-JAEGER *et al.*, 1991), quando transformadas com a forma truncada da enzima Gsy2p (ausência da extremidade C-terminal) são capazes de restaurar o acúmulo de glicogênio (HARDY; HUANG; ROCH, 1994).

O gene *PHO85* foi identificado quando HUANG; FARKAS; ROACH (1996) rastrearam a linhagem de levedura mutante *snf1* em busca da supressão do fenótipo de acúmulo de glicogênio defeutivo. Células mutantes *pho85* apresentaram uma alta atividade glicogênio sintase acompanhada de um hiperacúmulo de glicogênio, enquanto que mutantes *snf1 pho85* foram capazes de suprimir o acúmulo de glicogênio defeutivo apresentado pelas células mutantes *snf1*, indicando que Snf1p e Pho85p agem antagonicamente com relação ao acúmulo de glicogênio nas leveduras. Através de estudos de epistasia, foi mostrado que estas quinases podem fazer parte de uma mesma via, onde a Snf1p estaria regulando negativamente a Pho85p na mesma via ou então, em uma via distinta. No entanto, células mutantes *snf1 pcl8 pcl10* foram capazes de recuperar a atividade glicogênio sintase sem restaurar o acúmulo de glicogênio, sugerindo outras maneiras de controlar a atividade Snf1p independente da Pho85p (HUANG *et al.*, 1998; WANG *et al.*, 2001a). Outras proteínas quinases ainda desconhecidas, também se mostraram importantes para a regulação do metabolismo glicogênio. Quando células haplóides de *S. cerevisiae* MATa são tratadas com o fator α a síntese de glicogênio diminui devido a uma redução na atividade da enzima glicogênio sintase, a qual é causada por eventos de fosforilação, através de uma proteína quinase desconhecida, em sítios específicos da enzima (FRANÇOIS *et al.*, 1991).

4. Controle transcricional da enzima glicogênio sintase

Além dos mecanismos pós-traducionais envolvidos na regulação da enzima glicogênio sintase, o metabolismo de glicogênio também pode ser regulado por eventos transcricionais

em diferentes situações ambientais. Este aspecto tem sido extensivamente estudado nas isoformas Gsy1p e Gsy2p de *S. cerevisiae*. Os níveis destas proteínas, assim como o acúmulo de glicogênio nas leveduras mostraram-se alterados em diferentes condições estressantes, tais como a indução da cultura ao crescimento estacionário, limitação de nutrientes como a depleção de fonte de nitrogênio e choque térmico (BECKER; VOHMANN; KÖNIG-EILERS, 1979; FRANÇOIS; VILLANUEVA; HERS, 1988; LILLIE & PRINGLE, 1980; ROTHMAN-DENES & CABIB, 1970; NI & LAPORTE, 1995; UNNIKRISHNAN *et al.*, 2003). NI & LAPORTE (1995) mostraram uma indução na atividade β -galactosidase quando uma cultura de células de levedura, transformada com uma construção plasmidial contendo o promotor GSY2 fusionado ao gene repórter *lacZ*, foi submetida a um aumento de temperatura de 23 para 37°C. Além disso, ensaios de deleção realizados para identificar quais regiões do promotor GSY2 estariam relacionados com esta regulação, revelaram o envolvimento de três regiões, sendo que em duas delas foram encontradas seqüências nucleotídicas características dos elementos de transcrição STRE.

As seqüências STRE (STress Responsive Elements) são definidas como elementos de ativação *cis* presentes nos promotores de genes, conhecidos por serem induzidos por uma variedade de condições estressantes (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996). A maioria dos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de trealose e glicogênio em *S. cerevisiae* contém entre uma e várias cópias destes elementos STRE em suas regiões promotoras (VARELA *et al.*, 1995). Estes genes mostraram sofrer indução de uma mesma forma, independentemente do número de elementos STRE presentes em seus promotores. Além disso, não são todos os elementos STRE presentes nos promotores destes genes que contribuem igualmente para a indução da transcrição em resposta ao estresse, mas um deles deve ser o predominante na resposta, como foi mostrado para os genes de levedura GSY1 (UNNIKRISHNAN *et al.*, 2003), GSY2 (NI & LAPORTE, 1995) e HSP12 (VARELA *et al.*, 1995). A indução do gene GSY2 durante a fase estacionária de leveduras, em meio contendo concentração limitada de glicose, mostrou não ser totalmente dependente da presença dos elementos STRE no seu promotor e embora mutações nestes elementos tenham reduzido a taxa de indução do gene GSY2, uma baixa atividade glicogênio sintase ainda pode ser notada nas células mutantes (PARROU; ENJALBERT; FRANÇOIS, 1999).

As respostas mediadas pelos elementos STRE frente a diferentes formas de estresse são dependentes da presença dos transativadores Msn2p/4p no núcleo das células, uma vez que mutantes *msn2 msn4* mostraram-se sensíveis a vários tipos de estresse (ZHRINGER; THEVELEIN; NWAKA, 2000; SMITH; WARD; GARRET, 1998; MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996; SCHIMITT & MCENTEE, 1996). Os transativadores Msn2p/4p são fatores de transcrição que reconhecem especificamente os elementos STRE, por meio de seus domínios de ligação ao DNA do tipo *zinc finger* C₂H₂ e medeiam a transcrição de genes

dependentes de STRE sob diferentes estímulos estressantes. Logo, a ausência destes transativadores no núcleo das células resultaria numa redução significativa do acúmulo de glicogênio durante o crescimento das leveduras, devido a uma diminuição geral na expressão dependente de STRE dos genes envolvidos no metabolismo deste carboidrato de reserva (ZAHNINGER; HOLZER; NWAKA, 1998; SMITH; WARD; GARRET, 1998).

Estudos realizados na levedura *S. cerevisiae* com as proteínas Msn2p/4p fusionadas a GFP mostraram uma distribuição citoplasmática destes transativadores em células de levedura não estressadas, sendo acumuladas no núcleo após eventos estressantes. A translocação destes transativadores para o núcleo em situações adversas mostrou ser um evento rápido, reversível e inversamente proporcional aos níveis de AMPc e atividade PKA celular (MARCHLER *et al.*, 1993; RUIS, 1997; GÖRNER *et al.*, 1998). Portanto, no estado fosforilado, estas proteínas são encontradas predominantemente no citoplasma das células ancoradas às proteínas do citoesqueleto Bmh1/2p (GÖRNER *et al.*, 1998). SMITH; WARD; GARRET (1998) mostrou que em *S. cerevisiae*, a presença de glicose e outros nutrientes no meio parecem ativar a via Ras-AMPc, impedindo a translocação dos transativadores Msn2p/4p para o núcleo, e conseqüentemente, inibindo a transcrição do gene *GSY2*. Atualmente, é sabido que a adenilil ciclase é ativada em resposta à variação de glicose no meio, através de um sistema receptor acoplado à proteína G, mais especificamente, pela subunidade α da proteína G (Gpa2p), enquanto que as proteínas Ras são quem na verdade transmitem o sinal intracelular em condições de estresse (XUE *et al.*, 1998; THEVELEIN & WINDE, 1999). A Figura 4 mostra um esquema geral da participação destas proteínas na regulação da transcrição do gene *GSY2* de *S. cerevisiae*.

HIRATA *et al.* (2003) mostraram que a GSK3 também participa no controle transcricional dependente de STRE de genes responsivos a estresse nas leveduras. Células mutantes *msn2* e mutantes nulos *gsk3* apresentaram redução nos níveis de mensageiros *PMG2* e *DDR2*, os quais possuem elementos STRE em seus promotores, após eventos estressantes como choque térmico e osmótico. Embora ensaios com a proteína Msn2p fusionada a GFP em células mutantes *gsk3* tenham demonstrado que a localização nuclear dos transativadores Msn2p não depende de GSK3, ensaios de mobilidade em gel utilizando extratos nucleares preparados a partir de células mutantes *gsk3* mostraram que a capacidade de ligação dos transativadores Msn2p ao elemento *cis* STRE encontra-se prejudicada nestes mutantes. Logo, a GSK3 mostrou não ser necessária para a localização nuclear destes transativadores na levedura, mas foi importante para a formação do complexo DNA-proteína exibido por eles (HIRATA *et al.*, 2003).

Em *S. cerevisiae* a PKA encontra-se envolvida em numerosos processos celulares, tais como crescimento celular, armazenamento de carbono, resposta a estresse e diferenciação celular (CAMERON *et al.*, 1988; BROACH & DESCHENES, 1990; GIMENO *et*

Figura 4. Controle metabólico e genético sobre o gene *GSY2* de *S. cerevisiae*. A proteína quinase PKA regula negativamente a expressão do gene, inibindo a localização nuclear dos transativadores Msn2p/4p através das proteínas de ancoramento Bmh1p/2p. O controle transcricional independente de STRE e/ou Msn2p/4p pela PKA sugere a existência de uma via independente, mas ainda não caracterizada. Ao contrário da PKA, a proteína quinase Snf1p regula positivamente a expressão gênica. A Snf1p deve agir como um efetor negativo *upstream* da proteína quinase dependente de ciclina Pho85p. A Pho85p, por sua vez deve associar-se com uma ciclina e regular a localização nuclear de um fator de transcrição hipotético que controla a expressão do gene *GSY2* de um modo independente de STRE. Em adição, Snf1p e Pho85p controlam antagonicamente o estado de fosforilação de Gsy2p. As setas indicam as interações positivas, as barras indicam as interações negativas e as linhas tracejadas indicam interações diretas ainda não determinadas [FRANÇOIS & PARROU (2001) introduzindo-se modificações apresentadas em ESTRUCH (2000)].

al, 1992). Como consequência, um grande número de genes é regulado negativamente em linhagens mutantes apresentando alta atividade PKA, através de um ou mais elementos STRE em seus promotores. Exemplos disso é a inibição da expressão do gene *HSP12* dependente de STRE frente a diferentes formas de estresse, como choque térmico e osmótico (VARELA *et al*, 1995), a inibição da expressão dos genes *GAC1* (FRANÇOIS *et al*, 1992) e *GSY2* (HARDY; HUANG; ROCH, 1994), que são considerados essenciais para a síntese de glicogênio, e a inibição na reprogramação da expressão gênica de genes dependente de STRE envolvidos no metabolismo de glicogênio, durante a fase de transição do crescimento diáuxico das leveduras (BOY-MARCOTTE *et al.*, 1996). Células de levedura deficientes na atividade PKA param na fase G1 do ciclo celular, acumulam carboidratos de reserva e se tornam resistentes ao estresse térmico e oxidativo, fenótipos estes muito semelhantes aos apresentados por células selvagens privadas de nutrientes (JOHNSTON; PRINGLE; HARTWELL, 1977). Entretanto, células de levedura apresentando alta atividade PKA comportam-se de maneira contrária: são incapazes de acumular carboidratos de reserva e apresentam-se extremamente sensíveis a várias formas de estresse (CANNON & TATCHELL, 1987; CAMERON *et al*, 1988). Juntas, todas estas respostas apontam a via da PKA como tendo um papel central em coordenar o crescimento e metabolismo celular em resposta a diferentes estímulos ambientais.

A transcrição do gene *GSY2* mostrou ser um processo controlado por variações das condições nutricionais as quais são sinalizadas, sobretudo pelas proteínas quinases Pho85p, Snf1p e PKA (HARDY; HUANG; ROCH, 1994; TIMBLIN & BERGMAN, 1997; SMITH; WARD; GARRET, 1998; PARROU *et al.*, 1999; WILSON; WANG; ROACH, 2002). Contudo, nem todos os elementos *cis* e *trans* alvos destas quinases foram identificados. Através de ensaios de deleção do promotor *GSY2*, ENJALBERT; PARROU; FRANÇOIS (2004) mostraram que durante a fase de crescimento diáuxico de leveduras, a indução da expressão gênica não pode ser atribuída apenas à presença de elementos regulatórios *cis* no promotor e depende de um controle transcricional combinando as proteínas quinases Pho85p, Snf1p e PKA com diferentes vias de sinalização. Em células mutantes *pho85*, exibindo alta atividade glicogênio sintase e hiperacúmulo de glicogênio, a deleção de uma região do promotor *GSY2* rica em G/C é capaz de prevenir a hiperativação do gene *GSY2*. No entanto, esta sequência pode ser substituída por qualquer outra rica em G/C, sugerindo um papel apenas estrutural para esta região do promotor e sustentando o modelo de regulação negativa da transcrição gênica proposto por LENBURG & O'SHEA (1996), onde a Pho85p estaria impedindo a ligação de um fator de transcrição ainda desconhecido, que seria responsável por ativar a transcrição do gene *GSY2* nestas condições.

A proteína quinase Snf1p, ao contrário da Pho85p, mostrou influenciar o metabolismo de glicogênio de maneira positiva. A desrepressão catabólica observada em células de

levedura cultivadas sob baixa concentração de glicose é dada pela proteína quinase Snf1p, que estaria ativando a transcrição gênica ao inativar a proteína repressora Mig1p (ENJALBERT; PARROU; FRANÇOIS, 2004). A Mig1p é uma proteína com sítio de ligação para DNA, necessária para a repressão de alguns genes sensíveis a altas concentrações de glicose (SCHÜLLER & ENTIAN, 1991; LUNDIN; NEHLIN; RONNE, 1994). O controle exercido sobre Mig1p pode ser facilmente observado quando células mutantes *snf1*, as quais se caracterizam por apresentar redução significativa na expressão de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos de reserva, tem seu fenótipo para acúmulo de glicogênio restaurado se o gene *MIG1* também for deletado (GANCEDO, 1998; THOMPSON-JAEGER *et al.*, 1991). No entanto, a influência que Snf1p exerce sobre Mig1p mostrou ser mais indireta do que direta, uma vez que a remoção dos dois prováveis sítios de ligação para Mig1p no promotor *GSY2* não foram capazes de alterar a regulação da expressão gênica (ENJALBERT; PARROU; FRANÇOIS, 2004).

A via PKA é conhecida por inibir fortemente a indução do gene *GSY2* durante a diauxia, de maneira dependente (SMITH; WARD; GARRET, 1998) ou independente de STRE (BOY-MARCOTTE *et al.*, 1998). Células mutantes, onde a enzima PKA se encontra hiperativa, apresentaram uma redução na expressão gênica e acúmulo de glicogênio devido ao acúmulo de Sok2p, uma proteína repressora da expressão gênica dependente de PKA, mostrando um mecanismo de controle da PKA independente de STRE (ENJALBERT; PARROU; FRANÇOIS, 2004). Entretanto, o controle do gene *GSY2* dependente de STRE mostrou ser mais complicado, pois mesmo após a deleção dos elementos STRE da região promotora, o gene *GSY2* ainda se mostrou responsivo aos transativadores Msn2/4p, talvez devido à capacidade de ligar elementos STRE degenerados (ENJALBERT; PARROU; FRANÇOIS, 2004). Estes resultados são semelhantes aos apresentados para o controle transcricional do gene *GSY1* (UNNIKRISHNAN *et al.*, 2003) e para a análise genômica de mutantes *msn2 msn4*, os quais identificaram mais de 200 genes que são alvos destes transativadores, embora apenas 47 deles apresentassem elementos STRE (CAUSTON *et al.*, 2001).

Além do papel desempenhado pelo elemento STRE na transcrição gênica, outros elementos transcricionais mostraram-se importantes no controle da expressão de genes codificando proteínas envolvidas no metabolismo de carboidratos de reserva durante o choque térmico. Os organismos respondem a aumentos de temperatura alterando o processo de transcrição celular e expressando uma série de proteínas denominadas proteínas de choque térmico (HSP – *Heat Shock Proteins*), muitas das quais são chaperonas envolvidas em uma série de eventos celulares como enovelamento, trânsito de proteínas no citoplasma, maturação e degradação protéica (FEDER & HOFMANN, 1999). Nos eucariotos, a ativação da transcrição de genes codificando as HSPs, via seqüências regulatórias *cis* HSE (*Heat*

Shock Element) é dada pelos transativadores HSF (*Heat Shock Factors*). As seqüências regulatórias HSE são constituídas por pelo menos três repetições consecutivas e invertidas da seqüência consenso 5'-nGAAn-3' (5'-nTCCnnGAAnnTTCn-3') e podem ser encontradas em múltiplas cópias nos promotores dos genes responsivos ao choque térmico (PELHAM, 1985; BIENZ & PELHAM, 1987), caracterizando-se por conferir uma forte indução da expressão gênica frente ao estresse térmico, podendo agir tanto como elementos transcrpcionais proximais ao TATA-box quanto como *enhancers* (PELHAM, 1982; PELHAM & BIENZ, 1982; BIENZ & PELHAM, 1986).

A maneira pela qual os elementos HSE e os fatores HSF interagem é altamente conservada desde leveduras até mamíferos (SORGER; LEWIS; PELHAM, 1987; KINGSTON; SCHUETZ; LARIN, 1987; WU, 1995; MORIMOTO, 1998; PIRKKALA; NYKANEN; SISTONEN, 2001). Em células de leveduras, para que os fatores HSF reconheçam e liguem nos elementos HSE é necessário primeiramente, que seus monômeros se trimerizem através de seus domínios *coiled-coil*, permitindo que o domínio DBD (*DNA Binding Domain*) de ligação ao DNA reconheça o consensus 5'-nGAAn-3'. Embora esta seqüência HSE seja a mais comumente encontrada nas regiões promotoras, variações sobre esta unidade de reconhecimento também já foram descritas (SANTORO; JOHANSSON; THIELE, 1998; TAMAI *et al.*, 1994). Em células de mamíferos, por exemplo, as isoformas HSF1 e HSF2, as quais são conhecidas por responder a estímulos estressantes variados e assim regularem diferentes genes alvos, são capazes de se ligar a seqüências consensus HSE não convencionais. Esta capacidade de reconhecer e se ligar a uma seqüência regulatória HSE variante sugerem fortemente que a divergência existente nos consensus HSE seja responsável por promover respostas ao estresse, específicas para um dado gene (KROEGER & MORIMOTO, 1994; AHN *et al.*, 2001). No fungo *N. crassa*, ensaios de mobilidade em gel mostraram que os HSF são mais semelhantes aos Hsf1p de *S. cerevisiae* do que os fatores HSF de eucariotos superiores, porque no fungo os HSF também se encontram constitutivamente ligados aos consensos HSE (MEYER *et al.*, 2000).

A levedura *S. cerevisiae* possui apenas um gene (*HSF1*) codificando o fator de transcrição Hsf1p (SORGER & PELHAM, 1988). Este fator é indispensável para a viabilidade celular nas leveduras, uma vez que pode ser encontrado ligado constitutivamente aos elementos HSE, mantendo os níveis basais de transcrição gênica mesmo em condições normais de temperatura (SORGER; LEWIS; PELHAM, 1987; JAKOBSEN & PELHAM, 1988; PARK & CRAIG, 1989; McDANIEL *et al.*, 1989). Logo, a condição de choque térmico apenas aumenta os níveis de atividade transcricional mediada pelo fator Hsf1p, pois permite uma ligação cooperativa dos homotrímeros Hsf1p nos consensus HSE (HAHN *et al.*, 2004). O contrário pode ser observado em organismos multicelulares, onde os transativadores HSF ligam nos elementos HSE apenas após eventos de indução (KINGSTON; SCHUETZ; LARIN,

1987; LARSON; SCHUETZ; KINGSTON, 1988; WU, 1984). Embora a maneira pela qual os HSF de leveduras e organismos multicelulares liguem aos elementos HSE seja diferente, em ambos os sistemas os transativadores HSF sofrem fosforilação em resposta ao choque térmico, mas esta fosforilação não exerce influência na ligação dos transativadores aos elementos HSE (LARSON; SCHUETZ; KINGSTON, 1988; SORGER; LEWIS; PELHAM, 1987; SORGER & PELHAM, 1988).

Molecularmente, as proteínas Hsf1p encontram-se muito bem caracterizadas. Elas possuem vários domínios regulatórios, como um domínio DBD de ligação ao DNA, um domínio *coiled-coil* de trimerização, e dois domínios de ativação sendo um deles N-terminal (AR1/NTA/AAD) e o outro C-terminal (AR2/CTA/CAD) (SORGER & NELSON, 1989; SORGER, 1990). Além destes domínios comuns aos HSF de outros organismos, o Hsf1p também possui dois domínios que são específicos de *S. cerevisiae*, denominados CE2 e CTM, onde o domínio CE2 é responsável por regular negativamente a função do domínio ativador C-terminal e o domínio CTM é o responsável por aliviar este efeito repressor mediado pelo domínio CE2 em resposta ao choque térmico (SAKURAI & FUKASAWA, 2004, HASHIKAWA & SAKURAI, 2004). O domínio CTM é necessário para que ocorra uma hiperfosforilação do Hsf1p após choque térmico e também para que ocorra a ativação dos genes contendo os consensus HSE não convencionais (HASHIKAWA & SAKURAI, 2004). De fato, o domínio de ativação responsável pela transcrição de genes contendo elementos HSE não convencionais é o domínio AR2, o qual está localizado na região C-terminal do Hsf1p, sugerindo que a interação entre os domínios CTM e CE2 regule o grau de fosforilação do domínio de ativação AR2, quando os fatores Hsf1p já estão ligados aos consensus HSE não convencionais (SAKURAI & FUKASAWA, 2004).

Estudos realizados em mutantes *hsf1* de *S. cerevisiae* revelaram que o transativador Hsf1p é necessário para aumentar os níveis de transcrição induzida pelo choque térmico não apenas das chaperonas HSP, mas também de genes codificando proteínas envolvidas em diversos processos celulares como degradação de proteínas, geração de energia, metabolismo de carboidratos de reserva e manutenção da integridade da parede celular. Aproximadamente metade dos genes que mostraram ser regulados por Hsf1p não apresentaram nas suas regiões promotoras o consenso HSE 5'-nGAAn-3' típico. Na verdade, alguns destes genes apresentaram uma sequência consenso HSE cuja unidade é formada por três repetições 5'-nTTCn-3' (ou 5'-nGAAn-3') interrompidas por cinco pares de base. O número de repetições desta unidade e o espaçamento entre elas mostraram-se críticos tanto para a transcrição gênica induzida por choque térmico quanto para o reconhecimento do consenso pelos trímeros de Hsf1p (YAMAMOTO; MIZUKAMI; SAKURAI, 2005).

Devido ao fator HSF1 sofrer fosforilação sob condições normais e ser hiperfosforilado em resposta ao estresse, fica claro que a fosforilação desempenha papel importante na

regulação da atividade de transativação do fator HSF1. A proteína HSF1 mostrou ser ativada por uma grande variedade de fenômenos estressantes, incluindo choque térmico, choque oxidativo e metais pesados (PIRKKALA; NYKANEN; SISTONEN, 2001). Algumas proteínas quinases distintas, desempenhando papel tanto positivo quanto negativo na função dos HSF, têm sido identificadas (PIRKKALA; NYKANEN; SISTONEN, 2001; MORIMOTO, 1998; MORANO & THIELE, 1999; HOLMBERG *et al.*, 2002). Estudos demonstraram que os resíduos de aminoácidos 303, 307 e 363 presentes no domínio regulatório do fator HSF1 humano são fosforilados, respectivamente, pelas quinases GSK3, ERK1/2 e PKC e análises *in vivo* de mutantes específicos mostraram que a função destas fosforilações é, sobretudo, reprimir a atividade transcricional de HSF1 (CHU *et al.*, 1996; CHU *et al.*, 1998; KLINE & MORIMOTO, 1997; KNAUF *et al.*, 1996; XIA *et al.*, 1998). Esta repressão pode ser superada por choque térmico, sugerindo que as fosforilações que ocorrem no domínio regulatório, incluindo a fosforilação pela proteína quinase GSK3, devem agir em conjunto a fim de regular de maneira rigorosa a atividade do fator HSF1 nas células em condições normais de temperatura.

Além do controle pela fosforilação via GSK3, os fatores de transcrição HSF também sofrem regulação pela proteína quinase Snf1p. Semelhante aos HSF1 de mamíferos, os Hsf1p de leveduras são ativados por uma variedade de estresses, incluindo choque térmico, choque oxidativo e privação de glicose (GIARDINA & LIS, 1995; LIU & THIELE, 1996; TAMAI *et al.*, 1994; AMOROS & ESTRUCH, 2001), sofrendo diferentes padrões de fosforilação em função do tipo de estresse (LIU & THIELE, 1996), o que explicaria como um único fator de transcrição na levedura é capaz de responder a estímulos estressantes variados. Através de ensaios de duplo-híbrido e de fosforilação *in vitro*, HAHN *et al.* (2004) mostraram que a proteína Hsf1p interage fisicamente com a quinase Snf1p, sendo também o substrato direto da Snf1p apenas durante a situação de privação de glicose e não de choque térmico. Devido à ativação da proteína Hsf1p pela quinase Snf1p ocorrer apenas por privação de glicose e não por choque térmico sugere que a atividade dos HSF deve ser regulada por mecanismos de fosforilação distintos via diferentes proteínas quinases, em resposta a uma variedade de condições estressantes, permitindo níveis refinados de controle da atividade transcricional de genes que são alvos de sinais estressantes.

Outros fatores de transcrição que mostraram regular a expressão gênica por eventos de fosforilação são a proteína CREB e suas correlatas ATF1 (fator ativador da transcrição 1) e CREM (modulador do elemento de resposta ao AMPc) (MAYR & MONTMINY, 2001). CREB é um fator de transcrição responsivo a AMPc, que após sofrer fosforilação é dimerizado tornando-se capaz de reconhecer e ligar seqüências consensos denominadas CRE (5'-TgACgTCA-3'). Os elementos CRE são seqüências regulatórias *cis* presentes nos promotores de genes de eucariotos envolvidos no equilíbrio de glicose, sobrevida celular,

aprendizado e memória. A fosforilação de CREB é suficiente para promover a expressão gênica em situações normais de crescimento, mas a presença adicional de fatores de transcrição ligados aos promotores dos genes alvos se faz necessária para discriminar e ativar a expressão gênica via CREB em resposta a diferentes estímulos estressantes (MONTMINY *et al.*, 1986; COMB *et al.*, 1986; SHORT *et al.*, 1986). A discriminação do sinal por CREB é possível variando-se o tamanho da seqüência consenso e a localização dos consensos nos promotores dos genes alvos (MONTMINY *et al.*, 1986, COMB *et al.*, 1986; SHORT *et al.*, 1986; YAMAMOTO *et al.*, 1988; FINK *et al.*, 1988; CRAIG *et al.*, 2001).

Aproximadamente um quarto dos genes contendo consensos CRE em seus promotores se encontra envolvido no metabolismo celular, aumentando, por exemplo, a viabilidade de certos combustíveis como glicose e triacilgliceróis (LIU *et al.*, 1991; QUINN & GRANNER, 1990; GOPALAKRISHNAN & SCARPULLA, 1994; HERZIG; SCACCO; SCARPULLA, 2000). Embora seja aceito que níveis aumentados de AMPc acentuem o potencial de transativação das proteínas CREB, não existem evidências indicando que a atividade de ligação DNA-proteína do transativador CREB ao consenso CRE seja regulada por AMPc. Na verdade, a interação CRE-CREB parece ser regulada por eventos de metilação na região central do consenso CRE, que quando metilado impede a ligação do fator CREB *in vivo* (IGUCHI-ARIGA & SCHAFFNER, 1989). CREB possui um domínio de transativação bipartido, sendo uma porção constitutivamente ativa (domínio Q2), enquanto a outra porção é induzida (domínio KID) sob determinadas circunstâncias. O domínio Q2 promove a expressão do gene alvo através da sua interação com um dos componentes do complexo TFIID (NAKAJIMA *et al.*, 1997; SALUJA; VASSALLO; TANESE, 1998; FELINSKI & QUINN, 1999). O domínio KID é ativado apenas após sofrer fosforilação e promove o recrutamento dos coativadores transcripcionais CBP e p300 na região promotora (GONZALEZ & MONTMINY 1989; HAGIWARA *et al.*, 1993).

O recrutamento do coativador CBP favorece a ativação de genes alvos, pois além de estabelecer interações físicas com complexo da RNA polimerase II, também favorece a formação da bolha de transcrição através de sua atividade histona acetiltransferase intrínseca (NAKAJIMA *et al.*, 1997; FELINSKI *et al.*, 2001). Logo, a habilidade de um gene modulado por CREB em responder a um sinal e não a outro deve refletir não só nas diferentes localizações dos consensus CRE no promotor, mas também na habilidade do fator CREB em recrutar o coativador CBP. A capacidade de CREB em distinguir entre estímulos dependentes de AMPc e estímulos independentes de AMPc encontra-se na habilidade de recrutar de CBP e outros cofatores que compõem a maquinaria de transcrição. Alguns fatores de crescimento e estímulos estressantes mostraram ser capazes de promover a fosforilação do domínio KID da proteína CREB, sugerindo que este transativador seja substrato de outras quinases diferentes da PKA. Esta ampla possibilidade de ativação da CREB por diferentes proteínas

quinases, tais como PKC (YAMAMOTO *et al.*, 1988), MAPKAP-2 (TAN *et al.*, 1996) e quinases dependentes de Ca^{2+} -calmodulina (SUN *et al.*, 1994; MATTHEWS *et al.*, 1994) garantem com que um único consenso CRE seja suficiente para a ativação de um gene alvo através de CREB, em resposta tanto a variações nos níveis de AMPc quanto a um aumento, por exemplo, dos níveis de cálcio citoplasmático (MATTHEWS *et al.*, 1994; DE CESARE *et al.*, 1998).

Em *N. crassa* foi mostrado um acúmulo de glicogênio durante a fase exponencial de crescimento, o qual é acompanhado por um aumento na atividade glicogênio sintase e dos níveis de RNAm *gsn*. Após choque térmico, os níveis de transcrito *gsn* sofrem acentuada redução, mas retomam os níveis normais quando o estímulo estressante é interrompido (DE PAULA *et al.*, 2002). Estes resultados são exatamente o oposto do que acontece em células de *S. cerevisiae*, onde os níveis de transcrito *GSY2* encontram-se aumentados após choque térmico (NI & LAPORTE, 1995). O isolamento da sequência nucleotídica inteira do gene *gsn* e das suas regiões 5' e 3' flanqueadoras permitiu a identificação de elementos de DNA regulatórios descritos estarem envolvidos com a regulação da expressão gênica na situação de choque térmico, os elementos regulatórios HSE e STRE. Na Figura 5 encontra-se representada a organização estrutural do gene *gsn*, bem como a localização dos elementos HSE e STRE encontrados nas suas regiões flanqueadoras. Os elementos HSE foram encontrados em alto número de cópias na região 5' flanqueadora do gene, estando a maior parte deles concentrada na região promotora e a outra parte, localizada no intron contido na região 5'-UTR do gene. Para os elementos STRE, foram encontradas três cópias, sendo que uma delas encontra-se localizada na região promotora do gene, a segunda cópia encontra-se localizada dentro do intron da região 5'-UTR e a terceira cópia está localizada na região 3' flanqueadora do gene, *downstream* ao sítio de poliadenilação (FREITAS, 2001). Além dos elementos HSE e STRE, outros elementos regulatórios tais como CRE, MIG1 e NIT2 também foram encontrados na região 5' flanqueadora do gene *gsn*. A Tabela mostra a posição que estes elementos regulatórios ocupam ao longo da sequência nucleotídica.

Ensaio de mobilidade em gel mostraram que a redução nos níveis de transcrito *gsn* após choque térmico deve estar relacionada com a presença tanto dos elementos HSE quanto dos elementos STRE, uma vez que proteínas contidas nos extratos nucleares preparados a partir de células submetidas ao choque térmico (45°C) foram capazes de reconhecer e ligar em sondas de DNA contendo tanto os elementos STRE quanto HSE (FREITAS & BERTOLINI, 2004). Entretanto, a busca de proteínas ortólogos aos transativadores Msn2p/4p em bancos de dados do fungo não levou à identificação de nenhuma proteína ortóloga. Portanto, o processo de regulação do gene *gsn* no fungo *N. crassa* na situação de choque térmico pode envolver mecanismos não existentes na levedura *S. cerevisiae* (FREITAS & BERTOLINI, 2004).

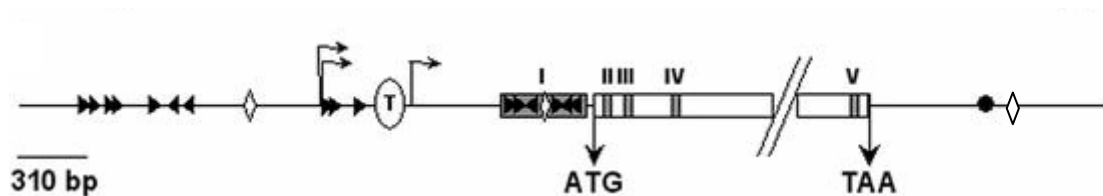


Figura 5. Representação esquemática do gene *gsn*, com suas regiões 5' e 3' flanqueadoras e ORF. ► consensos HSE; ◇ consensos STRE; ● sítio de poliadenilação; T- consenso TATA-box. A ORF *gsn* encontra-se delimitada pelo códon de iniciação ATG e o códon terminador TAA. Os 5 introns encontrados na sequência estão representados em cinza e os prováveis sítios de início da transcrição estão representados pelas setas (FREITAS & BERTOLINI, 2004).

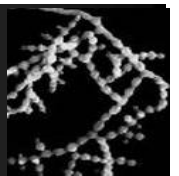
TABELA 1- Relação dos prováveis elementos de transcrição encontrados na região 5' flanqueadora do gene *gsn*

Elementos regulatórios	Seqüências consensos	Localizações*	Fontes	Referências
HSE	5'-ngAAn-3'	-81 -93 -173 -355 -376 -386 -494 -650 -875 -1004 -1099 -1371 -1387 -1702 -1856 -1885 -1953 -2036 -2123 -2133 -2161 -2181 -2257 -2282	Eucariotos superiores	BIENZ & PELHAM, 1982
STRE	5'-CCCCT-3'	-1503 -282 +2922	<i>S. cerevisiae</i>	VARELA <i>et al.</i> , 1995
CRE	5'-TgACgTCA-3'	-2312 -2218 -1286 -1234 -15 -12	Eucariotos superiores	MONTMINY <i>et al.</i> , 1986
MIG1	5'-(G/C)(C/T)GGGG-3'	-2305 -2026	<i>S. cerevisiae</i>	LUNDIN; NEHLIN; RONNE, 1994
NIT2	5'-TATCtac-3'	-1558	<i>N. crassa</i>	FU & MARZLUF, 1990
TATA box	5'-TgTATAAA-3'	-950	<i>N. crassa</i>	BRUCHEZ; EBERLE; RUSSO, 1993

*As localizações são relativas ao códon de iniciação da tradução ATG. HSE: Heat Shock Element, STRE: STress Response Element, CRE: cAMP Response Element, MIG1: Multicopy Inhibitor of Gal gene expression – involved in glucose repression, NIT2: NITrogen regulatory protein – activator of nitrogen-regulated genes. O *core* das seqüências consensos estão representados em letras maiúsculas.

Considerando que a regulação do gene que codifica a enzima glicogênio sintase na situação de choque térmico envolve diferentes mecanismos quando se compara à levedura *S. cerevisiae* com o fungo *N. crassa*, torna-se necessária uma investigação mais detalhada dos elementos de DNA regulatórios encontrados nas regiões flanqueadoras do gene *gsn* de *N. crassa* e também em relação às proteínas que podem estar envolvidas na regulação transcricional do gene.

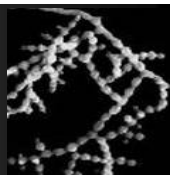
Objetivos



Considerando que a expressão do gene *gsn* de *N. crassa* sofre regulação transcricional durante a situação de choque térmico, o principal objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização sistemática do promotor *gsn*, investigando quais são as suas principais regiões regulatórias e também, o grau de envolvimento dos elementos de transcrição HSE, STRE e CRE no controle da expressão gênica na situação de estresse mencionada. Baseado neste contexto, os objetivos específicos foram agrupados da seguinte maneira:

- 1- Investigar o envolvimento dos elementos transcricionais CRE, HSE e STRE localizados nas regiões flangeadoras do gene *gsn* na modulação da transcrição gênica, na presença ou ausência de estresse térmico, através de ensaios de mobilidade em gel, acoplados a:
 - a) mutagênese sítio-dirigida do elemento STRE do promotor *gsn* e utilização do elemento regulatório mutado como sonda,
 - b) construção de oligonucleotídeos sintéticos complementares contendo o *core* do elemento STRE do promotor *gsn*, para serem anelados e usados como competidores específicos.
- 2- Determinação do promotor mínimo *gsn* através de ensaios de deleção e fusão a um gene repórter (*lacZ*) na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e acúmulo de glicogênio no fungo *Neurospora crassa*, nas condições fisiológicas de crescimento e choque térmico.
- 3- Tentativas de isolamento e identificação da(s) proteína(s) nuclear(es) capazes de reconhecer e ligar o elemento STRE do promotor *gsn* e modular a regulação negativa da expressão gênica durante o choque térmico. Esta parte do trabalho será investigada combinando diferentes abordagens bioquímicas para o fracionamento das proteínas nucleares e identificação das proteínas alvos por espectrometria de massas.
- 4- Investigar a participação da via de sinalização mediada por AMPc na modulação da expressão gênica, antes e após choque térmico, utilizando linhagens do fungo mutantes na via de sinalização mencionada, através de:
 - a) hibridização por *Northern blot*,
 - b) ensaios de mobilidade em gel usando como sondas de DNA, os elementos CRE da região 5' flangeadora do gene *gsn* e o elemento STRE do promotor *gsn*.

Materiais e Métodos



MATERIAIS

1. Linhagens

1.1. *Escherichia coli*

DH10B, *F* *endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL ΔlacX74 Φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ* (CASABADAN & COHEN, 1980).

1.2. *Neurospora crassa*

FGSC #424 (A), selvagem (NEWMAYER; PERKINS; BARRY, 1987).

FGSC #7094 (A), mutante *mcb* (MAHESHWARI, 1991). Mutante temperatura sensível, manifesta seu fenótipo quando cultivado a 37°C. Deficiente na subunidade regulatória da proteína quinase dependente de AMPc (PKA), portanto, possui alta atividade PKA.

FGSC #488 (a) mutante *cr-1* (*crisp*) (TERENZI; FLAWIA; TORRES, 1974). Mutante deficiente na atividade adenilil ciclase, portanto apresenta muito pouco ou nenhum AMPc. Usada para determinar quais funções são controladas por AMPc.

gsn^{rip} (*cot-1*) (DE PAULA, 2004). Mutante colonial temperatura dependente, manifesta seu fenótipo quando cultivado a 37°C. O gene *gsn* encontra-se inativado por RIP.

1.2.1. Condições de cultivo e obtenção dos conídios

Para a cultura em meio sólido, conídios de *N. crassa* linhagens selvagem, *mcb* e *cr-1* foram semeados em garrafas contendo 50 mL de meio VM sólido e cultivados durante 3 dias a 30°C, na ausência de luz. Passado este período, as garrafas foram transferidas para a temperatura ambiente, na presença de luz, e deixadas incubando por mais 7 dias, para estimular a conidiação. Para o cultivo em meio líquido, os conídios das culturas de 10 dias foram coletados adicionando 15 mL de água estéril às garrafas, seguido de vigorosa agitação. A suspensão obtida foi filtrada em gaze estéril e os conídios foram contados em câmara de Neubauer. Cerca de 2×10^7 conídios/mL foram usados para inocular as culturas líquidas.

1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

W303-1A (MATa ade2 his3 leu2 trp1 ura3)

W303-1A Δmsn2 Δmsn4 (MATa ade2 can1 his3 leu2 trp1 ura3 msn2-D3::HIS3 msn4-1::TRP1) (BOY-MARCOTTE et al., 1998).

2. Meios de cultura

2.1. *Neurospora crassa*

2.1.1. Meio mínimo de Vogel (meio VM) (VOGEL, 1956)

Sais de Vogel 1x; sacarose 2% (w/v); ágar 2% (w/v) (para meio sólido). Para o meio de Vogel N-free, o NH₄NO₃ deve ser omitido da preparação dos sais de Vogel.

- Sais de Vogel (50x)

Citrato de sódio.2H₂O 0,5 M; KH₂PO₄ anidro 1,85 M; NH₄NO₃ anidro 1,25 M; MgSO₄.7H₂O 0,08 M; CaCl₂.2H₂O 0,03 M; 5 mL biotina (0,5 mg/mL em etanol 50% v/v); 5 mL de elementos traços; 2 mL clorofórmio

- Solução de Elementos Traços

Ácido cítrico.H₂O 0,5 M; ZnSO₄.7H₂O 0,4 M; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O 0,05 M; CuSO₄.5H₂O 0,02 M; MnSO₄.H₂O 0,006 M; H₃BO₃ anidro 0,02 M; Na₂MoO₄.2H₂O 0,004 M; 100 μL de clorofórmio

2.1.2. Bottom agar

Meio VM sólido acrescido de sorbose 2% (w/v) (induz crescimento colonial de *N. crassa*)

2.1.3. Top agar (ágar de regeneração)

Sais de Vogel 1x; sorbitol 1 M; sorbose 2% (w/v); frutose 0,05% (w/v); glicose 0,05% (w/v); ágar 1% (w/v).

2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1. Meio SC-ura

YNB 0,67% (w/v); glicose 2% (w/v); -ura drop-out 0,15% (w/v)

2.2.2. Meio YPD

Extrato de levedo 1% (w/v) ; peptona 2% (w/v); glicose 2% (w/v)

2.3. *Escherichia coli*

2.3.1. Meio 2YT+ glicose

Triptona 1,6% (w/v); extrato de levedo 1,0% (w/v); NaCl 0,5% (w/v); glicose 0,2% (w/v). Para culturas sólidas, adicionar ágar 2% (w/v).

3. Soluções e tampões utilizados

3.1. Para determinação do conteúdo de glicogênio

3.1.1. Tampão de extração

Tris-HCl 0,05 M pH 8,0; NaF 0,05M; EDTA 0,001M pH 8,0; benzamidina 0,001 M; TLCK 0,002 M; DTT 0,001M; PMSF 0,001 M; aprotinina e pepstatina A (1 µg/mL de cada)

3.2. Para o isolamento de núcleos e preparo de extrato nuclear

3.2.1. Tampão A

Glicerol 25% (v/v); PIPES-KOH 0,01 M pH 7,0; MgCl₂.7H₂O 0,01 M; β-mercaptoetanol 0,01 M; Triton X-100 0,5% (v/v)

3.2.2. Tampão B

Glicerol 25% (v/v); PIPES-KOH 0,01 M pH 7,0; MgCl₂.7H₂O 0,01 M; β-mercaptoetanol 0,01 M

3.2.3. Tampão contendo sacarose 40%

Sacarose 40% (w/v); PIPES-KOH 0,005 M pH 7,0; MgCl₂.7H₂O 0,005 M

3.2.4. Tampão D

Glicerol 15% (v/v); HEPES-KOH 0,015 M pH 7,9; KCl 0,1 M; EDTA 0,001 M pH 8,0

3.2.5. Tampão de extração de proteínas nucleares

Glicerol 10% (v/v); HEPES-KOH 0,015 M pH7,9; KCl 0,5 M; MgCl₂.7H₂O 0,005 M; EDTA 0,0005 M pH8,0; DTT 0,001 M; PMSF 0,0005 M; NaF 0,05 M; benzamidina 0,025 M; antipaína e pepstatina A (10 µg/mL de cada)

3.3. Para os ensaios de Northern Blot, Southwestern Blot e EMSA

3.3.1. Tampão de desnaturação para extração de RNA

Tampão MOPS 1x; formamida deionizada 50% (v/v); formaldeído 20 % (v/v) (estoque 37%); glicerol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,025% (w/v); brometo de etídeo 0,05 µg/mL

3.3.2. *NT buffer*

Tris-HCl 0,01 M pH 8,0; NaCl 0,01 M; EDTA 0,02 M pH 8,0

3.3.3. *SSC buffer* (20x)

NaCl 3 M; citrato de sódio 0,3 M; acertar pH 7,0 com NaOH

3.3.4. *SSPE buffer* (20x)

NaCl 3,0 M; NaH₂PO₄ 0,2 M; EDTA 0,02 M; acertar pH 7,0 com NaOH

3.3.5. *MOPS* (10x)

MOPS 0,2 M; acetato de sódio 0,05 M; EDTA 0,01 M; acertar pH 7,0 com NaOH

3.3.6. *Tampão AC*

Glicerol 10% (v/v); NaCl 0,1 M; EDTA 0,0005 M pH 8,0; Tris-HCl 0,02 M pH 8,0; Tween 20 0,1% (v/v)

3.3.7. *Ponceau-S*

Ponceau-S 0,5% (w/v) em ácido acético 1% (v/v)

3.3.8. *Tampão de transferência* (Southwestern)

Metanol 20% (v/v); glicina 0,148 M; Tris base 0,02 M; água q.s.p. 1 L

3.3.9. *Tampão de amostra* (Laemmli 4x) (LAEMMLI, 1970)

Tris-HCl 0,05 M pH 6,8; glicerol 20% (v/v); SDS 10% (w/v); β-mercaptoetanol 10% (v/v); azul de bromofenol 0,05%

3.3.10. *Tampão de ligação para EMSA* (5x)

HEPES-KOH 0,125 M pH 7,9; KCl 0,1 M; glicerol 50% (v/v); EDTA 0,0005 M pH 8,0

3.3.11. *TBE* (10x)

Tris-HCl 0,89 M; EDTA 0,025 M; ácido bórico 0,89 M. Ajustar em pH 8,0.

3.4. *Para a estimativa de PM e de pI*

3.4.1. *Solução de reidratação para IEF*

Uréia 9 M; CHAPS 4% (w/v); DTT 0,002 M

3.4.2. *Tampão de equilíbrio* (sem adição de uréia)

Tris-HCl 0,075 M pH 8,8; glicerol 30% (v/v); SDS 2% (w/v); DTT 0,002 M

3.4.3. Tampão de renaturação

Triton X-100 3% (v/v); Hepes-KOH pH 7,9; NaCl 0,1 M; BSA 5 mg/mL; MgCl₂ 0,005 M; DTT 0,002 M; PMSF 0,0001 M; Benzamidina 0,0001 M

3.5. Para extração de DNA genômico e RNA

3.5.1. Tampão para de extração DNA

Tris-HCl 0,2 M pH 8,0; NaCl 0,25 M; EDTA 0,025 M e SDS 0,5% (w/v)

3.5.2. Tampão de lise para RNA

Tris-HCL 0,1 M pH 8,0; SDS 4% (w/v); NaCl 0,6 M; EDTA 0,01 M pH 8,0

3.6. Para a transformação de S. cerevisiae e dosagem de atividade β-galactosidase

3.6.1. Tampão LITE

Acetato de lítio 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M pH 7,4; EDTA 0,001 M pH 8,0

3.6.2. Tampão de lise

Tris-HCl 0,1 M pH 8,0; DTT 0,001 M; glicerol 20% (v/v)

3.6.3. Tampão Z (MILLER, 1972)

Na₂HPO₄.7H₂O 1,61% (w/v); NaH₂PO₄.7H₂O 0,55% (w/v); KCl 0,075% (w/v); MgSO₄.7H₂O 0,0246% (w/v); pH 7,0

3.7. Para eletroforese bidimensional

3.7.1. Tampão de reidratação

Uréia 7 M; tiouréia 2 M; CHAPS 2% (m/v); azul de bromofenol sal sódico 0,002% (m/v), DTT 0,018 M

3.7.2. Tampão de equilíbrio

Uréia 6 M; Tris-HCl 0,075 M pH 8,8; glicerol 29,8% (v/v); SDS 2% (m/v); azul de bromofenol sal sódico 0,002% (m/v); DTT (100 mg/10 mL de solução) ou IAA (250 mg/10 mL de solução)

3.7.3. Tampão Tris-Glicina (10 x)

Tris base 0,25 M; glicina 1,92M; SDS 1% (m/v)

4. Oligonucleotídeos

GAPDH-NcF:	5'-TCgTCAAggTCggCATCAACgg-3'
GAPDH-NcR:	5'-CCCgAgATCCAACATgCTCgAg-3'
GSN-EP3:	5'-gAggCACAAACggAACTggA-3'
GSN-FP4:	5'-CTgATgggAAAggTCAgAC-3'
GSN-FP4:	5'-CTgATgggAAAggTCAgAC-3'
GSN-FP5:	5'-GAAggggAACCTTTTggC-3'
GSNpGal-R:	5'-ATgCC <u>TgC</u> AgTgACCTCgCggggTTCACg-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Pst</i> I sublinhado)
GSNpm-F:	5'-TCCAgTTCCgTTTgTgCCTg-3'
GSNpm-R:	5'-CTggggggCAACACTgC-3'
GSN-RP2:	5'-gTTAACgCaggTCAACAg-3'
GSN-RP3:	5'-gCAACgAATACTCCCATg-3'
HSE-F:	5'-ggggAATTTgTggCTgA-3'
HSEi-R:	5'-CggggCCTCACTgAAgC-3'
HSE-R:	5'-CCgATgggTgTTgACCC-3'
mSTRE1-F:	5'-CCACTgAAATCgggATC <u>AAAA</u> gTgAATACTTTggggTAAg-3' (consenso STRE mutado sublinhado)
mSTRE1-R:	5'-CTTACCCCAAAGTATTCAC <u>TTTT</u> gATCCCGATTTCAGTgg-3' (consenso STRE mutado sublinhado)
pBARGEM-R:	5'-CTATTTAggTgACACTATAg-3'
pGSN-F:	5'-GgAATTC <u>TT</u> ggAAAgACgggACCC-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Eco</i> RI sublinhado)
pGSN-R:	5'-ggAATTCgTggCTCAATATgAATgg-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Eco</i> RI sublinhado)
pGSN-R:	5'-ggAATTCgTggCTCAATATgAATgg-3' (sítio de restrição para a enzima <i>Eco</i> RI sublinhado)
STRE1-F:	5'-gggATCCCCCTTgAATAC-3' (consenso STRE 5' TCCCCCTTg-3' sublinhado)
STRE1-R:	5'-GTATTCAAgggggATCCC-3' (consenso STRE 5' CAAggggA-3' sublinhado)
STRE2i-F:	5'-gCTTCAGTgAggCCCCg-3'

5. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e fornecidos pela Sigma, Amresco ou Merck. As endonucleases de restrição assim como as demais enzimas modificadoras foram fornecidas pela NE Biolabs, GE HealthCare ou Promega. O α -[^{32} P-dATP] (3000 μ Ci/mmol) foi fornecido pela GE HealthCare.

MÉTODOS

1. “Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)

Também conhecido como ensaio de mobilidade em gel, os ensaios de EMSA foram realizados com extratos nucleares de células do fungo da linhagem selvagem submetidas a um choque térmico de 45°C ou não, uma vez que era conhecida que a transcrição do gene *gsn* é regulada negativamente nesta situação de estresse.

1.1. Expressão do gene *gsn* nas linhagens selvagem, *mcb* e *cr-1* e choque térmico

Aproximadamente 2×10^7 conídios/mL de *N. crassa* linhagens selvagem, *mcb* e *cr-1* cultivados em meio VM sólido foram inoculados em 1 L de meio VM líquido e germinados durante 24 h a 30°C (selvagem, *cr-1*) ou 37°C (*mcb*), a 250 rpm. Após 24 h, 250 mL de cada uma das culturas foram removidos, filtrados e armazenados a -80°C (amostra ZERO). As culturas restantes foram filtradas e cada uma delas foi re-inoculada em 1 L de meio VM líquido fresco, pré-aquecido a 45°C (choque térmico). Os inóculos foram mantidos a 45°C/250 rpm e 500 mL de cada uma das culturas foram removidos após 15 e 30 min de choque térmico (amostras HS15' e HS30') e armazenadas como no tempo zero. As amostras coletadas foram usadas, posteriormente, para o isolamento de núcleos e preparo dos extratos nucleares das diferentes linhagens.

1.2. Isolamento de núcleos de *N. crassa*

O isolamento de núcleos seguiu o protocolo descrito por NAGATA *et al.* (1993), introduzindo-se algumas modificações. Todas as centrifugações foram realizadas em centrífuga refrigerada Beckman Avanti JA-25, em rotor de ângulo fixo JA25-50. Primeiramente, os micélios correspondendo às amostras ZERO, HS15 e HS30 foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fino. Em seguida, as amostras pulverizadas foram transferidas para um Potter-Elvehjem e extraídas manualmente em tampão A gelado (20 g micélio seco/100 mL tampão A), usando um pistilo de teflon. Após homogeneizadas, as frações sobrenadantes foram coletadas por centrifugação ($1.000 \times g/4^\circ\text{C}/10 \text{ min}$) e reservadas. Os precipitados foram re-extraídos em tampão A gelado e novas frações sobrenadantes foram isoladas por centrifugação ($1.000 \times g/4^\circ\text{C}/10 \text{ min}$). As frações sobrenadantes foram então combinadas e novamente centrifugadas a $5.000 \times g/4^\circ\text{C}/10 \text{ min}$. Os precipitados foram cuidadosamente dissolvidos em tampão B gelado, aplicados sobre

uma solução tampão gelada contendo 40% sacarose e centrifugados a $3.500 \times g/4^{\circ}\text{C}/30$ min para o isolamento dos núcleos. Após a centrifugação, os precipitados contendo os núcleos foram cuidadosamente lavados em tampão B, corados com Giemsa e examinados em microscópio óptico a fim de verificarmos sua integridade e quantidade.

1.3. Preparo dos extratos nucleares

Os núcleos isolados foram lisados na presença de tampão de extração gelado (200 μL tampão extração/5 g micélio macerado), durante 30 min em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (14.000 rpm/ $4^{\circ}\text{C}/10$ min), as frações sobrenadantes foram recolhidas e dialisadas durante 2 h a 4°C , contra o tampão D. Os extratos dialisados foram clarificados a $15.000 \times g/4^{\circ}\text{C}/20$ min e os sobrenadantes límpidos foram aliquotados e armazenados a -80°C ou então, fracionados em colunas de Heparina-Sepharose. As proteínas totais foram quantificadas por Hartree (HARTREE, 1972) utilizando BSA como padrão.

1.4. Sondas de DNA e competidores específicos para os elementos de DNA *STRE* e *HSE* contidos na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*

Como sondas de DNA, foram analisados segmentos da região 5'-flanqueadora do gene (região promotora mais a região 5'-UTR), os quais foram obtidos por digestão com endonucleases de restrição e por PCR, utilizando-se *primers* localizados em diferentes posições da região analisada. Estes fragmentos foram subclonados no vetor pUC18 e a presença dos insertos foi confirmada através de sequenciamento de ambas as fitas em seqüenciador automático 377 ABI-PRISM (Perkin Elmer).

1.4.1. Preparo das sondas *HSE*, *HSE1*, *HSE2* e *STRE1* para analisar os elementos de DNA presentes na região promotora do gene *gsn*

Um primeiro fragmento de DNA de 377 bp foi amplificado a partir do clone IV9A-1 [FREITAS *et al.* (2002), GenBank nº AF417205] com os oligonucleotídeos GSN-FP4 e GSN-RP2. O fragmento foi digerido com *Bgl*II e *Nco*I, liberando um fragmento de 158 bp, o qual foi reparado e subclonado em *Sma*I no vetor pUC18 (pUC-STRE1). A sonda STRE1 foi construída com o objetivo de analisar o envolvimento do elemento STRE1 (*upstream* ao TATA-box). Para preparo da sonda STRE1, o plasmídeo pUC-STRE1 foi digerido com *Eco*RI e *Hind*III liberando um fragmento de 158 bp.

Um segundo fragmento de DNA de 618 bp foi amplificado a partir do clone IV9A-1 com os *primers* pBARGEM-R e GSN-RP3, o qual foi subclonado em *Sma*I no vetor pUC18

(pUC-HSE). A sonda HSE foi construída com o objetivo de analisar uma região do promotor *gsn* contendo vários elementos HSE. Para preparo da sonda HSE, o plasmídeo pUC-HSE foi digerido com *EcoRI* e *HindIII* liberando um fragmento de ~630 bp. Posteriormente, a região contendo os elementos HSE foi subdividida em dois fragmentos contendo respectivamente, os elementos HSE distais (sonda HSE1) e os elementos HSEs proximais (sonda HSE2), em relação ao códon de iniciação ATG (+1). Para o preparo da sonda HSE1 um fragmento de DNA de aproximadamente 290 bp foi amplificado a partir do plasmídeo pUC-HSE utilizando os oligonucleotídeos pGSN-F e HSE-R. Este fragmento foi digerido com a enzima de restrição *EcoRI* e subclonado no vetor pUC18 em *SmaI/EcoRI* (pUC-HSE1). Para o preparo da sonda HSE1, o plasmídeo pUC-HSE1 foi digerido com *EcoRI*, liberando um fragmento de DNA de ~250 bp. Para o preparo da sonda HSE2 um fragmento de DNA de aproximadamente 320 bp foi amplificado a partir do plasmídeo pUC-HSE utilizando-se os oligos HSE-F e GSN-RP3, digerido com a enzima de restrição *SfiI*, reparado e subclonado no vetor pUC18 em *SmaI* (pUC-HSE2). Para o preparo da sonda HSE2, um fragmento de DNA de 277 bp foi removido do plasmídeo pUC-HSE2 através de digestão enzimática com *BamHI* e *EcoRI*.

1.4.2. Preparo das sondas *STRE2/HSEi*, *STRE2* e *HSEi* para analisar os elementos de DNA contidos no *intron1* da região 5'-UTR do gene *gsn*

Um fragmento de DNA de aproximadamente 1100 bp foi amplificado a partir do clone IV9A-1, com os oligonucleotídeos pGSN-R e GSN-FP5. Este fragmento foi digerido com *EcoRI* e *BglII*, liberando um fragmento de 610 bp, o qual foi subclonado em *EcoRI* e *BamHI* no vetor pUC18 (pUC-STRE2/HSEi). A sonda STRE2/HSEi foi construída com o objetivo de analisar inicialmente o envolvimento dos elementos de transcrição HSE e STRE2 presentes no *intron1* (região 5'-UTR). Para o preparo da sonda STRE2/HSEi, o plasmídeo pUC-STRE2/HSEi foi digerido com *XbaI* e *SaI*, liberando um fragmento de 410 bp.

As análises individuais dos elementos transcripcionais STRE2 e HSE presentes no *intron1* também foram realizadas. Para isto, foram isolados dois fragmentos de DNA, um contendo o elemento STRE2 e o outro os elementos HSE. Um fragmento de DNA de aproximadamente 420 bp foi amplificado a partir do clone IV9A-1 com os oligos STRE2i-F e pGSN-R e subclonado no vetor pUC18 em *SmaI/EcoRI* (pUC-STRE2). Para o preparo da sonda STRE2 o plasmídeo pUC-STRE2 foi digerido com *SaI* e *BamHI*, liberando um fragmento de 151 bp. Para o preparo da sonda HSEi, um fragmento de aproximadamente 250 bp foi amplificado com os oligonucleotídeos GSNpm-F e HSEi-R e subclonado no vetor pUC18 em *SmaI* (pUC-HSEi). A sonda HSEi, contendo 240 bp, foi isolada do plasmídeo pUC-HSEi após digestão enzimática com *BamHI* e *EcoRI*.

1.4.3. Preparo da sonda contendo o elemento *STRE1* mutado (*mSTRE1*)

A especificidade da ligação DNA-proteína(s) para o elemento *STRE1* também foi analisada utilizando-se uma sonda de DNA carregando o elemento *STRE1* mutado (sonda *mSTRE1*) e o competidor específico para os elementos HSE do promotor *gsn*, num ensaio de competição cruzada. O elemento *STRE1* foi mutado alterando-se a sequência 5'-CCCCT-3' contida no promotor *gsn* pela sequência 5'-AAAAG-3', através da técnica de mutagenese sítio-dirigida, utilizando PCR em duas etapas (AUSUBEL *et al.*, 1996).

Na primeira etapa (PCR 1) foram usados os oligonucleotídeos *mSTRE1-F* e *mSTRE1-R* para introduzir as mutações. Um fragmento de DNA de aproximadamente 550 bp foi amplificado a partir do clone IV9A-1 utilizando os oligonucleotídeos *mSTRE1-F* e *GSNpm-R*. Outro fragmento de DNA, contendo aproximadamente 600 bp também foi amplificado a partir do clone IV9A-1, utilizando-se os oligonucleotídeos *HSE-F* e *mSTRE1-R*. Os fragmentos amplificados foram isolados, purificados, dosados e misturados em quantidades equimolares em tubo eppendorf limpo. A mistura de fragmentos de DNA foi desnaturada e deixada esfriar a temperatura ambiente, a fim de favorecer o anelamento das fitas de DNA complementares. As fitas aneladas carregando o elemento *STRE1* mutado foram estendidas a 72°C/5 min, adicionando-se previamente à reação uma mistura de dNTPs e a DNA polimerase *Platinum Pfx* DNA polimerase (Invitrogen). Na segunda etapa (PCR 2), os oligonucleotídeos *GSN-FP4* e *GSN-RP2*, localizados internamente ao fragmento de DNA amplificado no PCR1, foram usados para amplificar um fragmento de aproximadamente 380 bp, o qual foi subclonado no vetor *pMOSBlue* (*pMOS-mSTRE1*) e posteriormente, seqüenciado. A sonda *mSTRE1* de 158 bp foi isolada do plasmídeo *pMOS-mSTRE1* após digestão enzimática com *Bgl*II e *Nco*I.

1.4.4. Competidores específicos e inespecíficos para as sondas utilizadas

Os competidores específicos para as sondas acima mencionadas foram preparados como as mesmas, sem sofrerem marcação radiativa. Oligonucleotídeos *STRE1* complementares também foram usados como competidores específicos para o elemento *STRE1*, após terem sido anelados entre si. Os oligonucleotídeos hibridizados foram quantificados através da absorbância a 260 nm antes de serem usados como competidores nos ensaios de EMSA. Como competidor inespecífico, foi usado o copolímero poli(dI-dC)•(dI-dC) (GE Healthcare).

1.5. Sonda de DNA e competidor específico para o consenso *STRE3* presente na região 3'-flanqueadora do gene *gsn*

Um fragmento de DNA de aproximadamente 450 bp foi removido da região 3'-flanqueadora do gene *gsn* contido no clone IV9A-1, utilizando-se as enzimas de restrição

SacI e *PstI*. Este fragmento foi subclonado em *SacI* e *PstI* no vetor pUC18 (pUC-STRE3) e seqüenciado em ambas as fitas. Para o preparo da sonda STRE3, o plasmídeo pUC-STRE3 foi digerido com *Clal* e *HindIII* liberando um fragmento de 120 bp. A sonda STRE3 foi construída com o objetivo de analisar uma possível participação do elemento de transcrição STRE3, localizado *downstream* ao sinal de poliadenilação.

1.6. Sondas de DNA e competidores específicos para os consensos CRE presentes na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*

As sondas de DNA e os competidores específicos para os elementos CRE contidos na região 5' flanqueadora do gene *gsn* foram utilizadas para analisar o papel destes elementos de DNA no controle da expressão gênica, nas situações de crescimento vegetativo do fungo e também de choque térmico, na linhagem selvagem do fungo e nas linhagens mutantes na via de sinalização do AMPc. Para isto, um primeiro fragmento de DNA de 292 bp foi amplificado a partir da região 5'-flanqueadora do gene *gsn* contido no clone IV9A-1, utilizando-se os oligonucleotídeos pGSN-F- e HSE-R. Este fragmento foi subclonado em *SmaI* no vetor pUC18 (pUC-CRE1/2) e seqüenciado em ambas as fitas. Para o preparo da sonda CRE1/2, o plasmídeo pUC-CRE1/2 foi digerido com *BamHI* liberando um fragmento de 250 bp. A sonda CRE1/2 foi construída com o objetivo de analisar uma possível participação dos elementos de DNA CRE1 e CRE2 localizados, aproximadamente, 1000 bp *upstream* ao consenso TATA-box.

Um segundo fragmento de DNA de 371 bp também foi amplificado a partir da região 5'-flanqueadora do gene *gsn* utilizando os oligonucleotídeos GSNpm-F2 e GSN-EP3. O fragmento amplificado foi subclonado em *SmaI* no vetor pUC18 (pUC-CRE3/4) e seqüenciado em ambas as fitas. Para o preparo da sonda CRE3/4, o plasmídeo pUC-CRE3/4 foi digerido com *PvuII* e *BamHI*, liberando um fragmento de 200 bp. A sonda CRE3/4 foi construída com o objetivo de analisar uma possível participação dos elementos de DNA CRE3 e CRE4 localizados, aproximadamente, 300 bp *upstream* ao consenso TATA-box.

Um terceiro fragmento de DNA de 383 bp foi amplificado a partir da região 5'-flanqueadora do gene *gsn* contido no clone IV9A-1 utilizando os oligonucleotídeos STRE2i-F- e pGSNgal-R. Este fragmento foi subclonado em *SmaI* no vetor pUC18 (pUC-CRE5/6) e seqüenciado em ambas as fitas. Para o preparo da sonda CRE5/6, o plasmídeo pUC-CRE5/6 foi digerido com *Sall* e *PstI*, liberando um fragmento de 235 bp. A sonda CRE5/6 foi construída com o objetivo de analisar uma possível participação dos elementos de DNA CRE5 e CRE6 localizados, aproximadamente, 10 bp *upstream* ao códon de iniciação ATG do gene *gsn*.

1.7. Marcação das sondas de DNA

As sondas foram marcadas por *filling-in* de acordo como descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001), utilizando-se o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I de *E. coli* e α [^{32} P]dATP. Os fragmentos de DNA marcados foram purificados para a remoção dos nucleotídeos não incorporados através do kit GeneClean II (BIO101) e as intensidades das radiações determinadas em um cintilador Beckman Coulter™ modelo LS6500.

1.8. Ensaio de mobilidade em gel (EMSA)

As interações DNA-proteína(s) foram realizadas em 20 μ L de um tampão de ligação 1x contendo DTT 0,001 M; PMSF 0,0005 M; benzamidina 0,0125 M; poli(dI-dC)•(dI-dC) 2 μ g/reação; 15-30 μ g de proteínas do extrato nuclear bruto ou fracionado em coluna de Heparina-Sepharose; antipaína e pepstatina A (5 μ g/mL de cada). Numa primeira etapa da reação, as amostras foram pré-incubadas em tampão de ligação à temperatura ambiente durante 5 min e em seguida, adicionadas de 1-5 ng de sonda de DNA marcado (10^4 - 10^5 cpm) e novamente incubadas à temperatura ambiente durante 20 min. Após incubação com a sonda, as reações foram submetidas à eletroforese em géis de poliacrilamida 5% (29:1) não desnaturantes, em tampão TBE 0,5x (300 V, 10 mA, 15°C). Os géis foram secos e autoradiografados em filme Kodak T-Mat G/RA a -80°C. Para os ensaios de competição, os competidores específicos e inespecíficos foram adicionados às amostras na primeira etapa da reação de incubação, antes da adição da sonda marcada. Os competidores específicos foram usados em um excesso molar de 2 a 5x superior à concentração de sonda usada.

2. Análise da expressão do gene *gsn* e acúmulo de glicogênio durante o choque térmico

Resultados anteriores obtidos em nosso laboratório mostraram que os níveis de RNAm *gsn* foram reduzidos quando micélio da linhagem selvagem do fungo foi submetida ao choque térmico (DE PAULA *et al.*, 2002). A fim de confirmarmos se esta redução é resultante do aumento de temperatura, analisamos a transcrição do gene *gsn* sob diferentes temperaturas de crescimento. Paralelamente, o acúmulo de glicogênio foi determinado nas mesmas amostras. Em outro tipo de experimento, a análise da expressão do gene *gsn* foi realizada nas diferentes linhagens do fungo alteradas na via de sinalização mediada por AMPc.

2.1. Condições de cultivo das linhagens

Conídios da linhagem selvagem do fungo foram germinados a 30°C durante 24 h. Uma alíquota (amostra controle) foi removida e armazenada a -80°C enquanto o restante da cultura foi filtrado, o micélio obtido foi fracionado e as frações foram submetidas a diferentes temperaturas de crescimento (35, 37, 40, 42 e 45°C) em meio VM líquido fresco pré-aquecido nas temperaturas estabelecidas. Após 30 min de incubação, amostras das diferentes temperaturas foram coletadas e armazenadas como no controle. Estas amostras foram usadas para a extração de RNA total e para a determinação do conteúdo de glicogênio.

Para estudar o papel do AMPc sobre a transcrição do gene *gsn*, conídios das linhagens selvagem, *mcb* e *cr-1* foram germinados a 30°C durante 24 h. Alíquotas das diferentes culturas foram removidas e armazenadas a -80°C (amostras controles). As culturas restantes foram filtradas, os micélios obtidos foram inoculados em meio VM líquido fresco pré-aquecido a 45°C e incubados nesta temperatura durante 30 min (amostras HS30). Após o choque térmico, as amostras foram coletadas e armazenadas como no controle. Estas amostras foram usadas para a extração de RNA total e análise da expressão por Northern Blot.

2.2. Extração de RNA total

RNA total das amostras de ambas análises foi extraído pelo método de cloreto de lítio (SOKOLOVSKY *et al.*, 1995). Para isto, conídios ou micélio do fungo foram pulverizados em gral de porcelana com nitrogênio líquido e os pós resultantes foram transferidos para tubos eppendorf contendo uma mistura de 750 µL de tampão de lise: 750 µL fenol saturado em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0. A suspensão foi agitada durante 20 min à temperatura ambiente e a fase aquosa foi coletada a 10.000 rpm/10 min/ 4°C. Os RNAs contidos nas fases aquosas foram precipitados com 0,75 volumes de uma solução LiCl 8 M a 4°C, durante uma noite e coletados a 13.000 rpm/10 min/4°C. Os precipitados contendo os ácidos nucleicos foram solubilizados em 300 µL de água e em seguida, precipitados com acetato de sódio 3 M e etanol absoluto gelado a -80°C, durante 30 min. Os RNAs totais foram coletados a 13.000 rpm/4°C, durante 15 min, lavados duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a 13.000 rpm/4°C, durante 5 min, secos e solubilizados em 50 a 100 µL de água (DEPC).

Todos os materiais usados para a extração e eletroforese de RNA foram previamente tratados com RNaseZap® (Ambion).

2.3. Análise da expressão gênica por Northern blot

A análise por *Northern blot* foi realizada segundo protocolo descrito por SAMBROOK & RUSSELL (2001). Para isto, aproximadamente 15 µg de cada amostra de RNA total foi

previamente desnaturada em tampão de desnaturação a 65°C durante 10 min. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 0,6 M, em tampão MOPS 1x. Os RNAs totais foram separados a 3,5 V/cm durante 5 h e em seguida, transferidos por capilaridade para membranas de Nylon neutras (Hybond N, GE HealthCare) utilizando solução tampão SSC 2x, durante uma noite. Após a transferência, os RNAs foram fixados na membrana por *crosslinking* (Ultraviolet Crosslinker UVP mod. CL1000) durante 1 min e as membranas foram lavadas em solução tampão SSC 2x até a total remoção do formaldeído. As membranas lavadas foram pré-hibridizadas a 42°C, durante 4 h com 5 mL da solução ULTRAhyb (Ambion), em forno de hibridização Hybaid. Após o período de pré-hibridização, foram adicionados cerca de 100 ng de sonda ($10^6 - 10^8$ cpm) previamente desnaturada a 100°C/10 min e as membranas foram hibridizadas durante uma noite. As membranas hibridizadas foram lavadas em diferentes condições de estringência antes de serem expostas a filmes radiográficos (Kodak T-Mat G/RA).

Condições de lavagem:

- 1) SSPE 2x - 15 min/42°C
- 2) SSPE 0,5x; SDS 0,1% - 15 min/42°C
- 3) SSPE 0,1x; SDS 0,1% - 15 min/42°C
- 4) SSPE 0,1x; SDS 0,1% - 30 min/65°C

2.3.1. Sondas utilizadas

Como sonda para a análise por Northern blot foi utilizado o fragmento inteiro do cDNA *gsn* de aproximadamente 3,0 kb (DE PAULA *et al.*, 2002). Para um controle interno da hibridização, foi usado o gene que codifica a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gpd*) de *N. crassa*. O gene *gpd* foi amplificado a partir do DNA genômico do fungo, utilizando os oligonucleotídeos específicos GAPDH-NcF e GAPDH-NcR, subclonado no vetor pMOSBlue e seqüenciado para a confirmação do inserto. As sondas foram marcadas radiativamente com $\alpha[^{32}\text{P}]\text{dATP}$ por *random priming* (NEBlot kit - Biolabs) e em seguida, foram purificadas por filtração em resina Sephadex G-50 (Sigma) equilibrada em tampão NT, a fim de eliminarmos os nucleotídeos não incorporados.

2.4. Determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio foi determinado nas células da linhagem selvagem do fungo, submetidas ou não ao choque térmico, através da digestão do glicogênio com amiloglicosidase após precipitação com etanol, de acordo com protocolo descrito por HARDY & ROACH (1993).

Para isto, micélio de cada uma das amostras foi pulverizado em gral de porcelana com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tampão de extração gelado recém preparado, as frações solúveis contendo os extratos protéicos foram isoladas por centrifugação a $7.000 \times g$ /4°C/15 min e as proteínas totais foram dosadas com reagente de Bradford (BioRad), utilizando BSA como padrão. As proteínas contidas em 100 μ L de cada uma das amostras foram precipitadas com 25 μ L de uma solução TCA 50% a $10.000 \times g$ /4°C/15 min. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos, misturados com 4 volumes de etanol absoluto gelado durante 30 min a -80°C e centrifugados a $20.000 \times g$ /4°C/15 min. Os precipitados contendo glicogênio foram então resuspensores em 400 μ L de uma solução tampão (acetato de sódio 0,05 M pH 5,2; CaCl_2 0,005 M) contendo 1 μ L de cada uma das enzimas amiloglicosidase (30 mg/mL, em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2; CaCl_2 0,005 M) e α -amilase (10 mg/mL, em tampão acetato de sódio 0,05 M pH 5,2; CaCl_2 0,005 M) e incubados a 37°C durante 12 h. Um volume de 25 μ L de cada uma das amostras digeridas foi utilizado para a determinação do conteúdo de glicose livre, utilizando o *kit Glucose Trinder* (Sigma). O conteúdo de glicogênio foi expresso em μ g glicogênio/mg de proteínas totais.

3. Determinação do promotor basal *gsn* na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A análise do promotor basal *gsn* em *S. cerevisiae* foi realizada através de ensaios qualitativos e quantitativos para a determinação da atividade da enzima β -galactosidase na levedura. Os níveis de atividade enzimática dos transformantes foram avaliados antes (controle) e após choque térmico (37°C e 42°C) em células selvagens e mutantes nos fatores de transcrição Msn2p/4p (BOY-MARCOTTE *et al.*, 1998).

3.1. Preparo das construções plasmidiais

As construções foram realizadas através da remoção e/ou combinação de diferentes seqüências nucleotídicas da região promotora do gene *gsn* e incluem os onze primeiros aminoácidos da glicogênio sintase de *N. crassa*. Para isto foram combinadas reações de digestão, usando sítios para endonucleases de restrição presentes nas seqüências alvos e reações de PCR, nas quais fragmentos de DNA correspondentes a diferentes regiões do promotor *gsn* foram amplificados usando *primers* internos específicos. Os fragmentos gerados foram subclonados no vetor de expressão de levedura Yep356 (MYERS *et al.*, 1986), o qual foi gentilmente cedido pelo Dr. Alan M. Myers (Department of Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology, Iowa State University, IO, USA). Trata-se de um vetor

shuttle, derivado do plasmídeo 2 μ de *S. cerevisiae* adequado para a fusão de regiões promotoras ou codificadoras de genes ao gene *lacZ* de *E. coli*, o qual codifica para a enzima β -galactosidase. Seu sítio de clonagem múltipla (MCS) é derivado do vetor pUC18 e encontra-se introduzido *in frame* ao oitavo *codon* do gene da enzima β -galactosidase. Além disso, este vetor também carrega os genes *Amp^R* e *URA3*, os quais permitem a seleção, respectivamente, de transformantes de *E. coli* e de levedura. Uma construção contendo o promotor do gene *GSY2* de *S. cerevisiae* também foi preparada, para servir como controle positivo para a determinação da atividade β -galactosidase.

Como controle negativo da reação, células de leveduras foram transformadas com o plasmídeo Yep356 vazio. Todas as construções foram checadas por análise de restrição e também seqüenciadas em ambas as fitas usando *primers* específicos, antes de serem utilizadas para transformar células competentes de *S. cerevisiae* e encontram-se esquematicamente representadas na Figura 6.

As construções encontram-se descritas a seguir.

- **Yep356-pGSY2.** Usada como controle positivo para os ensaios de β -galactosidase, possui ~750 bp do promotor do gene *GSY2* de *S. cerevisiae*, incluindo o TATA-box.
- **Yep356-pm1.** Possui aproximadamente 2430 bp correspondente à região 5' flanqueadora inteira do gene *gsn*.
- **Yep356-pm2.** Possui aproximadamente 1700 bp da região 5' flanqueadora gene *gsn*, e exclui a região do promotor rica em elementos de transcrição HSE.
- **Yep356-pm3.** Possui aproximadamente 1400 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui a região do promotor rica em elementos de transcrição HSE e o elemento de transcrição STRE do promotor *gsn*.
- **Yep356-pm4.** Possui aproximadamente 600 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui a região do promotor contendo todos os elementos de transcrição HSE, o elemento de transcrição STRE do promotor *gsn*, os três prováveis TIS e o *motif* TATA-box.
- **Yep356-pm5.** Possui aproximadamente 2000 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui um fragmento interno do promotor de aproximadamente 390 bp, o qual contém apenas o elemento de transcrição STRE do promotor *gsn*.
- **Yep356-pm6.** Possui aproximadamente 2000 bp da região 5'-flanqueadora do gene *gsn* e exclui a seqüência nucleotídica inteira do *intron1* (482 bp) contido na região 5'-UTR.
- **Yep356-pm7.** Possui aproximadamente 1600 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui a seqüência nucleotídica inteira do *intron1* e o fragmento de DNA do promotor de ~390 bp, o qual contém o elemento de transcrição STRE do promotor *gsn*.

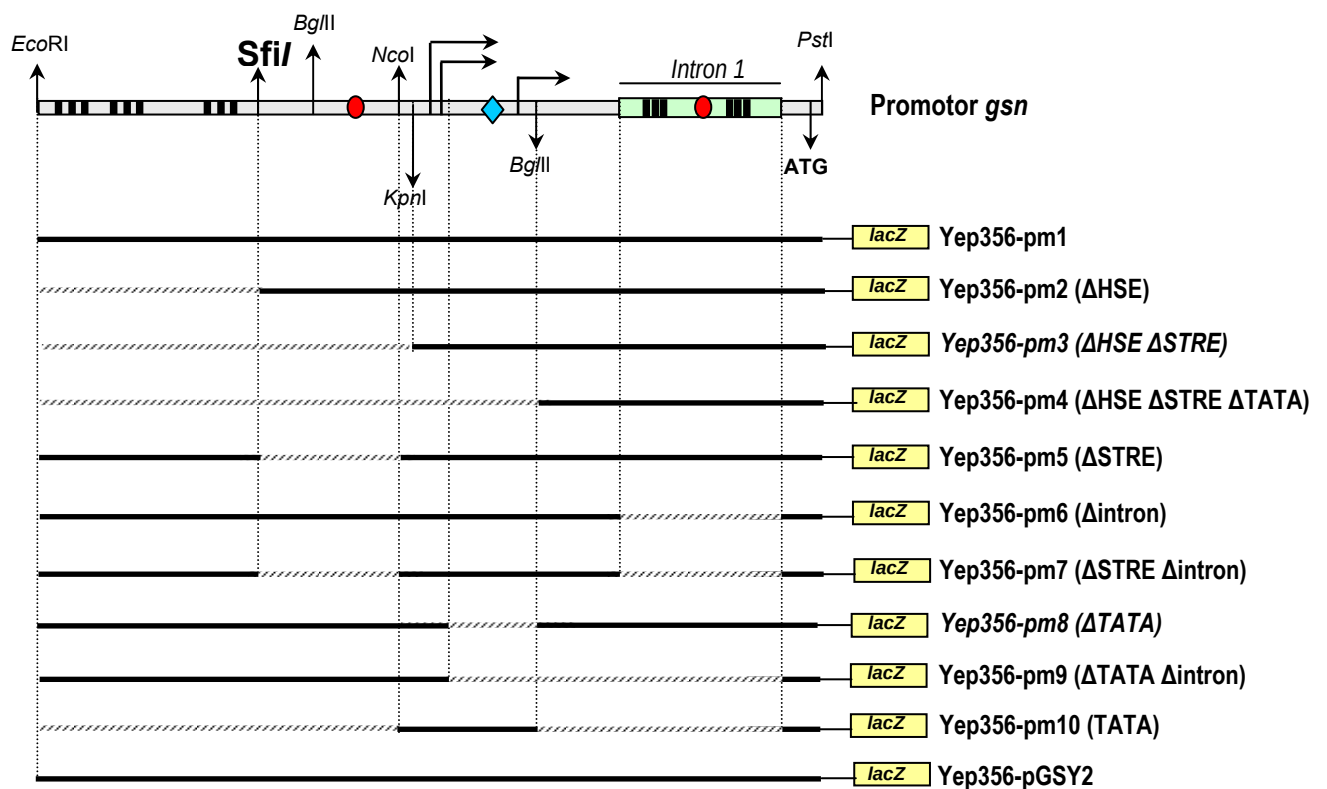


Figura 6. Construções plasmidiais para a análise da região promotora do gene *gsn* (nucleotídeo -2385 ao +33) e estruturas esquemáticas das construções utilizadas para a determinação do promotor basal na levedura *S. cerevisiae*. A localização dos sítios de restrição, dos elementos transcricionais *cis* e dos três prováveis sítios de início de transcrição (TIS) encontram-se representados na região promotora do gene. As regiões hachuradas representam as sequências nucleotídicas removidas do promotor *gsn*. ■ elementos HSE; ● elementos STRE; ◆ TATA-box *motif*; ↗ prováveis TIS.

- **Yep356-pm8.** Possui aproximadamente 2000 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui um fragmento de DNA interno do promotor de aproximadamente 400 bp, o qual contem o *motif* TATA-box e um provável TIS localizado imediatamente *downstream* ao TATA-box.
- **Yep356-pm9.** Possui aproximadamente 1530 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui a sequência nucleotídica inteira do *intron1* e a região do promotor contendo o TATA-box e o TIS imediatamente *downstream* ao mesmo.
- **Yep356-pm10.** Possui aproximadamente 900 bp da região 5' flanqueadora do gene *gsn* e exclui a sequência nucleotídica inteira do *intron1* e a região do promotor rica em elementos de transcrição HSE e o elemento de transcrição STRE do promotor *gsn*.

3.2. Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

A transformação das células competentes de *S. cerevisiae* foi realizada de acordo com protocolo descrito por SCHIESTL & GIETZ (1989). Para o preparo de células competentes de levedura, células das linhagens de *S. cerevisiae* selvagem e mutante foram cultivadas em meio YPD até uma D.O._{600nm} entre 1,0 e 2,0. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (4.000 rpm/4°C/5 min) e lavadas com 1 mL de tampão LITE gelado estéril (2.000 rpm/4°C/15 min). O precipitado contendo as células competentes foi resuspenso em 500 µL de tampão LITE, incubado a 30°C/250 rpm/1 h e em seguida, mantido em banho de gelo até o momento da transformação.

Para a transformação das células competentes, aproximadamente 800 ng de DNA plasmidial de cada uma das construções foram incubados com 100 µl de células competentes das linhagens de levedura, na presença do carreador DNA esperma de salmão (10 µg/mL, previamente desnaturado a 100°C/10 min) a 30°C/30 min. Em seguida, as suspensões foram adicionadas de 1,2 mL de uma solução de PEG 8000 40% (em tampão LITE) e novamente incubadas a 30°C/30 min, antes de serem submetidas ao choque térmico (42°C/15 min). Após choque térmico, o PEG foi removido das amostras por centrifugação e os precipitados celulares foram resuspenso em água estéril, semeados em placas contendo meio mínimo SC-*ura* e cultivados a 30°C, durante 48 – 72h.

3.3. Determinação da atividade β -galactosidase na levedura *S. cerevisiae*

A atividade β -galactosidase foi determinada tanto qualitativa quanto quantitativamente, em ambas as linhagens de levedura.

3.3.1. Ensaio qualitativo para detecção da atividade β -galactosidase

O ensaio qualitativo da atividade β -galactosidase seguiu o protocolo descrito em www.pmc.unimelb.edu.au/manula/molbio/mb440.htm e foi realizado a partir da transferência das colônias dos transformantes para discos de nitrocelulose. Após a transferência, os discos foram primeiramente congelados em nitrogênio líquido, a fim de romper as células de leveduras e em seguida, foram descongelados à temperatura ambiente. Depois de descongeladas, as réplicas foram depositadas sobre discos de papel Whatmann 3MM, previamente embebidos em tampão Z fresco, acrescido de X-Gal (0,4 mg/mL) e β -mercaptoetanol (270 μ L/100 mL de tampão Z) e deixados à temperatura ambiente até o desenvolvimento de coloração azul. O aparecimento da cor foi considerado dentro do tempo de 30 min a 30 h.

3.3.2. Determinação quantitativa da atividade β -galactosidase

A determinação quantitativa da atividade β -galactosidase nos transformantes de *S. cerevisiae* foi realizada de acordo com protocolo descrito por ROSE & BOTSTEIN (1983). A determinação foi realizada para células cultivadas na condição fisiológica de crescimento (30°C) e para células submetidas aos aumentos de temperatura de 37°C e 42°C (choque térmico). O método baseia-se na preparação de um extrato celular e a atividade enzimática é normalizada em relação à quantidade de proteínas totais.

Células de *S. cerevisiae* (transformantes ou não) foram cultivadas em 30 mL de meio SC-ura a 30°C/250 rpm durante uma noite. Amostras de 2 mL de cada uma das culturas foram removidas e as células foram coletadas por centrifugação a 2000 rpm/2 min/4°C e mantidas em banho de gelo (amostras controle). As culturas restantes foram submetidas a aumentos de temperatura de 37°C e 42°C (choque térmico), durante 30 min, em banho-maria termostaticado, sob suave agitação. Amostras de 2 mL de cada uma das culturas submetidas ao choque térmico foram removidas e as células também foram coletadas como para as amostras controle. Para o preparo dos extratos celulares, as amostras foram resuspensas em 250 μ L de tampão de lise contendo 12,5 μ L de PMSF 40 mM e adicionadas de contas de vidro (425-600 μ m, Sigma). As células foram então rompidas sob agitação forte em vortex, durante 8 ciclos com pulsos de 15 segundos de agitação e 45 segundos em banho de gelo. Em seguida, os extratos celulares brutos foram adicionados de 250 μ L de tampão de lise e após decantação, o sobrenadante foi transferido para tubos limpos e ensaiado quanto à atividade β -galactosidase. Para a determinação da atividade enzimática, 80 μ L de cada um dos extratos foram adicionados de 900 μ L de tampão Z e os volumes foram ajustados para 1 mL com tampão de lise. As misturas foram pré-incubadas durante 5 min a 28°C e em seguida, adicionadas de 200 μ L de uma solução estoque de ONPG (4 mg/mL, em tampão Z).

A reação ocorreu a 28°C, até que as misturas adquirissem coloração amarela e então, foram interrompidas pela adição de 500 µL de uma solução Na₂CO₃ 1 M. Os tempos que as reações levaram para desenvolver a coloração amarela foram precisamente anotados e as intensidades das colorações das amostras foram determinadas por absorbância a 420 nm em espectrofotômetro Beckman DU-640B. As proteínas totais contidas nos extratos celulares brutos foram determinadas pelo método de Hatree modificado, usando BSA como padrão e as atividades específicas das amostras foram expressas em nmoles/min/mg proteínas.

4. Determinação do promotor basal *gsn* no fungo *N. crassa*

A determinação do promotor basal *gsn* em *N. crassa* foi feita através da determinação qualitativa do acúmulo de glicogênio no fungo. Para isto, foi utilizada uma linhagem do fungo (linhagem *gsn^{rip}*), a qual foi construída em nosso laboratório por DE PAULA (2004). Trata-se de uma linhagem mutante, a qual possui o gene *gsn* inativado por RIP (*Repeat Induced Point Mutation*). Resumidamente, é uma técnica que se baseia numa característica do fungo *N. crassa*, onde cópias duplicadas de uma mesma seqüência nucleotídica são mutadas durante o período pré-meiótico. No período de cruzamento que antecede a fusão nuclear, o genoma do fungo é rastreado para a presença de seqüências duplicadas e quando encontradas, ambas as seqüências são mutadas pontualmente. Tais mutações podem levar à inativação do gene quando ocorrem no início da seqüência nucleotídica e neste caso, a proteína não é sintetizada na linhagem mutante. Portanto, a linhagem *gsn^{rip}* se caracteriza por não possuir atividade glicogênio sintase e, portanto, ser incapaz de acumular glicogênio.

4.1. Preparo das construções

As construções para a análise do promotor basal no fungo *N. crassa* foram realizadas através da remoção e combinação de diferentes seqüências nucleotídicas da região promotora do gene *gsn*, obtidas tanto por PCR, quanto por digestão enzimática. Todas as construções foram realizadas no vetor pBARGEM7-2, o qual carrega o gene *gsn* inteiro, incluindo suas regiões 5' e 3'-flanqueadoras. Além do gene *gsn* inteiro, o vetor pBARGEM7-2 também possui o gene *BAR*, o qual confere resistência ao glufosinato de amônio (nome comercial: BASTA, Bayer Cropscience do Brasil), um potente inibidor da enzima glutamina sintetase quando em meio de cultivo carente em fonte de nitrogênio (meio Vogel N-free). Portanto, transformantes pBARGEM7-2 podem facilmente ser selecionados em meio Vogel N-free suplementado com 0,5% do aminoácido prolina como única fonte de nitrogênio e adicionado de glufosinato de amônio (PALL, 1993).

As construções pBARGEM-pm1 a pBARGEM-pm10 correspondem às mesmas construções preparadas no vetor Yep356 de levedura. Uma construção contendo o plasmídeo pBARGEM7-2 vazio (pBARGEM-0) também foi preparada para ser usada como controle negativo. Todas as construções foram checadas por análise de restrição e sequenciamento automático, antes de serem utilizadas para transformar conídios de *N. crassa gsn^{rip}* e encontram-se representadas na Figura 7. Para o preparo do plasmídeo pBARGEM7-2 vazio, um fragmento de DNA *Sma*I-*Sma*I de 4.888 bp correspondente à ORF e sua região 5' flanqueadora inteira e parte da região 3'-flanqueadora foi removido do clone IV9A-1 e o vetor restante foi recircularizado.

4.2. Transformação de conídios e seleção dos transformantes

As construções plasmidiais no vetor pBARGEM7-2 foram usadas para transformar a linhagem mutante do fungo, através de eletroporação dos conídios, de acordo com o protocolo descrito por BORKOVICH & VOLLMER (http://www.brinkmann.com/ELEC_appl_neurospora.asp). Para isso, *N. crassa gsn^{rip}* foi cultivada durante 10 dias em meio VM sólido. Os conídios foram coletados, lavados primeiro com água estéril gelada e em seguida, com uma solução de sorbitol 1 M estéril gelada, a 4.000 rpm/4°C/10 min. O precipitado contendo os conídios foi resuspenso em 1 mL da solução de sorbitol 1 M, na concentração de 2×10^7 conídios/mL.

Cerca de 1 µg de cada uma das construções plasmidiais foi utilizada para transformar 100 µL da suspensão de conídios recém-preparada. A transformação foi realizada por eletroporação em cubetas de 0,2 cm, em um eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad), a 25 µF de capacitância, 300 Ω de resistência e 2000 V. Após o pulso elétrico, as cubetas foram acrescidas de 900 µL de uma solução de sorbitol 1 M gelado, homogeneizadas e adicionadas em ágar de regeneração contendo meio Vogel *N-free* (*top agar*), homogeneizadas e imediatamente espalhadas na superfície de placas contendo meio Vogel *N-free* sólido (*bottom agar*), acrescido de 2% sorbose (para induzir o crescimento colonial) e 250 µg/mL de glufosinato de amônio. Como controle negativo da eletroporação, conídios de *N. crassa* também foram eletroporados com água estéril. As placas foram incubadas a 30°C, as colônias crescidas isoladas foram transferidas para tubos contendo meio VM sólido sem sorbose e cultivadas durante 10 dias para obtenção de conídios. Os conídios foram posteriormente utilizados para rastrear os clones quanto à capacidade de acumular glicogênio.

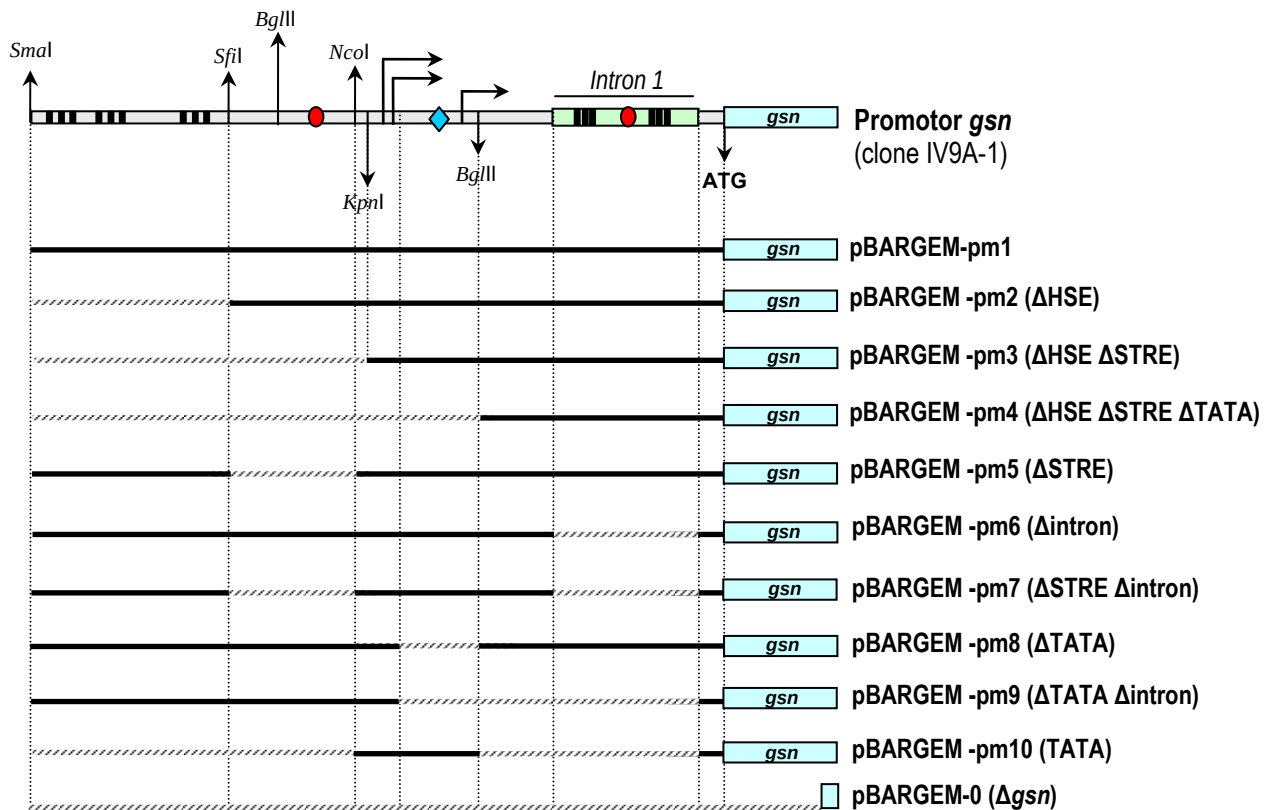


Figura 7. Construções plasmidiais para a análise da região promotora do gene *gsn* e parte da região codificadora da enzima glicogênio sintase de *N. crassa*. Estruturas esquemáticas das construções utilizadas para determinação do promotor basal no fungo, utilizando o vetor pBARGEM7-2. A localização dos sítos de restrição, dos elementos transcricionais *cis* e dos três prováveis sítios de início de transcrição (TIS) encontram-se representados na região promotora do gene. As regiões hachuradas representam as seqüências nucleotídicas removidas do promotor *gsn*. ■ intron 1; ■ elementos HSE; ● elementos STRE; ◆ TATA-box *motif*; ↗ prováveis TIS.

4.3. Determinação qualitativa do conteúdo de glicogênio nos transformantes de *N. crassa*

A inativação do gene *gsn* por RIP foi feita utilizando-se como linhagem receptora no cruzamento uma linhagem de *N. crassa* (Bat9-5a), temperatura sensível, que apresenta crescimento colonial em temperaturas maiores ou iguais a 32°C. Desse modo, os transformantes obtidos foram cultivados durante 10 dias em tubos contendo VM sólido sem sorbose, para permitir o crescimento micelial e conidiação. Suspensões conidiais em água estéril de cada clone obtido foram preparadas e 10 µL de cada uma delas foram aplicados em placas de meio VM sem sorbose. A placa foi incubada a 37°C/48 h e ao final deste período, o conteúdo de glicogênio de cada clone foi analisado qualitativamente expondo as colônias dos transformantes aos vapores de iodo durante 5 min. Uma amostra a linhagem *gsn^{rip}* parental foi ensaiada, juntamente com os clones obtidos após a transformação, como controle negativo do acúmulo de glicogênio.

5. Isolamento de proteína(s) nuclear(es) que ligam ao elemento *STRE1* do promotor *gsn*

Como a expressão do gene *gsn* mostrou ser regulada negativamente na condição de choque térmico, seria importante determinar quais são as proteínas que ligam a região promotora do gene e regulam a expressão nesta situação de estresse. Em 2004, nosso laboratório teve aprovada uma proposta no Laboratório de Massa do LNLS (Campinas, SP), cujo objetivo principal era a identificação da(s) proteína(s) nuclear(es) que reconhece(m) e liga(m) no elemento STRE do promotor *gsn* através de espectrometria de massa. Esta parte do trabalho foi inicialmente realizada, obedecendo as etapas de identificação descritas por HANDEN & ROSENBERG (1997), que são o fracionamento do extrato nuclear bruto obtido após choque térmico por cromatografia de afinidade, seguida de *SouthWestern blotting* e espectrometria de massas das frações identificadas. Atualmente, ampliamos nossa estratégia de identificação, incluindo abordagens como ensaios de EMSA acoplados a SDS-PAGE e focalização isoeletrica acoplada a EMSA e eletroforese 2D (Figura 8). Atualmente, as análises de espectrometria de massas contam com a colaboração do Prof. Dr. Jonas Peralez, do Departamento de Farmacologia e Toxinologia da Fundação Osvaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

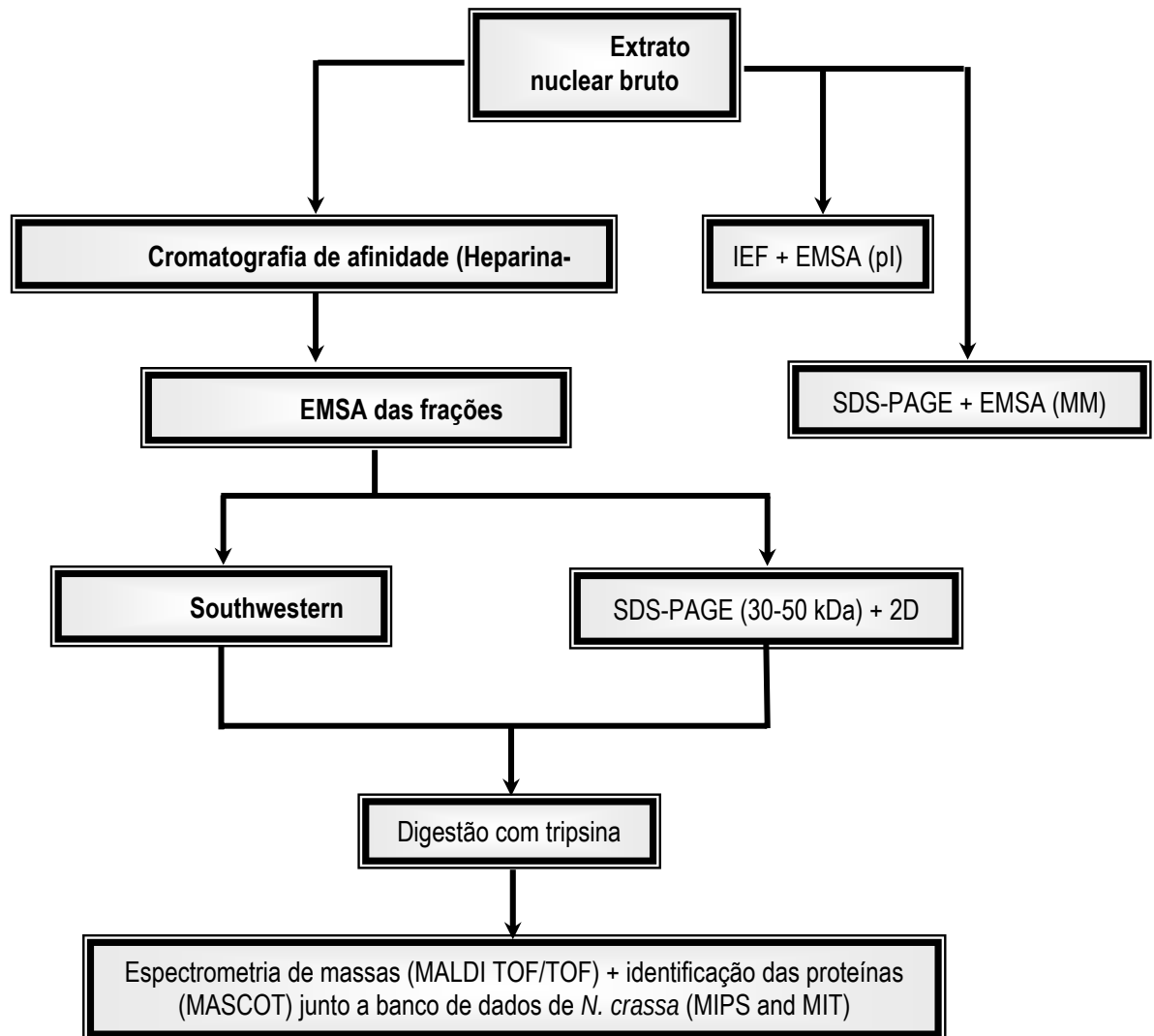


Figura 8. Representação esquemática da estratégia proteômica adotada para a identificação da(s) proteína(s) nuclear(es) de *N. crassa* que reconhecem e ligam o elemento STRE do promotor *gsn*.

5.1. Fracionamento do extrato nuclear por cromatografia de afinidade e análise das frações coletadas por EMSA

Extrato nuclear da fração HS30 recém-preparado foi fracionado em coluna de Heparina-Sepharose (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão D, acrescido de 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 50 mM NaF, 0,5 mM EDTA pH 8,0 e 25 mM benzamidina. As proteínas ligadas à coluna foram eluídas em um gradiente linear de KCl a 1,5 M, preparado em tampão D e as frações contendo as proteínas que reconhecem e ligam à sonda STRE1 foram identificadas através de ensaios de EMSA, como descrito anteriormente.

5.2. Southwestern Blotting

Alíquotas de cada uma das frações contendo as proteínas que ligam no consenso STRE do promotor *gsn* foram separadas através de SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970). Após a separação, um dos géis foi corado com *Coomassie Blue*, enquanto que as proteínas contidas no gel não corado foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em tampão de transferência e a eletrotransferência foi confirmada pela coloração com Ponceau-S. Em seguida, a membrana foi totalmente descorada em tampão AC e as proteínas imobilizadas foram renaturadas diretamente sobre a membrana, de maneira gradual segundo protocolo descrito por SCHWARTZ *et al.* (2001) com soluções tampões contendo uréia em diferentes concentrações, como descrito na Tabela 2.

A membrana contendo as proteínas renaturadas foi inicialmente pré-hibridizada em tampão de ligação para EMSA 1x, acrescido de 5% de leite em pó desnatado, DNA esperma de salmão previamente desnaturado e DTT 1 M (4°C/16 h/50 rpm). Após a pré-hibridização, a membrana foi hibridizada em tampão de ligação para EMSA 1x, acrescido de leite em pó desnatado, DTT 1 M e aproximadamente 10^5 - 10^6 cpm da sonda STRE marcada (4°C/50 rpm/16 h). Após a hibridização, a membrana foi lavada três vezes com solução contendo tampão de ligação para EMSA 1x, acrescido de leite em pó desnatado e em seguida, exposta ao filme de raios-X. Após identificação das bandas de hibridização na autoradiografia, as bandas correspondentes foram identificadas no gel corado com *Coomassie*, removidos e as proteínas submetidas à digestão com tripsina para análise por espectrometria de massas.

5.3. Estimativa do *PM* e *pI* da(s) proteína(s) alvo(s)

Para estimar a massa molecular das proteínas alvo, o extrato nuclear bruto da fração HS30 foi fracionado por SDS-PAGE em géis 10% e após eletroforese, o gel foi cortado uniformemente em pedaços correspondendo a diferentes intervalos de massa molecular. Os

TABELA 2- Soluções utilizadas no *Southwestern blotting*, nas etapas de desnaturação e renaturação das proteínas imobilizadas na membrana de nitrocelulose

SOLUÇÃO DE RENATURAÇÃO*	CONCENTRAÇÃO DE URÉIA				
	6 M	3 M	1 M	0,1 M	2% LEITE EM PÓ DESNATADO
Glicerol	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL	2,5 mL
4 M NaCl	625 µL	625 µL	625 µL	625 µL	625 µL
0,5 M Tris-HCl pH 7,5	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
0,5 M EDTA pH 8,0	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
10%Tween 20	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL	250 µL
8 M uréia	18,75 mL	9,3 mL	3,13 mL	310 µL	-
Leite em pó desnatado	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g	0,5 g
1 M DTT	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL	25 µL
H ₂ O destilada	2,45 mL	12,82 mL	18,07 mL	20,89 mL	21,2 mL
Condições da lavagem**	30 min/TA#	30 min/TA	30 min/4°C	30 min/4°C	4°C/noite

*Os volumes finais das soluções de renaturação foram de 25 mL para cada uma das lavagens. **As lavagens foram feitas sob suave agitação (~50 rpm). #TA- temperatura ambiente.

pedaços de gel foram macerados com pistilo de polietileno na presença de 1,5 volumes de tampão de renaturação e incubados durante uma noite a 4°C. O sobrenadante foi separado por centrifugação e analisado para atividade de ligação ao elemento STRE do promotor *gsn* por EMSA. Os intervalos de massa molecular foram determinados com a ajuda do marcador de peso molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen).

Para a determinação do ponto isoeletrico das proteínas alvo, o extrato nuclear bruto da fração HS30 foi precipitado com o kit 2-D CleanUp (GE HealthCare), as proteínas precipitadas foram dissolvidas em solução de reidratação contendo 2% da mistura de anfólitos (IPG Buffer 3-10 linear, GE HealthCare), aplicada sob IPG Strips (3-10 linear, 13 cm, GE HealthCare) e submetidas à focalização isoeletrica (IPGPhor, GE HealthCare), nas seguintes condições: 10 h de reidratação; 20°C; 50 mA/strip; 100 V/100 Vh; 250 V/250 Vh; 500 V/1000 Vh; 1000 V/ 2000 Vh; 2000 V/5000 Vh; 8000 V/60.000 Vh. Após a focalização isoeletrica, as *strips* foram equilibradas em solução de equilíbrio sem uréia, os géis foram cortados em intervalos uniformes de pI, os pedaços de gel foram macerados com pistilos de polietileno na presença de 2 volumes de tampão de renaturação e incubados durante uma noite a 4°C. O sobrenadante foi separado por centrifugação e ensaiado para atividade de ligação ao elemento STRE do promotor *gsn* por EMSA.

5.4. SDS-PAGE acoplado à eletroforese bidimensional

O extrato nuclear HS30 foi primeiramente fracionado em coluna de Heparina-Sepharose (HiTrap Heparin HP, GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão D, e as frações contendo as proteínas eluídas que reconhecem e ligam à sonda STRE foram identificadas através de ensaios de EMSA, como descrito anteriormente. Em seguida, as frações apresentando maior atividade de ligação DNA-proteína(s) foram combinadas e fracionadas através de SDS-PAGE em géis 10%, utilizando o padrão de massa molecular BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder (Invitrogen). Após eletroforese, a região correspondendo ao intervalo de massa molecular entre 30 e 50 kDa foi excisada do gel, colocada em um saco de diálise contendo 500 µL de tampão de transferência para Southwestern recém preparado e as proteínas contidas no gel foram eletroeluídas a 20V durante uma noite. No dia seguinte, a solução tampão contendo as proteínas eletroeluídas foi coletada, precipitada com o kit 2-D CleanUp (GE HealthCare), as proteínas precipitadas foram dissolvidas em tampão de reidratação contendo 2% da mistura de anfólitos (IPG Buffer 3-10 linear, GE HealthCare), aplicadas sob IPG Strips (3-10 linear, 13 cm, GE HealthCare) e submetidas à focalização isoeletrica (IPGPhor, GE HealthCare), nas seguintes condições: 10 h de reidratação; 20°C; 50 mA/strip; 100 V/100 Vh; 250 V/250 Vh; 500 V/1000 Vh; 1000 V/ 2000 Vh; 2000 V/5000 Vh; 8000 V/60.000 Vh. Após a focalização, a strip foi primeiramente equilibrada durante 15 min com 5 mL de tampão de equilíbrio contendo DTT (100 mg DTT/ 10

mL solução equilíbrio) e em seguida, durante 15 min com 5 mL de tampão de equilíbrio contendo IAA (250 mg IAA/10 mL de solução de equilíbrio). A strip equilibrada foi aplicada sobre um gel de poliacrilamida desnaturante 12,5% (29:1), de 1,0 mm de espessura, selada com agarose e submetida a eletroforese a 45 mA/15°C por aproximadamente 3 h, em tampão Tris-glicina 1x, utilizando o padrão de massa molecular BenchMark™ Protein Ladder (Invitrogen). Após eletroforese, o gel foi corado com *Coomassie Blue*, as proteínas foram removidas do gel, digeridas com tripsina e os peptídeos tripticos foram submetidos à espectrometria de massas.

5.5. *Espectrometria de massa através de ionização por dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI)*

As proteínas foram removidas dos géis corados com *Coomassie Blue* e submetidas à digestão com tripsina conforme procedimento descrito a seguir. Os peptídeos tripticos resultantes foram analisados num espectrômetro de massa (Applied Biosystem), utilizando MALDI, com varredura de íons fragmentos (TOF/TOF). As massas obtidas dos peptídeos foram analisadas no programa MASCOT (www.matrixscience.com), utilizando a base de dados de *N. crassa*, com tolerância de ± 1 Da dos picos monoisotópicos ($p < 0,05$) e perda de apenas um sítio de clivagem pela tripsina.

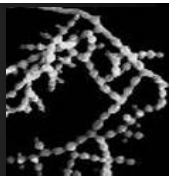
5.5.1. *Redução e alquilação das proteínas in gel (apenas para amostras que não foram tratadas previamente com agentes redutores e alquilantes)*

As bandas dos géis de SDS-PAGE contendo as proteínas de interesse foram removidas com o auxílio de agulhas estéreis e colocadas em tubos eppendorfs limpos, previamente tratados com metanol. Em seguida, os géis foram lavados várias vezes com uma solução contendo NH_4HCO_3 0,025 M em ACN 50%, pH 8,0 até que todo o *Coomassie Blue* fosse removido. Os géis incolores foram então secos em Speed-Vac e as proteínas neles contidas foram reduzidas com uma solução recém preparada contendo DTT 0,01 M em NH_4HCO_3 0,025 M, pH 8,0, em quantidade suficiente para cobrir o gel, a 58°C durante 45 min. Em seguida, a solução contendo DTT foi removida e as amostras foram alquiladas com uma solução recém preparada contendo IAA 0,055 M em NH_4HCO_3 0,025 M, pH 8,0, em quantidade suficiente para cobrir o gel, em temperatura ambiente durante 45 min, no escuro. A solução contendo IAA foi removida e os géis tratados foram lavados com 100 μL de uma solução NH_4HCO_3 0,025 M, pH 8,0 para remoção dos resíduos de agentes redutores e alquilantes. Em seguida, os géis foram lavados 3 vezes com 100 μL de uma solução NH_4HCO_3 0,025 M em ACN 50%, pH 8,0, desidratados totalmente com 100 μL de ACN 100% e secos em Speed-Vac.

5.5.2. Digestão das proteínas in gel e extração dos peptídeos trípticos

Os géis desidratados foram reidratados com 20 µL de uma solução gelada de tripsina (15 µg/mL em tampão NH_4HCO_3 0,025 M, pH 8,0) (*Trypsin Gold*, Promega) e incubados a 4°C durante 10 min. Em seguida, as amostras foram adicionadas de 30 µL de tampão NH_4HCO_3 0,025 M, pH 8,0 e digeridas a 37°C, durante 20 h. Após a digestão, as amostras foram adicionadas de 50 µL de uma solução contendo ACN 50% e TFA 5% e os peptídeos trípticos foram extraídos durante 30 min, sob agitação suave em vortex. Os sobrenadantes foram recolhidos em tubos eppendorf limpos, os géis foram novamente extraídos como na primeira vez e os sobrenadantes foram combinados e tiveram seus volumes reduzidos em Speed-Vac. As amostras coletadas foram armazenadas a -20°C e posteriormente foram submetidas à análise por espectrometria de massas.

Resultados



1- Interação entre proteínas nucleares e os elementos transcrpcionais *STRE* e *HSE* do promotor *gsn* na situação de choque térmico

DE PAULA *et al.* (2002) demonstraram que quando células de uma linhagem selvagem de *N. crassa* foram submetidas ao estresse térmico de 45°C, os níveis do transcrito *gsn* sofreram drástica redução, mas retomam seus níveis normais assim que as células estressadas são re-incubadas em sua temperatura fisiológica de crescimento (30°C). Para investigar se o elemento STRE1 encontrado no promotor *gsn* participa da resposta do gene *gsn* ao estresse térmico, construímos uma sonda de DNA contendo o elemento STRE1 (158 bp), a qual foi usada nos ensaios de EMSA juntamente com extrato nuclear de uma linhagem selvagem, preparado com micélio submetido a 15 (HS15) e 30 (HS30) minutos de choque térmico.

Após a incubação dos extratos com a sonda foi possível observar a formação de complexos DNA-proteína de alto peso molecular (Fig. 9B, linhas 4 e 6, respectivamente) e a especificidade destes complexos pôde ser verificada quando os extratos foram incubados previamente na presença do competidor específico STRE1 (Fig. 9B, linhas 5 e 7). A especificidade da ligação STRE1-proteína(s) também pode ser comprovada através de outros ensaios de competição. Em um deles, a ligação de proteínas ao elemento STRE1 mostrou não ser afetada pela adição prévia do competidor específico HSE1 (ensaio de competição cruzada com os elementos HSE1) na reação (Fig. 9C, linha 4). Em outro ensaio, oligonucleotídeos de DNA dupla fita contendo o *core* do elemento STRE1 (oligo STRE1) também foram usados como competidores específicos na reação de ligação. A adição prévia do oligo STRE1 como competidor específico na reação de ligação, foi capaz de reduzir significativamente a formação do complexo DNA-proteína(s) observada para a sonda STRE1 (Fig. 9C, comparar linhas 4 e 5), confirmando de outra maneira a especificidade desta ligação. Numa última tentativa de garantir a especificidade do complexo, foram realizados ensaios de mobilidade em gel, utilizando como sonda de DNA, o elemento STRE1 inteiramente mutado na sua seqüência. Na Fig. 9D é possível observarmos claramente que nenhum complexo DNA-proteína foi detectado nesta condição (comparar Fig. 9D, linha 2 com Fig. 9C, linha 2). Estes resultados permitiram concluir que o *core* do elemento STRE1 localizado no promotor *gsn* é suficiente para permitir a ligação de proteína(s) nuclear(es) ativadas na situação de choque térmico.

Os elementos regulatórios HSE do promotor *gsn* também foram analisados quanto à atividade de ligação com proteína(s) nuclear(es) ativadas após choque térmico. Inicialmente, um fragmento do promotor *gsn* com aproximadamente 560 bp (sonda HSE) foi analisado por EMSA. A incubação da sonda HSE com extratos HS15 e HS30 resultou em bandas de DNA de mobilidade reduzida para ambos os extratos testados (Fig. 10B, linhas 4 e 6). A formação

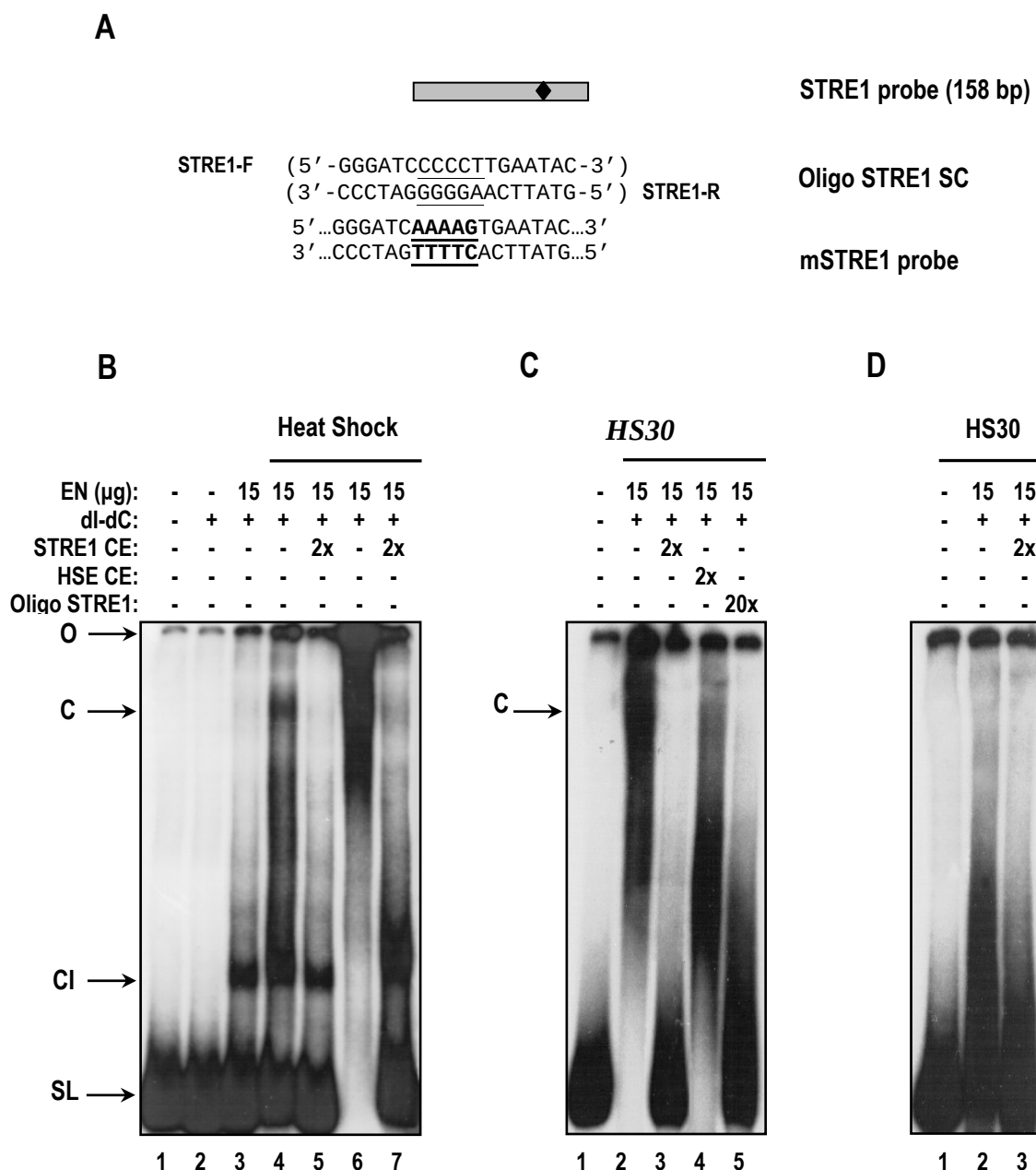


Figura 9. Ligação de proteína(s) nuclear(es) ao elemento STRE1 (♦) do promotor *gsn*. **(A)** Representação esquemática da sonda utilizada. **(B)** EMSA utilizando a sonda STRE1 e extratos nucleares HS15 e HS30. 1- sonda STRE1, sem adição de extrato, 2- controle negativo, 3- extrato antes do choque térmico; 4 e 5- extrato HS15, 6 e 7- HS30. **(C)** Ligação específica da(s) proteína(s) do extrato HS30 ao elemento STRE1. 1- sonda STRE1, sem adição de extrato, 2- EMSA utilizando extrato HS30 e a sonda STRE1, 3, 4 e 5- EMSA na presença dos competidores específicos STRE1 (3), HSE (4) e oligo STRE1 (5), respectivamente. **(C)** EMSA do extrato HS30 utilizando como sonda o elemento STRE1 mutado. 1- sonda mSTRE1, sem adição de extrato, 2 e 3- EMSA na ausência (2) e na presença (3) do competidor específico mSTRE1, respectivamente. **EN-** extrato nuclear, **CE-** competidor específico, **O-** origem do gel, **C-** complexo DNA-proteína, **CI-** complexo DNA-proteína inespecífico, **SL-** sonda livre.

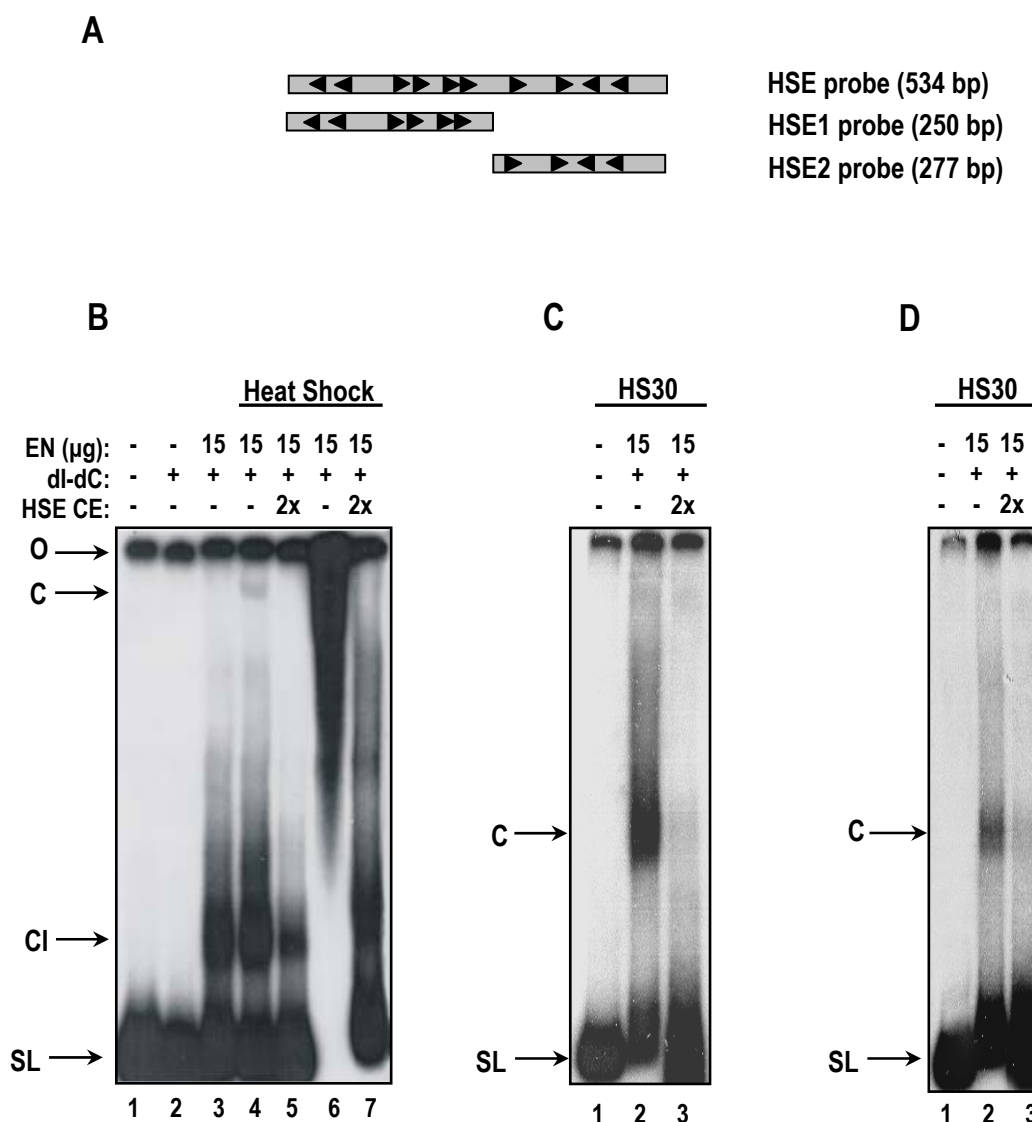


Figura 10. Ligação de proteína(s) nuclear(es) aos elementos HSE (►) do promotor *gsn*. **(A)** Representação esquemática das sondas utilizadas. **(B)** EMSA utilizando a sonda HSE inteira e os extratos nucleares HS15 e HS30. **1-** sonda HSE, sem adição de extrato, **2-** controle negativo, **3-** extrato antes do choque térmico, **4 e 5-** extrato HS15, **6 e 7-** extrato HS30. **(C e D)** Ligação específica da(s) proteína(s) do extrato HS30 aos elementos HSE das sondas HSE1 e HSE2, respectivamente. **1-** sonda HSE, sem adição de extrato, **2-** extrato nuclear HS30, **3-** EMSA na presença dos competidores específicos para as sondas HSE. **C-** complexo DNA-proteína, **CI-** complexo DNA-proteína inespecífico **EN-** extrato nuclear, **CE-** competidor específico, **O-** origem do gel, **SL-** sonda livre.

destes complexos mostrou ser específica quando o competidor específico HSE foi previamente adicionado à reação de ligação (Fig. 10B, linhas 5 e 7). Devido ao seu tamanho inicialmente testado, a sonda HSE foi dividida em duas sondas menores, abrigando regiões denominadas HSE1 e HSE2, as quais foram analisadas individualmente. Complexos DNA-proteína(s) de mobilidade reduzida foram observados para ambas as sondas testadas (Fig. 10C e 10D, linha 2), e a formação destes complexos foi confirmada pela adição prévia dos respectivos competidores específicos para as sondas HSE1 e HSE2 (Fig. 10C e 10D, linha 3). Desta forma, concluímos que os elementos HSE contidos no promotor *gsn* foram reconhecidos e ligados por proteína(s) nuclear(es) presentes no extrato de *N. crassa* após choque térmico.

2- Reconhecimento dos elementos regulatórios HSE e STRE localizados no intron1 da região 5'-UTR do gene *gsn* por proteínas nucleares de choque térmico

Durante o trabalho de Mestrado, a presença de um *intron* com 482 bp na região 5'-UTR do gene *gsn* foi demonstrada após comparação da sequência nucleotídica do gene *gsn* com a sequência do cDNA depositada (FREITAS, 2001). A fim de estabelecermos uma correlação entre a presença do *intron1* na região 5'-UTR do gene *gsn* e a modulação da transcrição do gene *gsn*, foram realizados ensaios de EMSA utilizando a sonda HSEi/STRE2 e extratos nucleares de células do fungo submetidas ou não ao choque térmico.

Os ensaios de mobilidade em gel permitiram observar a formação de complexos DNA-proteínas de mobilidade reduzida tanto para o extrato nuclear não submetido ao choque térmico (amostra ZERO) quanto para os extratos nucleares de choque térmico HS15 e HS30 (Fig. 11B, linhas 2, 4 e 6, respectivamente). As suas especificidades foram confirmadas pela adição prévia do competidor específico HSEi/STRE2 nas reações de ligação (Fig. 11B, linhas 3, 5 e 7, respectivamente). A presença de complexos de mobilidade reduzida para os extratos nucleares preparados com micélio não submetido ao choque térmico assim como para os extratos preparados com micélios submetidos ao choque térmico, sugere a participação dos elementos transcrpcionais regulatórios localizados no *intron1* no controle tanto da transcrição gênica durante o crescimento vegetativo do fungo quanto durante o choque térmico.

Devido ao seu tamanho, a sonda HSEi/STRE2 foi subdividida em duas regiões menores contendo os elementos HSEi e STRE2 isolados, o que nos permitiu analisá-los separadamente quanto às suas atividades de ligação (Fig. 11C e 11D). Para os ensaios de mobilidade em gel usando a sonda HSEi, bandas de DNA de mobilidade reduzida foram observadas tanto para o extrato tempo ZERO (Fig. 11C, linha 2, C1) quanto para o extrato

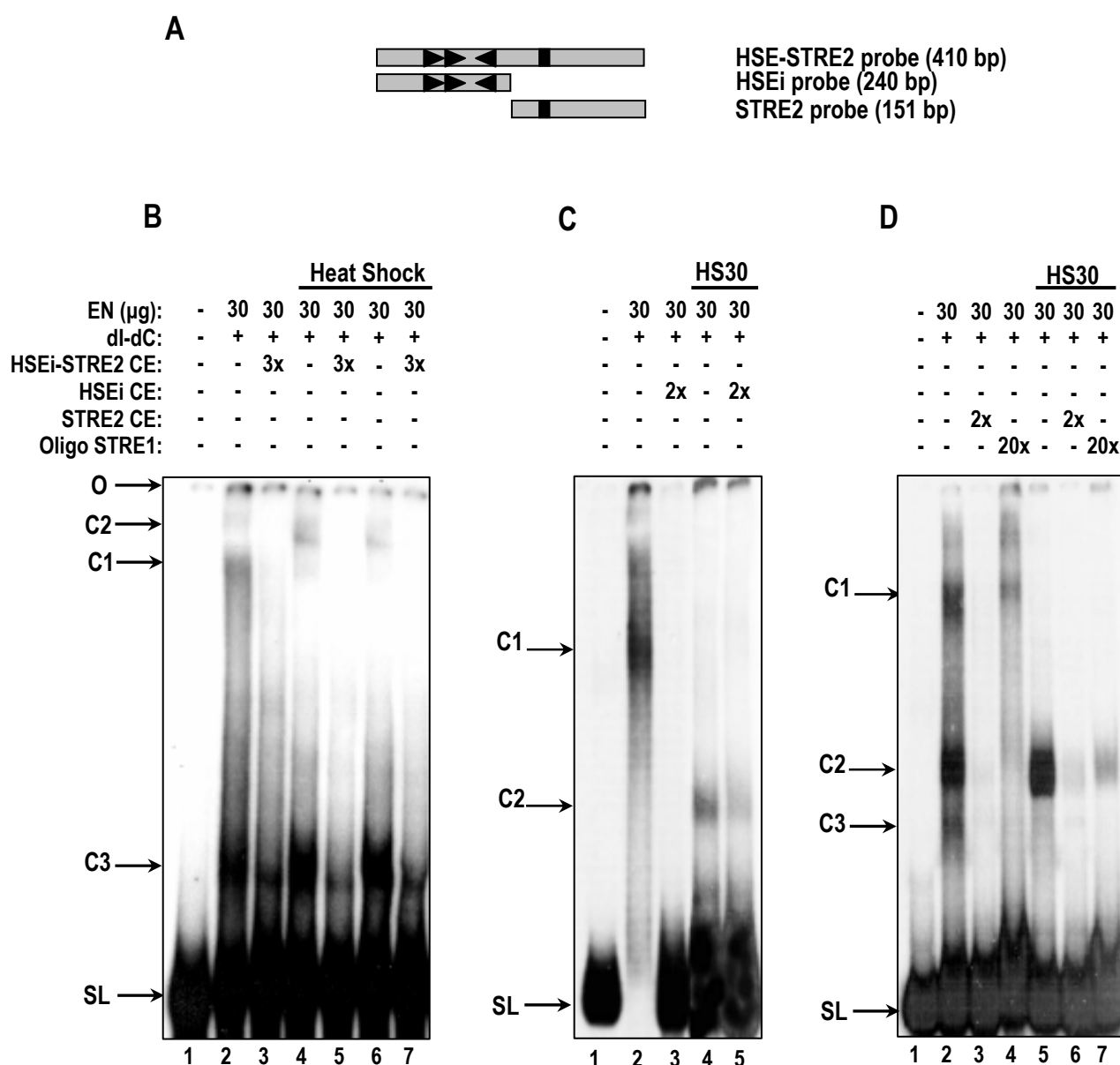


Figura 11. Interação entre as proteínas nucleares de *N. crassa* e os elementos HSEi (►) e STRE2 (■) presentes no *intron* 1 do gene *gsn*. **(A)** Esquema representativo das sondas usadas. **(B)** EMSA usando a sonda HSEi/STRE2 e extratos nucleares de *N. crassa* obtidos na situação de choque térmico. 1- sonda HSEi/STRE2, sem adição de extrato; 2 e 3- extrato antes do choque térmico; 4 e 5- extrato HS15; 6 e 7- extrato HS30. **(C)** EMSA utilizando a sonda HSEi e extrato HS30 de *N. crassa*. 1- sonda HSEi, sem adição de extrato, 2 e 3- extrato nuclear tempo ZERO, 4 e 5- extrato HS30. **(D)** EMSA utilizando a sonda STRE2 e extrato HS30 de *N. crassa*. 1- sonda STRE2, sem adição de extrato, 2, 3 e 4- EMSA utilizando extrato nuclear tempo ZERO, 5, 6 e 7- extrato HS30. C1, C2 e C3- complexos DNA-proteína específicos, EN- extrato nuclear, CE- competidor específico. O- origem do gel; SL- sonda livre.

HS30 (Fig. 10C, linha 4, C2). Estes complexos tiveram suas especificidades comprovadas com a adição prévia do competidor específico HSEi (Fig. 10C, linhas 3 e 5, respectivamente). Também foram observados complexos DNA-proteína(s) de mobilidade reduzida para a sonda STRE2, tanto para o extrato nuclear tempo ZERO (Fig. 10D, linha 2, C1 e C2) quanto para o extrato HS30 (Fig. 10D, linha 5, C2). A formação destes complexos foi impedida pela adição prévia do competidor específico STRE2 às reações de EMSA (Fig. 10D, linhas 3 e 6, respectivamente), comprovando assim suas especificidades. A especificidade da formação do complexo STRE2-proteína(s) também foi analisada pela adição prévia do oligo STRE1 como competidor específico na reação de ligação. A presença do oligo STRE1 como competidor nas reações usando o extrato tempo ZERO impediu completamente a formação do complexo C2 e parcialmente a formação do complexo C1 (Fig. 10D, linha 4). Quando o extrato HS30' foi utilizado, a adição do oligo STRE1 à reação também foi capaz de reduzir a formação do complexo C2 (Fig. 10D, linha 7). Estes resultados mostraram de maneira bastante clara o envolvimento dos elementos regulatórios HSEi e STRE2 na formação dos complexos observados, através da ligação de proteínas nucleares ativadas ou não por choque térmico. Uma vez que o extrato tempo ZERO também contribuiu para a formação de complexo DNA-proteína(s) de mobilidade reduzida, concluímos que o *intron1* do gene *gsn* deve possuir papel importante na regulação da transcrição do mesmo na situação de crescimento vegetativo do fungo.

3- Interação de proteínas nucleares e o elemento de transcrição STRE da região 3' flanqueadora do gene gsn na situação de choque térmico

O objetivo de analisarmos o elemento STRE3, localizado 120 bp downstream ao sítio de poliadenilação na região 3'-flanqueadora do gene *gsn* foi o de tentar estabelecer uma correlação entre a presença deste elemento e a regulação da transcrição na situação de estresse estudada. Apesar de não termos encontrado na literatura muitos estudos envolvendo elementos transcripcionais localizados nas extremidades 3' de genes, o *core* deste elemento apresentou alta identidade quando comparado com os elementos STRE da matriz de fungos presente na base de dados TRANSFAC.

Para isto, ensaios de EMSA utilizando extratos nucleares de células do fungo submetidas ao choque térmico e a sonda STRE3 contendo aproximadamente 120 bp foram realizados. A formação de complexos DNA-proteínas de mobilidade reduzida pôde ser observada quando extratos nucleares HS30 foram usados (Fig. 12B, linhas 4 e 6) e suas especificidades foram confirmadas pela adição do competidor específico para a sonda

STRE3, antes do ensaio de ligação (Fig. 12B, linhas 5 e 7). Os complexos DNA-proteínas observados para a amostra ZERO (Fig. 12B, linha 2) também tiveram suas especificidades confirmadas pela adição prévia do competidor específico (Fig. 12B, linha 3). Com exceção do complexo C2 (Fig. 12B, linhas 4 e 6) e C3 (Fig. 12B, linhas 2 e 3), os demais complexos (Fig. 12B, complexos C4 e C1) produzidos pelos extratos nucleares preparados a partir de micélio submetido ou não o choque térmico parecem possuir a mesma massa molecular (Fig. 12B, comparar linhas 2, 4 e 6).

*4- Expressão do gene *gsn* e acúmulo de glicogênio em *N. crassa* durante a situação de choque térmico*

DE PAULA *et al.* (2002) haviam mostrado que a redução nos níveis de transcrito *gsn* após choque térmico (30 para 45°C) foi acompanhada por uma redução no conteúdo de glicogênio. Como a temperatura utilizada nos experimentos (45°C) foi alta, seria importante avaliar se a queda no conteúdo do carboidrato era devido à redução no nível de transcrito ou a qualquer outro efeito em nível celular. Para isto, células do fungo foram submetidas a choque térmico em temperaturas variando de 30 a 45°C e a presença de transcrito *gsn* e o conteúdo de glicogênio foram avaliados. Os resultados da hibridização por *Northern blot* permitiram observar que o conteúdo de glicogênio nas células foi reduzido concomitantemente aos níveis de transcrito *gsn*, quando as células do fungo foram submetidas a diferentes aumentos de temperatura (Fig. 13A e 13B). Este tipo de resposta celular demonstrou ser específico, uma vez que a expressão do gene *gpd* permaneceu constante entre 35 e 40°C.

*5- Determinação do promotor basal *gsn* na levedura *S. cerevisiae**

A proposta inicial para a determinação do promotor basal na levedura foi baseada na fusão do promotor *gsn* ou partes dele ao gene *lacZ* de *E. coli*, o qual codifica a enzima β -galactosidase. É sabido que em *S. cerevisiae*, a transcrição de genes responsivos a estresse é ativada através do elemento de transcrição STRE, o qual é reconhecido e ligado por duas proteínas transativadoras *zinc fingers* denominadas Msn2p e Msn4p (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996, SCHMITT & MCENTEE, 1996). Neste ensaio utilizamos uma linhagem de levedura onde os genes codificando os transativadores Msn2p e Msn4p encontram-se inativados por

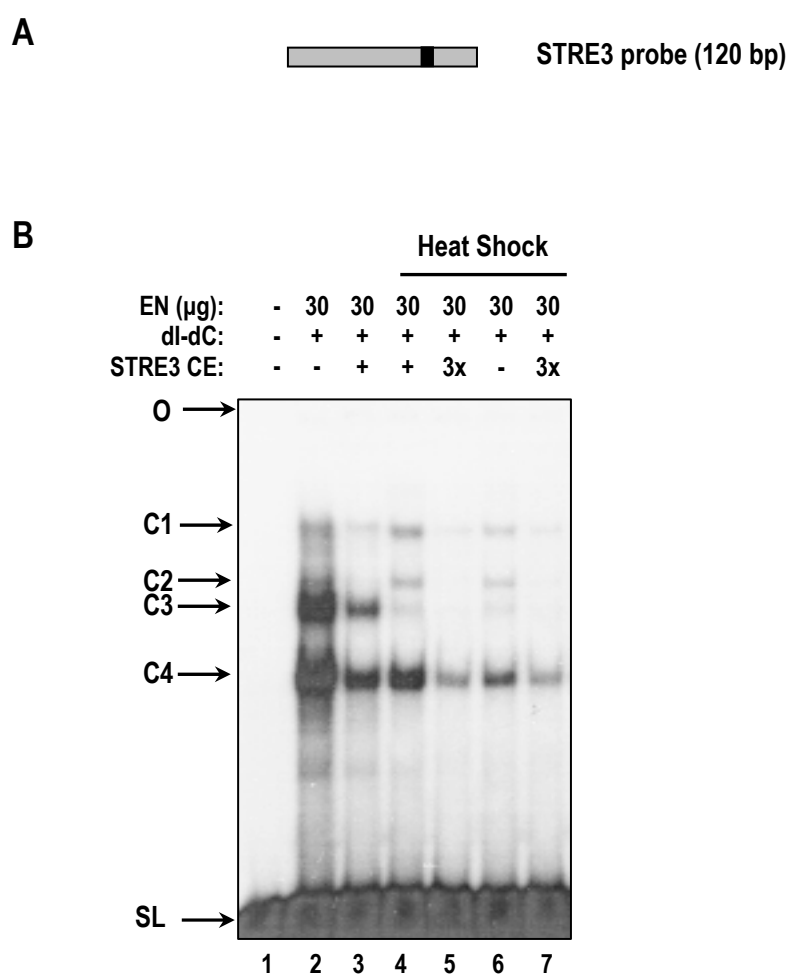


Figura 12. Interação entre as proteínas nucleares de *N. crassa* e o elemento STRE3 localizado na região 3' flanqueadora do gene *gsn*. **(A)** Esquema representativo da sonda STRE3. **(B)** EMSA utilizando extratos nucleares obtidos na situação de choque térmico. **C1, C2, C3 e C4**- complexos DNA-proteínas específicos. **1**- sonda STRE3; sem adição de extrato; **2 e 3**- extrato nuclear tempo ZERO; **4 e 5**- extrato nuclear HS15; **6 e 7**- extrato nuclear HS30. **EN**- extrato nuclear; **CE**- competidor específico; **O**- origem do gel; **SL**- sonda livre.

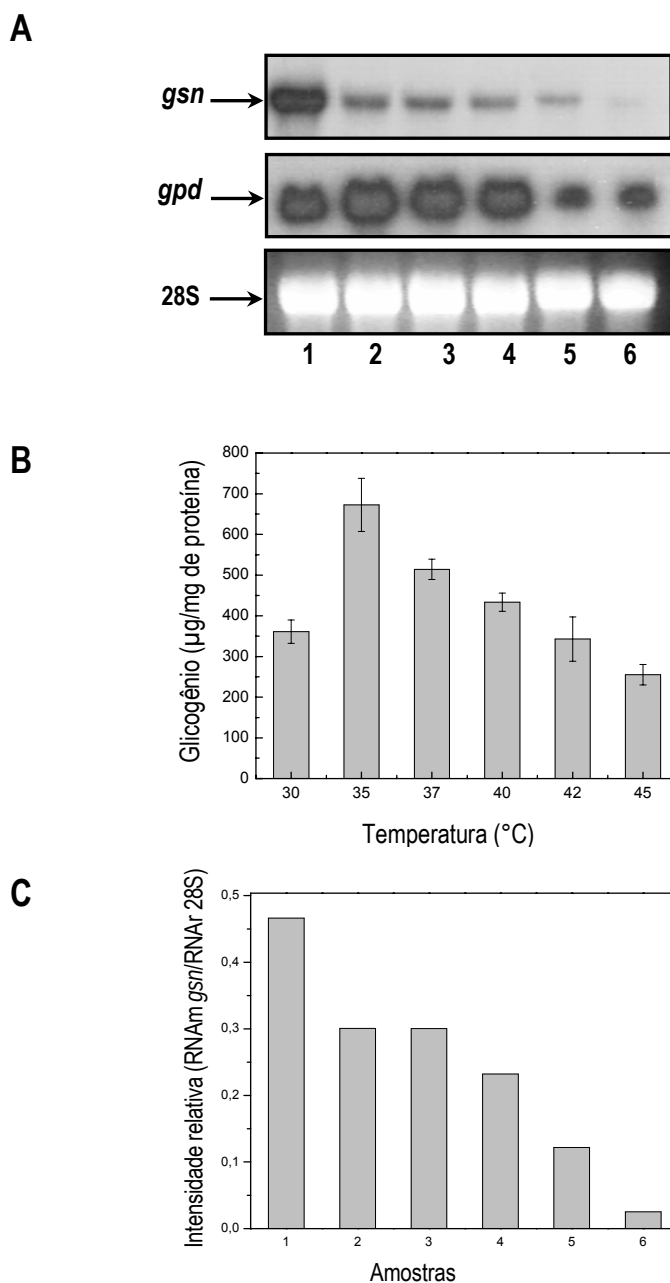


Figura 13. Análise da expressão do gene *gsn* e acúmulo de glicogênio na situação de choque térmico. **(A)** Análise de RNA total de *N. crassa* por *Northern blot*. Aliquotas de micélio cultivado durante 24 h/30°C foram submetidas a diferentes aumentos de temperatura (35, 37, 40, 42 e 45°C, linhas 2 a 6, respectivamente) durante 30 min. As membranas foram hibridizadas com cDNA *gsn* e normalizado com o gene *gpd*. O RNAr 28S foi usado como controle. **(B)** Níveis de glicogênio após os aumentos de temperaturas. Os resultados apresentados acima são a média de três experimentos independentes. **(C)** Análise densitométrica dos transcritos *gsn* (ImageJ Software).

gene knockout (W303-1A $\Delta msn2 \Delta msn4$). Uma linhagem de levedura com o mesmo *background*, mas selvagem para os genes *MSN2* e *MSN4* também foi usada no experimento, como controle interno da reação enzimática.

Plasmídeos contendo como insertos diferentes seqüências da região 5' flanqueadora do gene *gsn* foram utilizados para transformar as linhagens de leveduras e os transformantes obtidos foram analisados qualitativamente quanto à atividade β -galactosidase durante o crescimento a 30°C (Fig. 14A). O ensaio qualitativo foi realizado apenas em transformantes da linhagem selvagem. Enquanto as construções pm1, pm3, pm4, pm5 e pm8 (Fig. 14A, amostras 1, 3, 4, 5 e 8) apresentaram atividade semelhante à do promotor *GSY2* (Fig. 14A, controle positivo), a construção pm10 apresentaram atividade enzimática muito baixa (Fig. 14A, amostra 10). Já as construções pm2, pm6, pm7 e pm9 não apresentaram qualquer atividade β -galactosidase (Fig. 14A, amostras 2, 6, 7 e 9).

Uma análise quantitativa da atividade também foi realizada nas temperaturas de 30 e 42°C. Como era esperado para o promotor *GSY2* (p*GSY2*, controle positivo), a expressão do gene *lacZ* sofre um aumento significativo quando células de levedura linhagem selvagem são submetidas às temperaturas de 37°C e 42°C (choque térmico). O contrário, no entanto, pode ser observado quando células dos transformantes $\Delta msn2 \Delta msn4$, carregando a construção p*GSY2* são submetidas à mesma forma de estresse (Fig. 14B, p*GSY2*). Embora a transcrição do gene *lacZ* dirigida pelas diferentes construções do promotor *gsn* tenha sido bem menor que para o controle p*GSY2*, o mesmo padrão de expressão foi observado. Entretanto, não foi observada transcrição do gene *lacZ* para as construções pm2, pm6, pm7, pm9 e pm10 (Fig. 14B). Os transformantes $\Delta msn2 \Delta msn4$ carregando as construções pm1, pm3, pm4, pm5 e pm8 apresentaram atividade β -galactosidase significativamente reduzida após choque térmico, semelhante ao observado para o promotor *GSY2* (Fig. 14B). A atividade enzimática observada para as construções pm2, pm6, pm7, pm9 e pm10 foi semelhante ao controle (plasmídeo vazio) tanto para os transformantes da linhagem selvagem quanto para os transformantes da linhagem mutante (Fig. 14B).

Estes resultados mostraram que a região 5' flanqueadora do gene *gsn*, mais especificamente os elementos regulatórios *cis* presentes nesta região, são capazes de serem reconhecidos por fatores de transcrição de *S. cerevisiae*, uma vez que a construção pm1 apresentou atividade β -galactosidase semelhante à apresentada pelo controle positivo p*GSY2*, apenas em proporções menores, nas duas linhagens utilizadas (Fig. 14B, comparar p*GSY2* com pm1). A região contendo os elementos HSE pareceu ser importante para modular o evento de transcrição na levedura, uma vez que a construção pm2 não apresentou atividade β -galactosidase tanto qualitativa como quantitativa (Fig. 14A e 14B, comparar amostra 2 com construção pm2). A transcrição retomou níveis semelhantes aos encontrados para a construção pm1, quando a deleção se estendeu até a região contendo o elemento

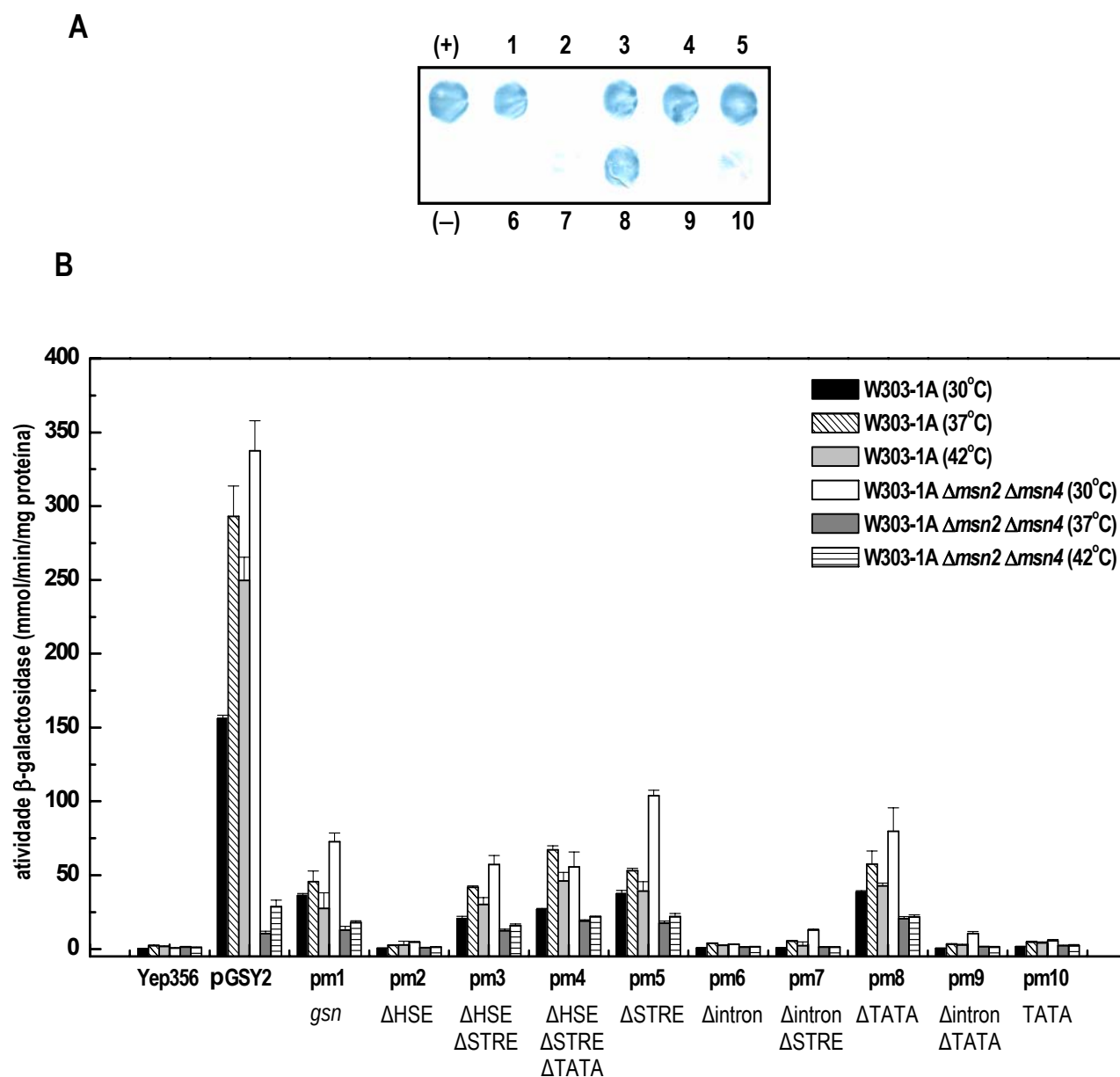


Figura 14. Atividade β -galactosidase dos transformantes de *S. cerevisiae* para a determinação do promotor basal *gsn*. **(A)** Ensaio qualitativo para determinar a atividade β -galactosidase. O ensaio foi realizado em filtros de nitrocelulose, utilizando X-Gal (20 mg/mL) como substrato cromogênico. (+) controle positivo (Yep-pGSY2), (-) controle negativo (Yep356 vazio), **1 a 10**- Yep356 contendo as construções do promotor basal *gsn* pm1 a pm10. **(B)** Ensaio quantitativo da atividade β -galactosidase. O ensaio foi realizado utilizando ONPG (4 mg/mL) como substrato cromogênico. A atividade enzimática é dada em mmol/min/mg proteínas totais e os resultados apresentados representam a média de três experimentos independentes.

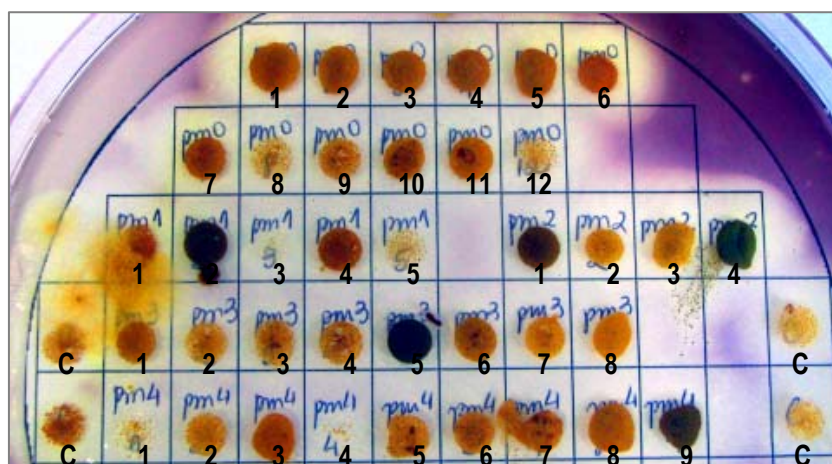
STRE *upstream* ao TATA box.

A ausência de atividade enzimática para as construções pm6, pm7, pm9 e pm10 assim como a presença de atividade para a construção pm4 permitiu concluir que o *intron1* contido na região 5'-UTR do gene *gsn* é essencial para o evento de transcrição na levedura (Fig. 14A, comparar as amostras 6, 7 e 9 com a amostra 4 e Fig. 14B, comparar construções pm6, pm7, pm9 e pm10 com a construção pm4). A importância deste *intron* no crescimento vegetativo de *N. crassa* também já havia sido observada em nosso laboratório em outro tipo de experimento. Os resultados de promotor basal, embora realizados em *S. cerevisiae* validam os resultados obtidos nos ensaios de EMSA utilizando como sonda a sequência inteira do *intron1*, nos quais foi demonstrado que existem proteínas nucleares presentes no extrato preparado com micélios da amostra ZERO que são capazes de reconhecer elementos *cis* presentes no *intron1* (Fig. 11D, linha 2). Além disso, a presença de atividade enzimática na construção pm8 (onde o elemento TATA-box encontra-se removido) sugere fortemente que este consenso não participa da transcrição gênica na levedura, fato que pôde ser confirmado pela ausência de atividade enzimática na construção pm10, onde apenas o TATA-box dirige a transcrição do gene *LacZ*.

6- Determinação do promotor basal *gsn* no fungo *N. crassa*

A estratégia para a determinação do promotor basal *gsn* no fungo *N. crassa* está baseada na capacidade de uma linhagem do fungo deficiente na atividade glicogênio sintase (*gsn^{rip}*) em acumular glicogênio quando transformada com um plasmídeo contendo a região codificadora do gene *gsn*, sob o controle de diferentes regiões do seu promotor. Conídios de uma linhagem do fungo contendo o gene *gsn* inativado por RIP foram transformados com as construções plasmidiais pm0, pm1, pm2, pm3 e pm4. Os transformantes, selecionados em meio VM contendo glufosinato de amônio foram transferidos para meio VM sólido sem glufosinato e após 10 dias de cultivo, foram transferidos para uma placa contendo VM sólido e incubados a 37°C durante 48 h. Devido à linhagem *gsn^{rip}* possuir o genótipo *cot-1*, esta linhagem cresce de forma colonial em temperatura igual ou superior a 32°C. As colônias dos transformantes crescidas foram submetidas ao vapor de iodo durante 5 min, e os resultados encontram-se na Fig. 15. A linhagem *gsn^{rip}*, usada como controle negativo, não apresentou acúmulo de glicogênio, como era esperado (Fig. 15A, amostras C). O mesmo fenótipo foi observado para os transformantes pm0, onde os primeiros 4.888 bp do gene *gsn* foram removidos (Fig. 15A, clones 1 a 12). No entanto, transformantes apresentando um acúmulo de glicogênio puderam ser observados para todas as construções analisadas (Fig.

A



B

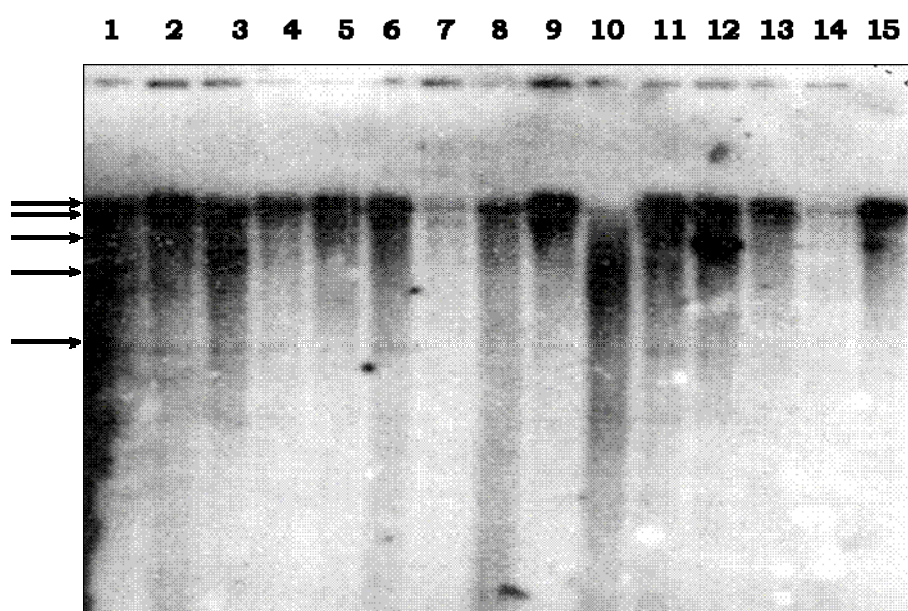


Figura 15. Determinação qualitativa do acúmulo de glicogênio em *N. crassa* para análise do promotor basal *gsn*. **(A)** Transformantes após 5 min de exposição ao vapor de iodo. **C-** controle (*N. crassa gsn^{rip}*); **pm0-** clones 1 a 12; **pm1-** clones 1 a 5; **pm2-** clones 1 a 4; **pm3-** clones 1 a 8 e **pm4-** clones 1 a 9. **(B)** Análise da integração das construções do promotor basal *gsn* pm0, pm1, pm2, pm3 e pm4 no genoma de *N. crassa*. Os DNAs genômicos dos clones obtidos foram digeridos com *EcoRI*, separados em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, contendo brometo de etideo, transferidos para membrana de Nylon e hibridizados com um fragmento interno do cDNA *gsn* marcado radiativamente. **1-** *N. crassa* selvagem (FGSC#424), **2-** *N. crassa gsn^{rip}* não transformada, **3-** clone 2 (pm0), **4-** clone 1 (pm1), **5-** clone 2 (pm1), **6-** clone 4 (pm1), **7-** clone 1 (pm2), **8-** clone 2 (pm2), **9-** clone 4 (pm2), **10-** clone 1 (pm3), **11-** clone 2 (pm3), **12-** clone 5 (pm3), **13-** clone 3 (pm4), **14-** clone 5 (pm4) e **15-** clone 9 (pm4). As setas apontam as bandas de hibridização correspondendo às cópias adicionais do gene *gsn* inseridas no genoma do fungo após transformação.

15A, clones 2 da construção pm1; clones 1 e 4 da construção pm2; clone 5 da construção pm3 e clone 9 da construção pm4). A fim de comprovarmos a integração das construções nos genomas dos transformantes analisados, os DNAs genômicos de transformantes que foram capazes ou não de acumular glicogênio foram isolados e analisados por *Southern Blot*, utilizando uma sonda de DNA contendo um fragmento interno do cDNA *gsn*. Todos os clones analisados, positivos ou negativos, apresentaram bandas de hibridização adicionais à banda de DNA genômica, tornando os resultados difíceis de serem explicados (Fig. 15B). Estes resultados ainda são preliminares e necessitam ser repetidos após a purificação dos homocários, a fim de obtermos resultados mais conclusivos. As construções plasmidiais pm5, pm6, pm7, pm8, pm9 e pm10 para a determinação do promotor basal *gsn* encontram-se em fase de preparação e serão utilizados posteriormente para transformar conídios de *N. crassa gsn^{rip}*.

7- Tentativa de isolamento e identificação da(s) proteína(s) do extrato nuclear HS30' que interage(m) com o elemento de transcrição STRE do promotor gsn

A fim de identificarmos as proteínas presentes no extrato HS30 capazes de reconhecer e ligar o consenso STRE do promotor *gsn*, adotamos estratégias incluindo fracionamento do extrato HS30 em coluna de afinidade, seguido de ensaios de mobilidade em gel, hibridização, SDS-PAGE, eletroforese bidimensional e espectrometria de massas.

Durante o fracionamento do extrato nuclear HS30 em coluna de Heparina-Sepharose, um pico contendo proteínas do extrato foi observado entre as frações 7 e 18 (Fig. 16A), as quais foram então submetidas a ensaios de mobilidade em gel, utilizando a sonda STRE1, a fim de detectarmos as frações apresentando atividade de ligação DNA-proteína. Após a autoradiografia, uma atividade de ligação à sonda STRE1 pode ser inicialmente detectada na fração 10, sendo extremamente intensa nas frações 13 e 14 e apresentando uma intensidade menor a partir da fração 16 (Fig. 16C). As frações 13 e 14 foram então separadas em gel de SDS-PAGE e hibridizadas por *Southwestern*, na tentativa de identificarmos os prováveis tamanhos das proteínas que ligam no elemento STRE1 (Fig. 17). Após a autoradiografia, várias bandas de hibridização correspondendo a diferentes proteínas puderam ser observadas, tanto para a fração 13 quanto para a fração 14 (Fig. 17B), com massas moleculares variando entre 35 e 90 kDa. As mesmas proteínas também foram observadas no extrato nuclear bruto não fracionado, sendo que para este, outras duas bandas de hibridização com massas moleculares de aproximadamente 35 kDa também foram observadas na autoradiografia (Fig. 17B, linha AC). As bandas de proteínas correspondentes

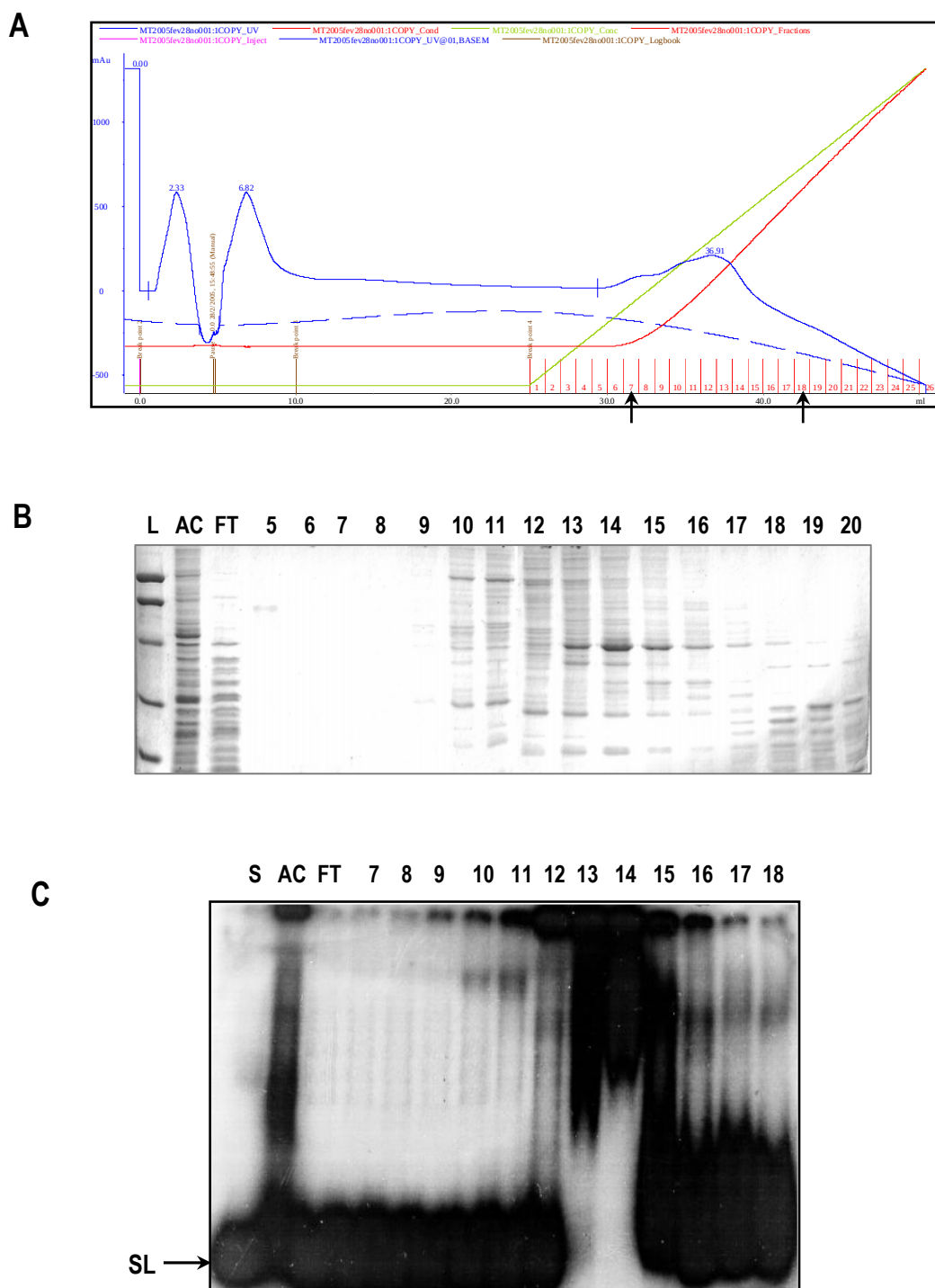


Figura 16. (A) Cromatograma das etapas de fracionamento do extrato HS30' de *N. crassa* em coluna de Heparin-Sepharose, utilizando um gradiente linear de KCl 1,5M em tampão D. As setas indicam o intervalo correspondente às frações coletadas. **(B)** SDS-PAGE das frações eluídas da coluna (frações 5 a 20). **(C)** EMSA das frações coletadas. **AC**- extrato HS30' antes do fracionamento; **FT**- filtrado; **7 a 18**- frações coletadas durante o fracionamento. As frações (15 µg) foram testadas quanto à presença de proteína(s) capaz(es) de reconhecer(em) e ligar(em) ao elemento STRE1 do promotor *gsn*.

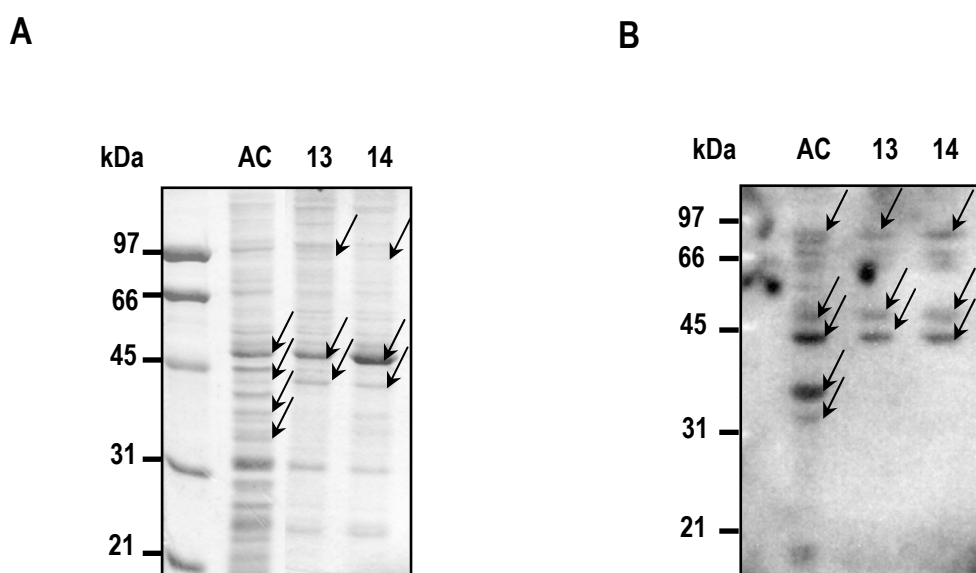


Figura 17. Análise das frações 13 e 14, identificadas como positivas para a interação com o elemento STRE1 do promotor *gsn* através de SDS-PAGE e *Southwestern blot*. **(A)** SDS-PAGE das frações 13 e 14 do extrato HS30 após fracionamento em coluna de Heparina-Sepharose. Eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, corado com *Coomassie Blue*. **(B)** *Southwestern blot* para identificarmos o(s) peso(s) molecular(es) da(s) proteína(s) fracionadas em coluna de afinidade, que interagem com o elemento STRE1. **AC-** extrato nuclear HS30 bruto antes da coluna de afinidade. As setas correlacionam as bandas de hibridização no *Southwestern* às proteínas no gel de SDS-PAGE.

às bandas de hibridização detectadas após autoradiografia do *Southwestern* foram então removidas do gel de SDS-PAGE, digeridas com tripsina e submetidas à análise por espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF). Os resultados obtidos a partir desta estratégia de identificação não foram muito satisfatórios, talvez porque a técnica de hibridização por *Southwestern* deva permitir que, durante as etapas de desnaturação e renaturação das proteínas imobilizadas na membrana, proteínas inespecíficas sejam renaturadas e formem estruturas terciárias capazes de reconhecer a sonda STRE1, gerando resultados falso-positivos na autoradiografia. Entretanto, uma delas (NCU02424) mostrou ser um alvo interessante e merece uma melhor investigação no futuro.

Em uma outra estratégia, o extrato HS30 foi fracionado, através de SDS-PAGE, utilizando dois padrões de massas moleculares diferentes e as regiões do gel correspondentes a diferentes intervalos de massa molecular foram isoladas. As proteínas foram eluídas do gel e foram testadas quanto à atividade de ligação DNA-proteína por EMSA. Os resultados obtidos estão apresentados na Fig. 18. A presença de bandas de DNA de mobilidade reduzida pode ser verificada em dois intervalos de massa molecular diferentes tanto para o padrão de massa molecular da Invitrogen (Fig. 18A, intervalos de 30 a 40 kDa e 40 a 50 kDa) quanto para o padrão de massa molecular da BioRad (Fig. 18B, intervalos de 33,5 a 46,9 e 46,9 a 80,0). Como o padrão de massa molecular da Invitrogen apresenta intervalos de massas moleculares mais estreitos e precisos e uma banda de DNA de mobilidade reduzida mais intensa pode ser observada no intervalo de 40 a 50 kDa (Fig. 18B, linhas 6 e 7, respectivamente), concluímos que a(s) proteína(s) que reconhecem e liga(m) a sonda STRE1 possuem massa molecular ao redor de 40 a 50 kDa.

Dando continuidade à etapa de identificação, o extrato HS30 também foi fracionado em diferentes intervalos de pI, através de sua focalização isoeletrica em uma *strip* de intervalo de pH de 3 a 10, e as proteínas eluídas foram analisadas por EMSA. A autoradiografia detectou a presença de bandas de DNA de mobilidade reduzida em dois intervalos de pH diferentes, 6,77 a 7,31 e 3,54 a 4,08 (Fig. 19, linhas 8 e 14, respectivamente), sugerindo a existência de mais de uma proteína envolvida na formação do complexo STRE1-proteína(s), uma vez que dois intervalos de ponto isoeletrico foram detectados. A fim de identificarmos as proteínas contidas na fração de massa molecular de 35 a 50 kDa, submetemos o extrato HS30 a uma análise por eletroforese bidimensional (Fig. 20). As proteínas contidas no intervalo de massa molecular de 35 a 50 kDa foram removidas do gel, digeridas com tripsina e analisadas por MALDI. Os picos monoisotópicos obtidos após ionização dos peptídeos tripticos permitiram identificar algumas proteínas de *N. crassa*, sendo que as mais freqüentes encontram-se descritas na Tabela 3. Dentre as proteínas identificadas nesta estratégia, as proteínas NCU01021, NCU03876, NCU03482 e

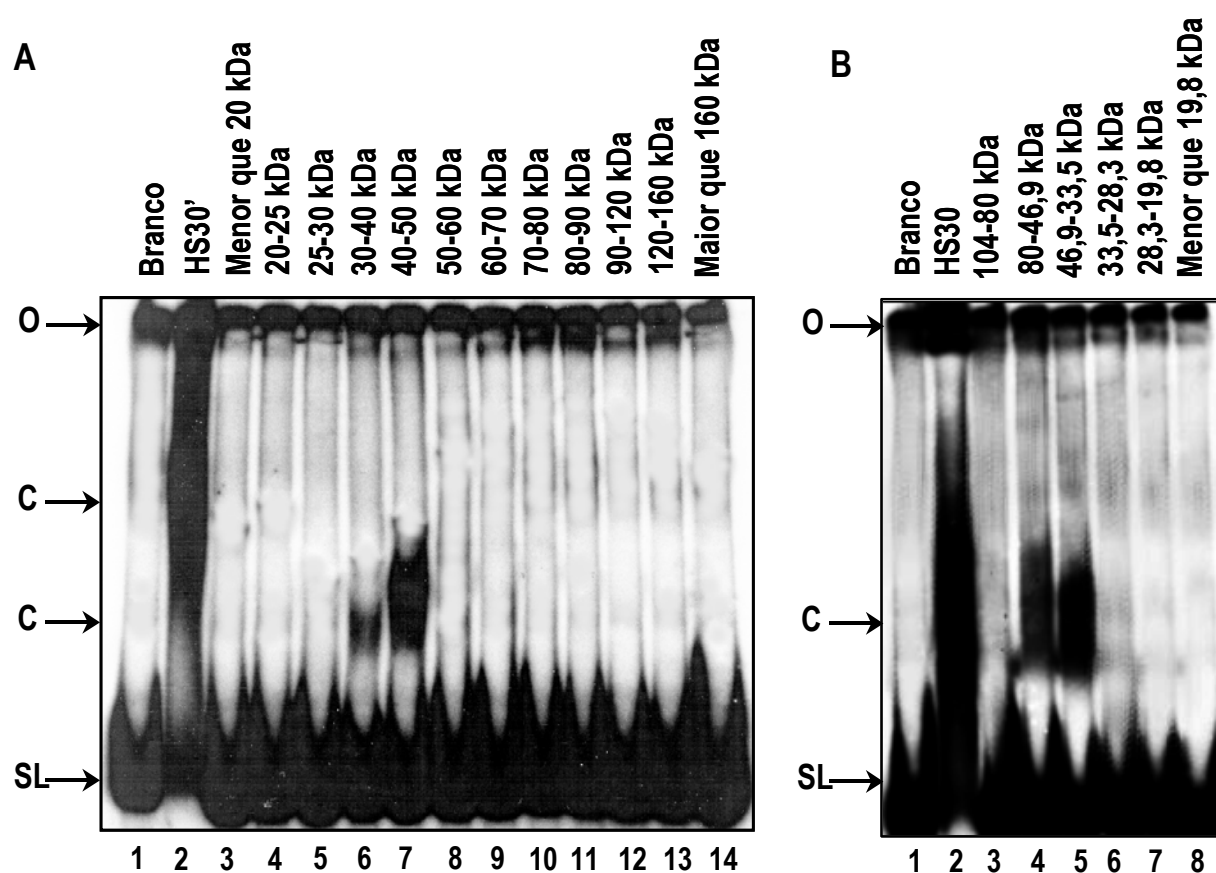


Figura 18. estimativa da massa molecular das proteínas capazes de se ligar à sonda de DNA. Proteínas (300 µg) do extrato HS30 foram separadas por SDS-PAGE 10% utilizando os padrões de massa molecular BenchMark Protein Ladder, Invitrogen **(A)** e Low-Range SDS-PAGE Standard, Biorad **(B)** e as frações correspondentes aos diferentes intervalos de massa molecular foram isoladas dos géis. As proteínas foram eluídas, renaturadas e ensaiadas para atividade de ligação ao elemento STRE1 por EMSA. **Branco**- sonda STRE1 sozinha, **HS30**- extrato nuclear bruto fração HS30 (20 µg), **C**- complexo DNA-proteína(s), **O**- origem do gel, **FP**- sonda livre.

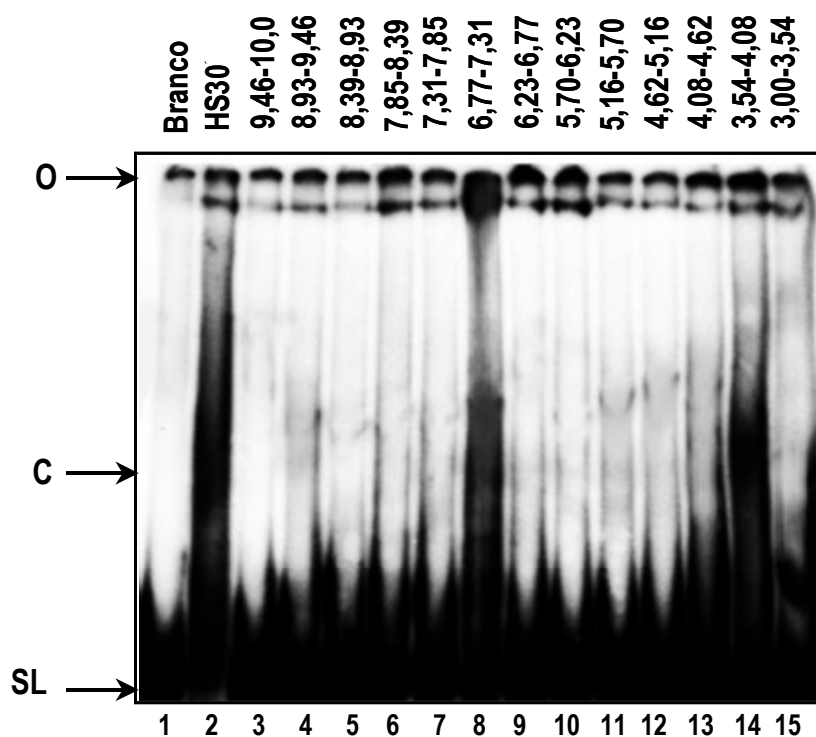


Figura 19. Fracionamento do extrato nuclear bruto HS30 por focalização isoeétrica. Proteínas (300 µg) do extrato HS30 foram separadas em fitas de 13 cm com intervalo de pH 3-10 linear e em seguida, o gel foi fracionado em diferentes intervalos de pH. As proteínas foram eluídas dos pedaços de gel, renaturadas e ensaiadas para atividade de ligação por ensaios de EMSA, usando a sonda STRE1. **Branco**- sonda STRE1 sozinha, **HS30**- extrato nuclear bruto fração HS30 (20 µg), **C**- complexo DNA-proteína(s), **O**- origem do gel, **FP**- sonda livre.

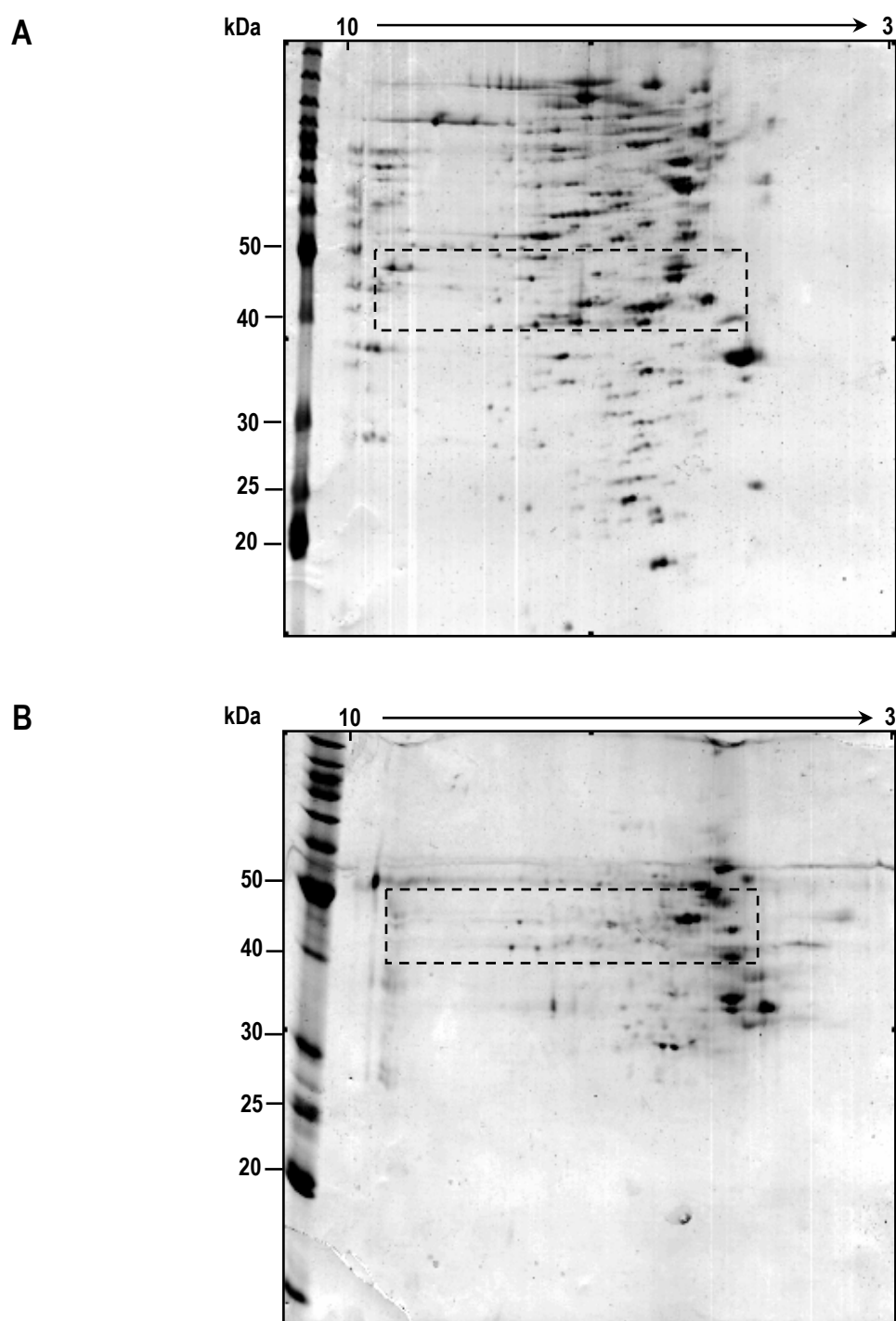


Figura 20. Eletroforese bidimensional das proteínas nucleares de *N. crassa*. **(A)** As proteínas da fração cromatográfica 14 foram separadas por eletroforese 2D e os *spots* apresentando massas moleculares entre 40 e 50 kDa foram removidos do gel, digeridos com tripsina e analisados por MALDI-TOF/TOF. **(B)** As proteínas do extrato HS30 foram fracionadas por SDS-PAGE e um pedaço do gel contendo as proteínas de massas moleculares entre 40 e 50 kDa foi removido, as proteínas nele contidas foram eletroeluídas e analisadas por eletroforese 2D. Os *spots* identificados foram removidos do gel, digeridos com tripsina e serão submetidos futuramente à espectrometria de massas. Os retângulos mostram as regiões dos géis 2D onde os *spots* foram removidos.

TABELA 3- Principais proteínas identificadas por espectrometria de massas, a partir do extrato nuclear HS30 de *N. crassa**

Proteínas identificadas	Score	% identidade peptídeos	pI / MM (Da)	Nº acesso MIT
<i>heat shock protein 30 (hsp30)</i>	111	28	5.56/25.249	NCU09364
Elongation factor 1-alpha (EF-1-alpha)	69	27	9,22/49.983	NCU02003
Outer mitochondrial membrane protein porin	279	28	9,02/29.981	NCU04304
Hypothetical protein (related to interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase inhibitor)**	48	13	8,03/56.084	NCU02424
Hypothetical protein (Probable ribosomal protein 10, cytosolic)	44	1	10,05/29.165	NCU01452
Predicted protein (related to RAY38 protein)	77	1	9,33/33.631	NCU00225
Hypothetical protein (AJ132791, putative septin <i>Pyrenopeziza brassicae</i>)	56	1	5,12/43.676	NCU02464
Hypothetical protein (Probable 40s ribosomal protein S6.e, cytosolic)	32	1	10,60/27.428	NCU08502
Hypothetical protein** (related to translation initiation factor 3 (47 kDa subunit))	453	27	4,92/39727	NCU01021
Actin-like protein 3	316	27	6,61/48050	NCU01756
Tubulin gamma chain (gamma tubulin)	251	17	5,72/51794	NCU03954
Conserved hypothetical protein** (probable translation initiation factor eIF3 p39 subunit)	232	30	6,19/38887	NCU03876
Hypothetical protein** [related to non-snRNP spliceosome component (pre-mRNA splicing protein PRP19)]	163	10	5,39/87793	NCU05696
Conserved hypothetical protein** (probable RUVB-like protein)	157	11	5,69/50179	NCU03482
Phosphoglycerate kinase	153	17	6,17/45257	NCU07914
Conserved hypothetical protein	149	12	6,09/59161	NCU02797
Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 (ERF1) (eukaryotic release factor 1)	146	14	5,32/48808	NCU00410
Conserved hypothetical protein	143	14	7,27/46380	NCU06760
Conserved hypothetical protein**	118	8	5,24/49729	NCU02813
Hypothetical protein	117	23	6,14/40459	NCU07929
Conserved hypothetical protein	70	6	5,83/44628	NCU07171
Conserved hypothetical protein**	59	6	9,16/43994	NCU04164

Hypothetical protein** (chromatin assembly 3 gene or cac-3; homolog of yeast Cac3)	53	5	5,33/63578	NCU06679
Hypothetical protein	40	2	6,49/90175	NCU09425
Hypothetical protein** (putative/predicted protein)	36	1	4,9/102619	NCU07314
Hypothetical protein	34	3	6,79/63649	NCU02179
Hypothetical protein	31	3	10,24/25056	NCU02106
Hypothetical protein	30	3	4,60/78578	NCU05697

*As proteínas foram analisadas por MALDI-TOF/TOF. Os picos monoisotópicos ($p < 0,05$) foram pesquisados contra bancos de dados de *N. crassa* (MIT e MIPS), com a permissão de perda de apenas 1 sítio de clivagem para tripsina. A base de dados foi acessada utilizando o programa MASCOT, junto ao site www.matrixscience.com. As proteínas anotadas em negrito e identificadas com asteriscos (**) foram consideradas como alvos interessantes para estudos futuros.

NCU06679 mostraram ser alvos interessantes para estudos futuros, após análise de suas seqüências polipeptídicas.

8- Análise da expressão do gene *gsn* em linhagens mutantes na via de sinalização do AMPc

A fim de determinarmos se a via de sinalização do AMPc poderia alterar a expressão do gene *gsn* durante a condição de crescimento vegetativo, foram realizados ensaios de *Northern blot* utilizando RNAs totais extraídos das linhagens mutantes *cr-1* e *mcb*, paralelamente à linhagem selvagem. A autoradiografia das membranas detectou a presença de apenas um transcrito *gsn* com o tamanho esperado de aproximadamente de 3,0 kb. Comparações estabelecidas entre as linhagens deficientes na via de sinalização do AMPc e a linhagem selvagem mostraram que a expressão do gene *gsn* sofre variações ao longo do crescimento do fungo nas diferentes linhagens analisadas, sugerindo um possível envolvimento da via do AMPc no controle transcricional. Enquanto na linhagem selvagem o RNAm *gsn* alcança máxima expressão após 24h de crescimento a 30°C (Fig. 21A, linha 4) confirmando resultados previamente obtidos (DE PAULA *et al.*, 2002), na linhagem mutante *cr-1* os níveis do transcrito parecem estar aumentados no início (Fig. 21B, linhas 2 e 3) e no final (Fig. 21B, linhas 6 e 7) do crescimento. Por outro lado, na linhagem mutante *mcb*, os níveis de transcrito *gsn* sofreram um aumento significativo após 6h de cultivo e permaneceram praticamente constantes durante todo o crescimento (Fig. 21C). Na situação de choque térmico, todas as linhagens analisadas responderam ao aumento de temperatura, reduzindo os níveis de transcrito *gsn* (Fig. 21, comparar linhas 8 e 9 nas figuras A, B e C), sugerindo também um controle da via de sinalização do AMPc sobre a resposta do gene *gsn* ao choque térmico. Estes resultados foram mais evidentes para a linhagem selvagem.

O envolvimento do AMPc no controle da expressão do gene *gsn* também foi analisado através de EMSA, uma vez que os ensaios de *Northern blot* revelaram uma provável participação desta molécula sinalizadora no controle da transcrição gênica. Embora em *N. crassa* nenhum ortólogo aos transativadores Msn2/4p tenha sido encontrado, é conhecido que na levedura *S cerevisiae* os consensos STRE interagem com os fatores de transcrição Msn2p/4p (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996), ativando a transcrição de genes em diferentes condições estressantes, e a localização nuclear destes fatores é impedida na presença de altos níveis de AMPc celulares (GÖRNER *et al.*, 1998). Sendo assim, extratos nucleares das diferentes linhagens mutantes foram preparados a partir de micélio submetido ou não ao choque térmico e ensaiados por EMSA utilizando a sonda STRE1.

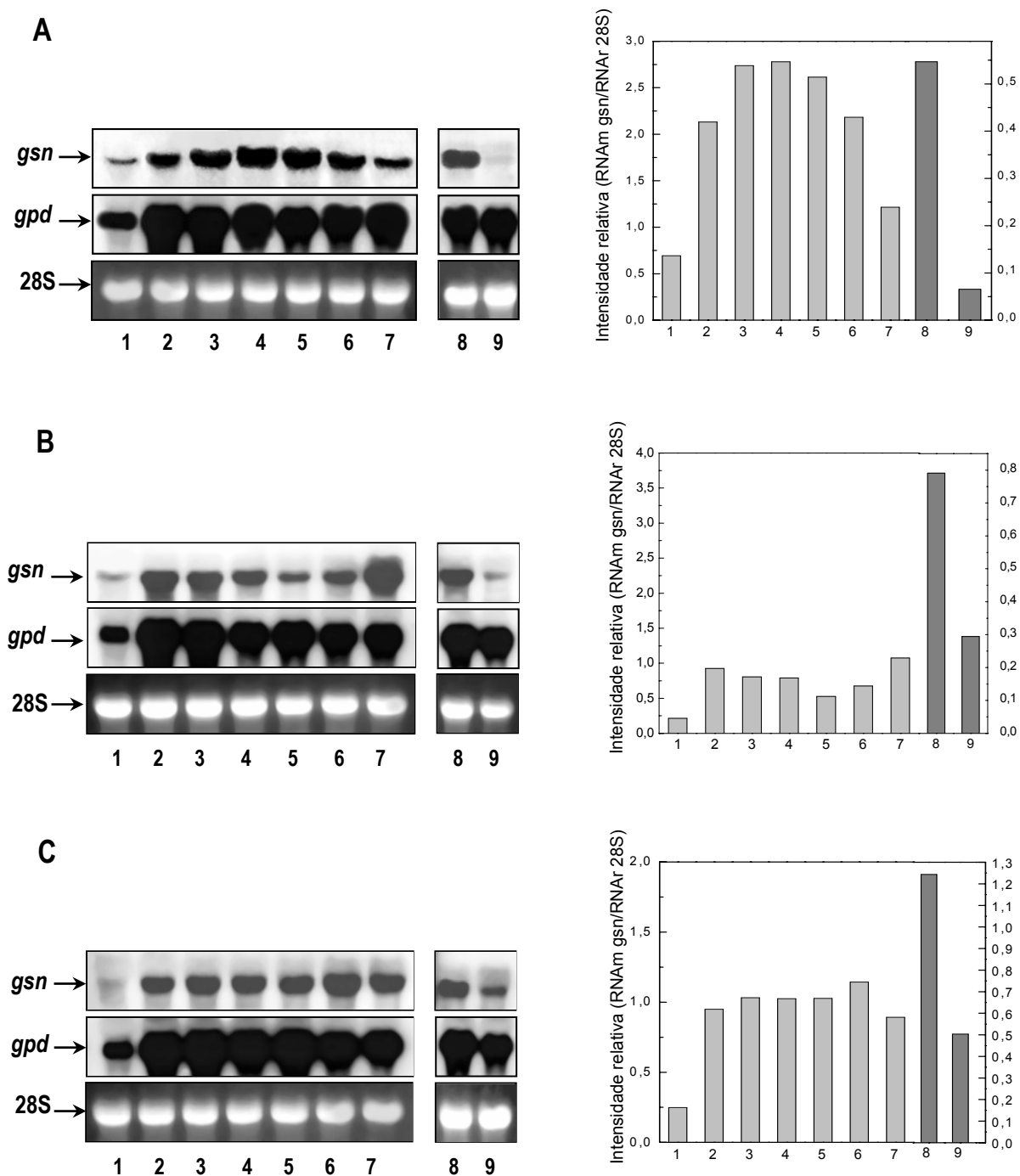


Figura 21. Análise da expressão do gene *gsn* por *Northern blot* nas linhagens selvagem (**A**), *cr-1* (**B**) e *mcb* (**C**). Para analisar o crescimento vegetativo do fungo, micélios das diferentes linhagens foram cultivados durante 1- 0h, 2- 6h, 3- 12h, 4- 24h, 5- 36h, 6- 48h e 7- 72 h, a 30°C. Para analisar a expressão gênica na situação de choque térmico, os micélios das diferentes linhagens foram cultivados durante 24h/30°C (8) e em seguida, incubados a 45°C/30 min (9). Os RNAs foram hibridizados com cDNA *gsn* marcado radiativamente e a hibridização foi normalizada com o gene *gpd*. O RNAr 28S mostrou a qualidade das preparações de RNA utilizadas nos experimentos.

Após a autoradiografia, bandas de DNA de mobilidade reduzida foram visualizadas usando a sonda STRE1 e diferentes extratos nucleares. Para a linhagem selvagem, apenas um *shift* inespecífico pôde ser detectado quando a amostra ZERO (Fig. 22, linhas 2 e 3) foi ensaiada. Quando o extrato HS30 foi utilizado, uma forte banda de DNA de mobilidade reduzida pode ser detectada próximo à origem do gel, cuja especificidade pode ser confirmada após a adição do competidor específico (Fig 22, linhas 4 e 5). Para a linhagem mutante *cr-1*, bandas de DNA de mobilidade reduzida puderam ser detectadas tanto para a amostra ZERO (Fig 22, linha 6) quanto para o extrato HS30 (Fig 22, linha 8) e as especificidades destas interações também foram confirmadas após a adição do competidor específico (Fig. 22, linhas 7 e 9). Para a linhagem *mcb*, uma banda de DNA de mobilidade reduzida de alto peso molecular foi detectada para a amostra ZERO (Fig. 22, linha 10) e uma de peso molecular menor foi observada para o extrato HS30 (Fig. 21, linha 12). As especificidades das interações DNA-proteína(s) também foram confirmadas para estes *shifts* pela adição do competidor específico (Fig. 22, linhas 11 e 13). Os resultados apresentados sugerem fortemente o envolvimento da via de sinalização do AMPc na interação entre proteína(s) nuclear(es) e o elemento de DNA STRE1 do promotor *gsn* não apenas durante o crescimento vegetativo do fungo como também sob condição de choque térmico.

9- *Análise funcional dos elementos de transcrição CRE*

Os elementos CRE são consensos regulatórios presentes nos promotores de genes de eucariotos envolvidos em vários tipos de eventos celulares. Estes elementos de DNA interagem com os fatores de transcrição CREB fosforilados, facilitando o recrutamento de componentes da maquinaria transcricional para a região promotora, promovendo a ativação da transcrição gênica. Níveis aumentados de AMPc são conhecidos acentuar a ativação transcricional mediada por CREB e a capacidade de CREB em distinguir entre estímulos dependentes ou não de AMPc encontra-se na habilidade de recrutar CBP e outros componentes da maquinaria transcricional sob diferentes condições ambientais (MAYR & MONTMINY, 2001).

A análise da região promotora do gene *gsn* permitiu identificar a presença de alguns elementos CRE. Sendo assim, analisamos a funcionalidade destes elementos através de ensaios de mobilidade em gel, utilizando extratos nucleares preparados a partir de micélios das diferentes linhagens do fungo, submetidos ou não ao choque térmico. Durante a análise da sonda CRE1/2, bandas de DNA de mobilidade reduzida para o extrato ZERO foram observadas em todas as linhagens analisadas (Fig. 23, linhas 2, 4, 6, 8, 10 e 12) e as

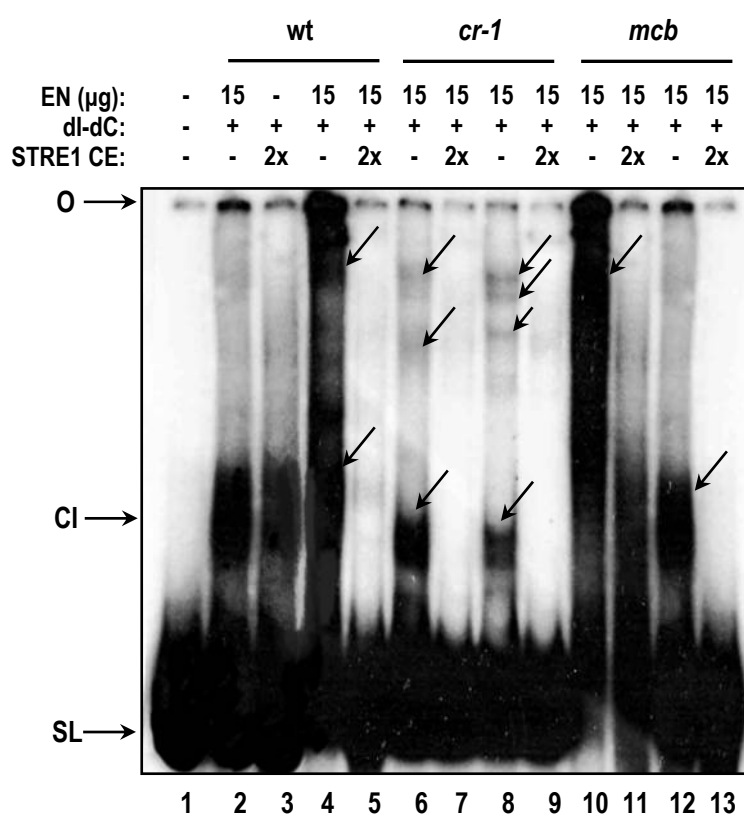


Figura 22. Interações entre o elemento STRE do promotor *gsn* e proteínas nucleares de *N. crassa* linhagens selvagem (wt), *cr-1* e *mcb*. EMSA utilizando a sonda STRE1 e extratos nucleares ZERO e HS30 das diferentes linhagens. **1**- sonda STRE1, sem adição de extrato, **2** e **3**- extrato ZERO linhagem selvagem, **4** e **5**- extrato HS30 linhagem selvagem, **6** e **7**- extrato ZERO linhagem *cr-1*, **8** e **9**- extrato HS30 linhagem *cr-1*, **10** e **11**- extrato ZERO linhagem *mcb*, **12** e **13**- extrato HS30 linhagem *mcb*. **EN**- extrato nuclear, **CE**- competidor específico, **O**- origem do gel, **CI**- complexo DNA-proteína inespecífico, **SL**- sonda livre. As setas apontam os complexos DNA-proteína(s) específicos para os diferentes extratos.

especificidades dos complexos foram confirmadas pela adição prévia do competidor específico (Fig. 23, linhas 3, 5, 7, 9, 11 e 13). Além disso, os complexos DNA-proteína da linhagem *cr-1* apresentaram mobilidades semelhantes, embora tenham sido mais intensos após choque térmico (Fig. 23, comparar linhas 6 e 8) sugerindo que após o estímulo estressante, outras proteínas estariam sendo ativadas e provavelmente recrutadas por uma proteína do tipo CREB nesta linhagem. Para os extratos da linhagem *mcb*, uma banda de DNA de mobilidade bastante reduzida e muito intensa pode ser verificada para a amostra ZERO (Fig. 22, linha 10), sendo menos intensa e mais rápida após o estímulo estressante (Fig. 22, linha 12).

Para os elementos CRE3/4, a autoradiografia mostrou bandas de DNA de mobilidade bastante reduzida e extremamente intensas para os extratos ZERO (Fig. 24, linha 2) e HS30 (Fig. 24, linha 4) da linhagem selvagem. Para o extrato ZERO da linhagem *cr-1* pode ser observado duas bandas de DNA de mobilidade semelhante à observada anteriormente para a sonda CRE1/2, enquanto que para o extrato HS30, apenas uma banda foi observada (Fig. 24, linhas 6 e 8, respectivamente). Os extratos da linhagem *mcb* comportaram-se da mesma forma que para a sonda CRE1/2, ou seja, um complexo bastante lento, próximo à origem do gel, pôde ser observado para o tempo ZERO (Fig. 24, linha 10) enquanto que dois complexos com mobilidade maior foram detectados para o extrato HS30 (Fig. 24, linha 12). Todos os *shifts* tiveram suas especificidades confirmadas pela adição do competidor específico CRE3/4 (Fig. 24, linhas, 3, 5, 7, 9, 11 e 13).

A análise dos elementos CRE 5/6 revelou a presença de duas bandas de DNA de mobilidade reduzida com padrões de migração semelhantes, tanto para o extrato ZERO quanto para o extrato HS30 da linhagem selvagem (Fig. 25, linhas 2 e 4) e apenas uma banda de mobilidade bastante reduzida, próxima à origem do gel foi observada para o extrato HS30 (Fig. 25, linha 4). Para os extratos da linhagem *cr-1*, uma banda de DNA de mobilidade reduzida pode ser observada para a amostra ZERO (Fig. 25, linha 6), enquanto que duas bandas foram observadas para o extrato HS30 (Fig. 25, linha 8). Um intenso *shift* foi observado para o extrato ZERO da linhagem *mcb*, próximo à origem do gel e com padrão semelhante ao apresentado anteriormente pelas sondas CRE1/2 e CRE3/4 (Fig. 25, linha 10), enquanto que para o extrato HS30, apenas um *shift* de mobilidade mais rápida foi detectado (Fig. 25, linha 12). Todas as bandas de DNA também tiveram suas especificidades confirmadas pela adição prévia do competidor específico.

Os resultados apresentados mostram que: 1) os elementos CRE encontrados no promotor *gsn* são funcionais e respondem de maneira diferente durante o crescimento vegetativo do fungo e na situação de choque térmico nas diferentes linhagens estudadas e 2) o mesmo padrão de formação de complexos DNA-proteínas foi observado nas três linhagens estudadas. Na linhagem selvagem, complexos de massas moleculares semelhantes foram

observados antes e depois do choque térmico para as três sondas analisadas. A linhagem *cr-1* mostrou a presença de complexos de baixa intensidade, comparado às outras linhagens, sendo os complexos formados após o estresse térmico levemente mais intensos que a amostra ZERO. A linhagem *mcb* apresentou complexos diferentes antes e depois do choque térmico, mas com o mesmo padrão nas três linhagens estudadas.

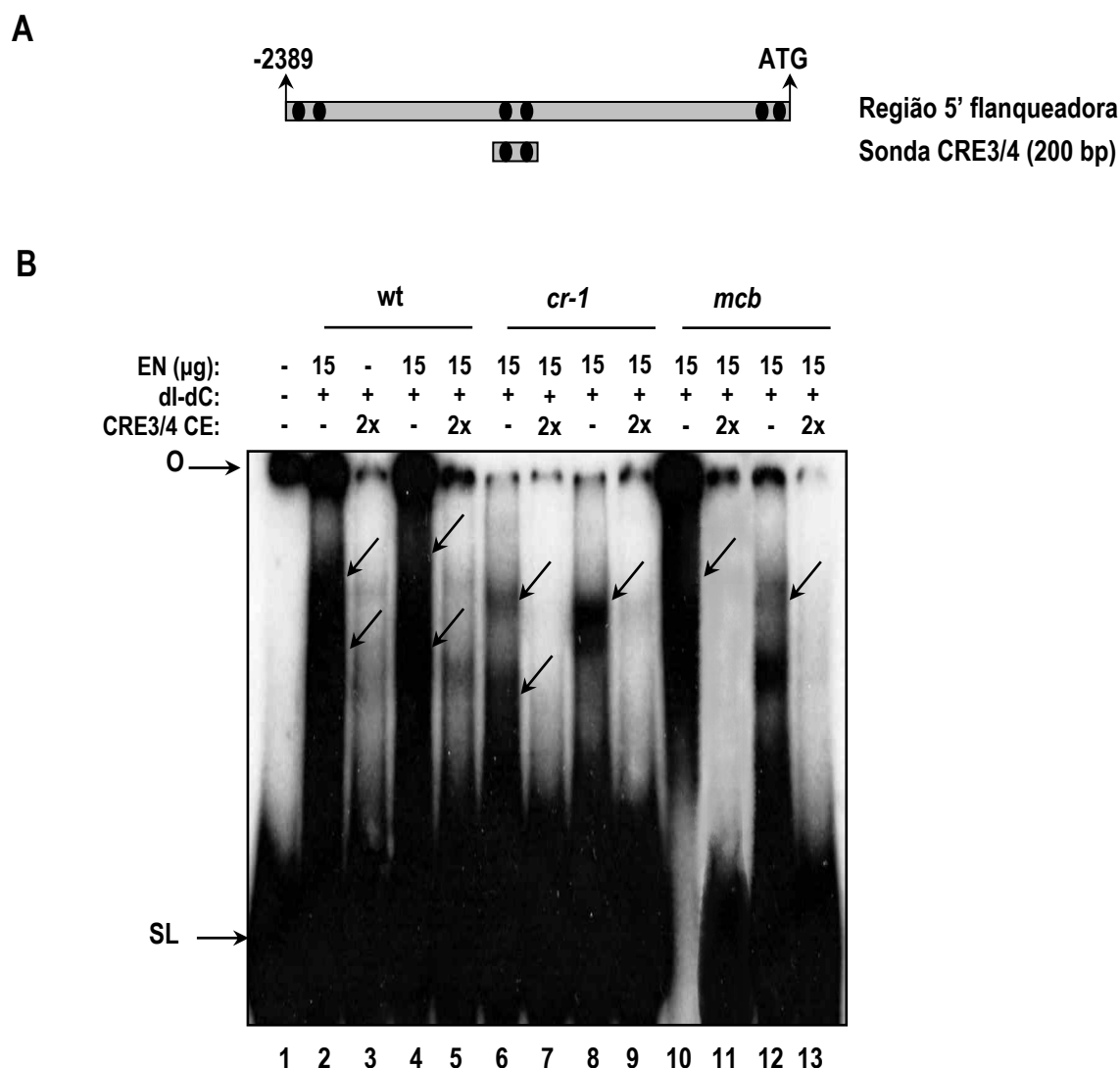


Figura 24. Interações entre o elemento CRE (●) do promotor *gsn* e proteínas nucleares de *N. crassa*. **(A)** Representação esquemática da sonda usada. **(B)** EMSA utilizando a sonda CRE3/4 e extratos nucleares ZERO e HS30 das linhagens selvagem (*wt*), *cr-1* e *mcb*. 1- sonda CRE3/4, sem adição de extrato, 2 e 3- extrato ZERO linhagem selvagem, 4 e 5- extrato HS30 linhagem selvagem, 6 e 7- extrato ZERO linhagem *cr-1*, 8 e 9- extrato HS30 linhagem *cr-1*, 10 e 11- extrato ZERO linhagem *mcb*, 12 e 13- extrato HS30 linhagem *mcb*. EN- extrato nuclear, CE- competidor específico, O- origem do gel, SL- sonda livre. As setas apontam os complexos DNA-proteína(s) específicos para os diferentes extratos.

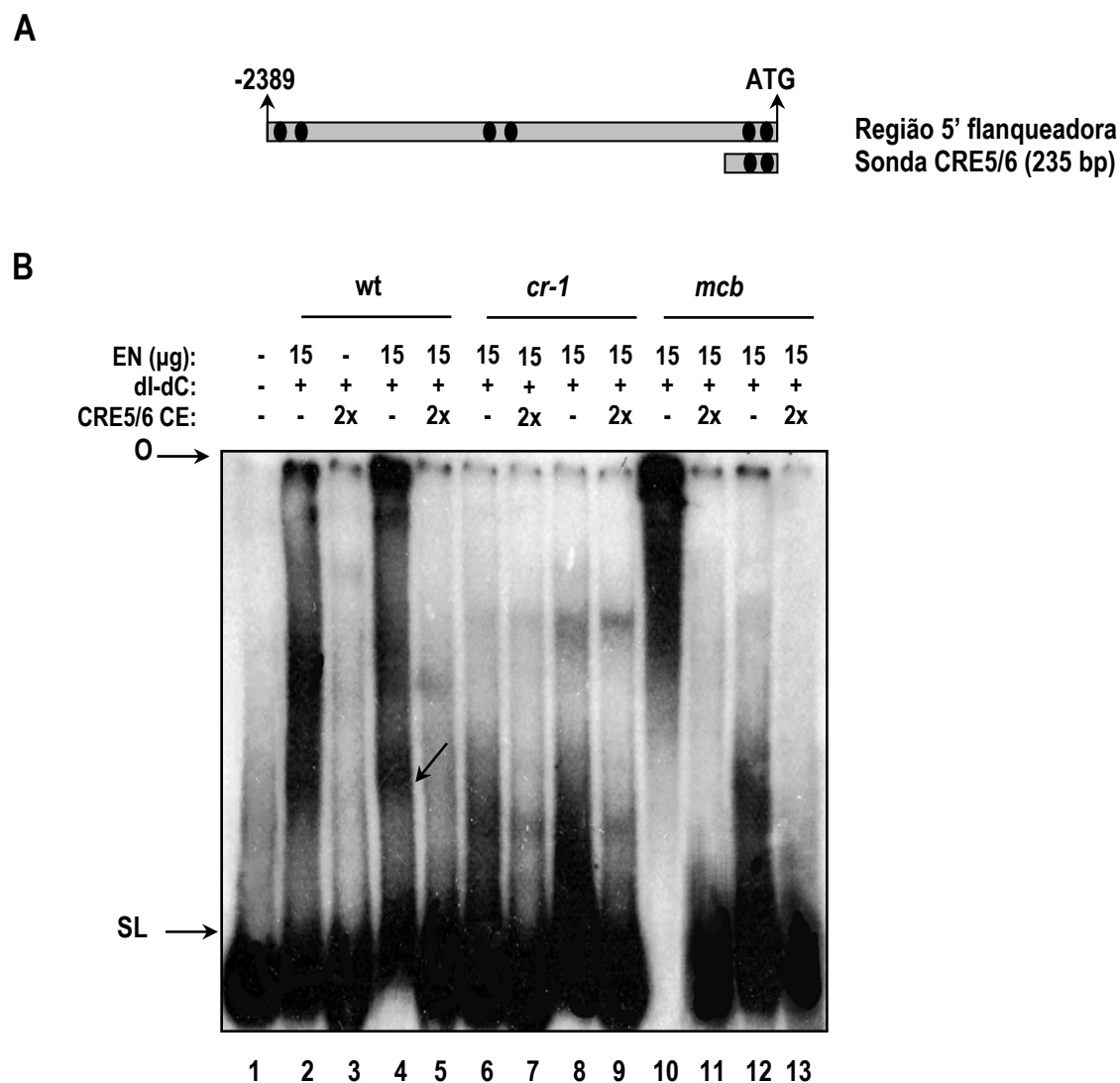
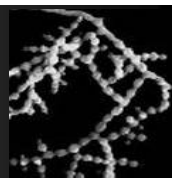


Figura 25. Interações entre o elemento CRE (●) do promotor *gsn* e proteínas nucleares de *N. crassa*. **(A)** Representação esquemática da sonda usada. **(B)** EMSA utilizando a sonda CRE5/6 e extratos nucleares ZERO e HS30 das linhagens selvagem (*wt*), *cr-1* e *mcb*. **1**- sonda CRE5/6, sem adição de extrato, **2 e 3**- extrato ZERO linhagem selvagem, **4 e 5**- extrato HS30 linhagem selvagem, **6 e 7**- extrato ZERO linhagem *cr-1*, **8 e 9**- extrato HS30 linhagem *cr-1*, **10 e 11**- extrato ZERO linhagem *mcb*, **12 e 13**- extrato HS30 linhagem *mcb*. **EN**- extrato nuclear, **CE**- competidor específico, **O**- origem do gel, **SL**- sonda livre. As setas apontam os complexos DNA-proteína(s) específicos para os diferentes extratos.

Discussão



1- Caracterização dos elementos transcrpcionais regulatórios presentes nas regiões flaqueadoras do gene *gsn*

De maneira geral, a ativação ou desativação transcricional de genes desempenha um importante papel na habilidade que os organismos têm em desenvolver respostas adaptativas a diferentes condições ambientais adversas. Embora os mecanismos pelos quais as células detectem e respondam apropriadamente a estas formas de estresse ambientais variados ainda seja bastante desconhecido, um grande número de fatores de transcrição participando destas vias de transdução do sinal estressante já foram identificados.

O glicogênio é considerado uma das principais fontes de reserva de glicose nos microrganismos. A análise prévia da expressão do *gsn* mostrou que em determinadas condições estressantes como o choque térmico, os níveis de transcrito foram reduzidos e que esta redução foi acompanhada também por uma redução no conteúdo de glicogênio das células estressadas (DE PAULA *et al.*, 2002). O isolamento das seqüências nucleotídicas das regiões flaqueadoras do gene permitiu a identificação de vários prováveis sítios de ligação para fatores de transcrição nestas regiões, dentre eles os elementos HSE e os elementos STRE, os quais se encontram envolvidos no controle da expressão gênica na situação de estresse térmico (FREITAS & BERTOLINI, 2004). Uma vez que um aumento na temperatura de crescimento do fungo resultou em uma redução nos níveis de RNAm *gsn*, iniciamos o presente estudo investigando o papel dos prováveis elementos de transcrição encontrados na região 5' flaqueadora do gene, através de ensaios de retardamento em gel. Os resultados obtidos nos ensaios de EMSA para os elementos HSE e para os dois elementos STRE encontram-se discutidos no artigo "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*, 2004, **272**: 550-561), no Anexo 1.

O elemento de transcrição STRE presente na região 3' flaqueadora do gene também foi analisado por EMSA. Bandas de DNA de mobilidade reduzida foram detectadas para todos os elementos 3' *downstream* ao sinal de poliadenilação analisados, sugerindo um provável envolvimento destes no controle da transcrição gênica durante o choque térmico. O controle transcricional mediado por elementos regulatórios presentes na região 3' flaqueadora de genes é conhecido em organismos eucariotos superiores. É sabido que a expressão do gene da eritropoietina é altamente estimulada na situação de hipóxia em humanos (BECK *et al.*, 1991). Ensaios de deleção realizados nas regiões 5' e 3' flaqueadoras do gene mostraram que a remoção de um fragmento de DNA de aproximadamente 600 bp, imediatamente *downstream* ao sinal de poliadenilação na região 3' flaqueadora, eliminava completamente a resposta gênica à hipóxia e a reinserção deste fragmento *upstream* à região 5' flaqueadora foi capaz de restaurar a ativação da expressão

gênica durante a hipóxia. Análises posteriores da mesma região fusionada a um gene repórter mostraram a presença de um elemento de transcrição do tipo *enhancer*, fundamental na expressão gênica da eritropoietina, imediatamente 120 bp *downstream* ao sítio de poliadenilação do gene, cuja atividade era independente da posição e orientação e era capaz de estimular a transcrição gênica em até 15 vezes em resposta à hipóxia (BECK *et al.*, 1991).

O gene que codifica para o hormônio de crescimento humano é controlado negativamente por uma sequência regulatória *cis* bastante complexa localizada na região 3' flanqueadora, a qual também apresenta atividade independente da orientação e da posição. Esta sequência silenciadora mostrou ser dependente da região promotora e sua presença na região 3' flanqueadora reduz a taxa de acetilação das histonas associadas ao promotor, resultando numa redução significativa do recrutamento da RNA polimerase II no promotor e consequentemente, da expressão gênica (TRUJILLO *et al.*, 2006)

A funcionalidade dos elementos de transcrição CRE, conhecidos por recrutarem componentes da maquinaria transcricional nas regiões promotoras, também foi analisada por ensaios de retardamento em gel. Todos os elementos CRE encontrados no promotor *gsn* foram analisados quanto à atividade de ligação DNA-proteínas, usando extratos nucleares preparados de micélios submetidos ou não ao choque térmico. As autoradiografias revelaram que em todas as situações estudadas, bandas de DNA de mobilidade reduzida foram detectadas, sugerindo que os elementos CRE localizados no promotor *gsn* são capazes de serem reconhecidos e ligados por proteínas nucleares do fungo. As proteínas CREB, responsáveis por ligar os consensos CRE são fatores de transcrição cuja atividade é regulada por fosforilação (MAYR & MONTMINY, 2001). A fosforilação leva à dimerização e conseqüente ligação ao elemento regulatório CRE. Em nosso trabalho, embora ortólogos CBP não tenham sido encontrados em banco de dados de *N. crassa*, a ativação das proteínas do tipo CREB por eventos de fosforilação ficou bastante evidente quando a linhagem mutante do fungo apresentando PKA hiperativa (*mcb*) foi usada nos ensaios de EMSA. Também a influência dos níveis de AMPc pôde ser comprovada na linhagem deficiente em AMPc (*cr-1*), para qual uma baixa atividade de ligação DNA-proteína foi observada tanto na presença quanto na ausência do evento estressante, em virtude da atividade PKA estar praticamente ausente nesta linhagem. PROFT *et al.* (2005) mostraram que o fator de transcrição Sko1p é capaz de reconhecer e ligar sequências CRE nos promotores de genes responsivos a estresse osmótico e regular a expressão gênica na levedura *S. cerevisiae*. Através de ensaios de imunoprecipitação de cromatina, os autores também identificaram aproximadamente 40 promotores alvos para o fator de transcrição Sko1p *in vivo*, sendo que o reconhecimento de alguns destes promotores só foi possível quando na presença de fatores de transcrição assessórios.

2- Caracterização preliminar das regiões do promotor *gsn* importantes para a transcrição gênica

Outro aspecto abordado durante este trabalho foi a caracterização do promotor *gsn* com o objetivo de determinar quais regiões são importantes para a transcrição gênica. Os ensaios para a determinação das principais regiões regulatórias foram realizados em células de *S. cerevisiae* e também no fungo *N. crassa*.

Nas células de levedura, a transcrição do gene repórter mediada pelos diferentes fragmentos de DNA do promotor *gsn* foi testada tanto na condição fisiológica de crescimento quanto na situação de choque térmico. Todas as construções analisadas tiveram como referência os níveis de atividade enzimática determinados pelo promotor do gene *GSY2* da levedura. É sabido que a ativação da transcrição do gene *GSY2* de *S. cerevisiae* na situação de choque térmico é dependente da presença de elementos STRE em seu promotor e dos transativadores Msn2p/4p (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996, SCHMITT & MCENTEE, 1996). Quando células selvagens de levedura carregando a construção pm1 (promotor inteiro) foram submetidas ao choque térmico, foi observada uma indução na expressão gênica, com um perfil bastante semelhante ao apresentado pelo promotor *GSY2*. O oposto, no entanto, pode ser observado quando células mutantes *msn2 msn4* carregando a construção pm1 foram submetidas ao choque térmico, mostrando que os fatores de transcrição na levedura são capazes de reconhecer e ligar os elementos regulatórios *cis* do promotor *gsn* e ocasionar um tipo de resposta ao estresse térmico semelhante ao gene *GSY2* da levedura.

Quando a região contendo os elementos HSE foi removida (construção pm2), uma ausência de atividade enzimática foi observada tanto para a linhagem selvagem quanto para a linhagem mutante, em ambas as condições de cultivo, sugerindo que esta região abrigue elementos do tipo *enhancer*, cujas presenças mostraram ser fundamentais para a transcrição gênica na levedura e cujas atividades mostraram ser independentes do elemento STRE. Nas leveduras, os consensos HSE geralmente estão presentes em múltiplas cópias nos promotores de genes responsivos a aumentos de temperatura (PELHAM, 1985; BIENZ & PELHAM, 1987), conferindo indução na expressão gênica após choque térmico e podendo muitas vezes se comportar como elementos do tipo *enhancer* (PELHAM, 1982; PELHAM & BIENZ, 1982; BIENZ & PELHAM, 1986). Quando os elementos HSE e o consenso STRE1 foram simultaneamente removidos, podemos observar um comportamento semelhante ao apresentado pela construção pm1, sugerindo que a região contendo o consenso STRE tenha um papel repressor na transcrição, cuja atividade parece ser controlada pela região contendo os consensos HSE, visto que a remoção isolada do consenso STRE1 (construção pm5) não interfere na transcrição. O envolvimento do elemento STRE como repressor transcricional foi

relatado anteriormente para o gene *HSP12* de *S. cerevisiae*, quando células de levedura foram submetidas a baixas concentrações de glicose (GROOT *et al.*, 2000).

As construções pm4 e pm8 mostraram que o consenso TATA-box não é essencial para transcrição gênica. A presença de atividade β -galactosidase nas construções pm4 e pm8 sugere fortemente que a transcrição seja favorecida pela presença de elementos regulatórios localizados no intron1 do gene *gsn*, diferentes de TATA-box. De fato, ensaios de imunoprecipitação em cromatina, utilizando anticorpos anti-RNA polimerase II mostraram que a frequência de genes cuja ativação da transcrição é mediada pelos consensos TATA-box em humanos é significativamente baixa (KIM *et al.*, 2005), sustentando as observações realizadas em estudos anteriores, onde o TATA-box mostrou estar presente em apenas um pequeno número de promotores em *S. cerevisiae* e *Drosophila* (OHLER *et al.*, 2002).

A importância de *introns* no controle da expressão gênica em fungos é bem conhecida (XU & GONG, 2003; BERGERS *et al.*, 1995). A importância do intron 1 no controle da transcrição gênica foi demonstrada em nosso trabalho, através de ensaios de retardamento em gel usando extratos nucleares preparados a partir de micélio submetido ou não ao choque térmico e sondas de DNA contendo os consensos localizados no intron1. Além disso, resultados anteriores obtidos em nosso laboratório mostraram que o fenótipo deficiente em glicogênio de uma linhagem de *N. crassa* (*gsn^{rip}*) foi completamente revertido apenas pela inserção da cópia genômica do gene *gsn*. A inserção apenas da ORF *gsn* sob o controle de um promotor heterólogo não foi capaz de reverter o fenótipo para acúmulo de glicogênio, sugerindo um papel regulatório para o intron localizado na região 5'-UTR.

As análises realizadas no fungo *N. crassa* ainda não são conclusivas uma vez que a purificação de homocários necessita ser realizada. Mas os resultados preliminares da exposição dos transformantes aos vapores de iodo mostraram que em todas as construções analisadas, pelo menos um clone foi capaz de acumular glicogênio. A inserção de pelo menos uma cópia extra do gene *gsn* no genoma dos transformantes foi comprovada por *Southern blot*. Entretanto, a linhagem utilizada para a transformação favorece a inserção ectópica das cópias de DNA extras, dificultando a interpretação dos resultados obtidos uma vez que não é conhecido o local de inserção da cópia extra no DNA genômico do fungo. Existem, atualmente, linhagens de *N. crassa* geneticamente modificadas nas quais os eventos de recombinação homóloga são aumentados, portanto a recombinação no locus *gsn* levaria a resultados mais consistentes que os atualmente disponíveis. O uso destas linhagens para a análise do promotor mínimo *gsn* deverá resultar em dados mais consistentes que os atuais. É importante salientar que os testes de iodo foram realizados à temperatura ambiente, apenas nas construções pm1, pm2, pm3 e pm4 do promotor mínimo, as quais apresentam deletadas apenas as regiões do promotor apresentando seqüências consensos envolvidas na regulação da expressão gênica durante choque térmico. Uma vez que a transcrição do gene

gsn é reduzida quando células do fungo são incubadas a 45°C, é necessário ainda determinar o acúmulo de glicogênio destes transformantes na situação de choque térmico, a fim de validarmos nossos resultados.

3- Identificação de proteínas envolvidas no controle transcricional do gene gsn durante o choque térmico

Uma outra etapa do nosso trabalho consistiu em tentar identificar a(s) proteína(s) capaz(es) de reconhecer e ligar o elemento STRE da região promotora do gene *gsn*, uma vez que a transcrição é regulada negativamente na situação de estresse térmico e proteínas foram mostradas se ligarem ao consenso deste elemento. Ensaio de retardamento em gel mostraram que duas das frações obtidas após cromatografia de afinidade do extrato nuclear HS30 apresentaram alta atividade de ligação DNA-proteína(s) para o elemento STRE1. Em *S. cerevisiae*, os elementos STRE são bastante conhecidos por mediar respostas a diferentes formas de estresse, independente de sua orientação no promotor (KOBAYASHI & MCENTEE, 1993). Uma análise computacional prévia do genoma da levedura revelou que 186 dos genes analisados eram potencialmente regulados por STRE (MOSKVINA *et al.*, 1998). Nas leveduras, as respostas mediadas pelos elementos STRE frente a diferentes formas de estresse são dependentes da presença dos transativadores do tipo *zinc finger* Msn2p/4p no núcleo das células (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996; SCHMITT & MCENTEE, 1996). Decidimos então realizar uma busca de ortólogos aos transativadores Msn2p/4p em bancos de dados de *N. crassa*, mas não foram encontrados ortólogos.

Dando continuidade à nossa proposta de identificação, as proteínas existentes no extrato HS30 bruto e nas frações após cromatografia apresentando atividade de ligação ao elemento STRE foram fracionadas por SDS-PAGE e com o auxílio de técnicas de renaturação e hibridização (*Southwestern*) identificamos as primeiras proteínas por espectrometria de massas. A ORF NCU02424 mostrou uma proteína potencialmente interessante para investigação futura. Esta ORF codifica uma proteína que se caracteriza por apresentar um domínio de ligação DnaJ localizado na extremidade C-terminal e três domínios tetratricopeptídicos localizados na extremidade N-terminal (Fig. 26A). O domínio DnaJ é responsável por regular a função chaperona das proteínas da família Hsp70, mediando interações diretas entre diferentes proteínas chaperonas da família Hsp70 e proteínas do tipo DnaJ (CYR *et al.*, 1994). Os domínios tetratricopeptídicos (domínios TPR) são estruturas presentes em uma grande variedade de proteínas, desde bactérias até humanos, responsáveis por estabelecer interações proteína-proteína e a formação de multi-complexos

protéicos (DAS *et al.*, 1998). As proteínas da família Hsp70 representam uma classe de chaperonas muito bem conhecida, que atualmente tem se destacado por seu papel na regulação transcricional. Em *Cryptococcus neoformans* a proteína Ssa1, ortóloga Hsp70, mostrou agir como uma proteína coativadora da transcrição do gene que codifica o fator de virulência do fungo, através da sua ligação em uma sequência de DNA rica em GC localizada na região 5'-UAS em resposta a situações estressantes variadas como privação de glicose, alterações de temperatura e presença de metais como ferro, cobre e cálcio. Além disso, durante a indução da expressão gênica a proteína Ssa1 mostrou formar um complexo protéico regulatório com os fatores de transcrição HSF e TBP e sua deleção resulta numa resposta virulenta atenuada, reforçando o papel de coativador transcricional desta representante Hsp70 (ZHANG *et al.*, 2006).

Os ensaios realizados para investigar a provável massa molecular da(s) proteína(s) que ligam no elemento STRE do promotor *gsn* revelaram que as proteínas candidatas apresentam massa molecular ao redor de 40-50 kDa. O provável ponto isoelétrico das proteínas candidatas foi investigado e os resultados obtidos mostraram a presença de frações protéicas de dois pontos isoelétricos diferentes com atividade de ligação ao consenso STRE1, sugerindo a existência de, pelo menos, dois grupos de proteínas capazes de ligar ao elemento STRE. O fracionamento do extrato obtido após cromatografia, através de eletroforese bidimensional, permitiu isolar e identificar por MALDI-TOF/TOF todas as proteínas contidas no intervalo de massa molecular de 40-50 kDa. Dentre as proteínas identificadas (Tabela 3), a maioria delas encontra-se anotada como proteína hipotética e após análise de suas seqüências polipeptídicas, algumas foram consideradas alvos altamente promissores.

O primeiro alvo interessante foi uma proteína codificada pela ORF NCU01021, anotada como relacionada ao fator de iniciação da tradução 3 (eIF3). A análise da seqüência polipeptídica revelou a presença de um domínio Mov3/MPN/PAD-1 (Fig. 26B) localizado na extremidade N-terminal da proteína. Os domínios Mov3/MPN/PAD-1 são encontrados não apenas em subunidades regulatórias do proteossomo 26S mas também nas subunidades eIF3 e reguladores de fatores de transcrição. As proteínas JAB1 (humanos) e pad1 (*Schizosacharomyces pombe*), Mov34 ortólogas, mostraram potencializar seletivamente a transcrição gênica por reconhecer e ligar no consenso regulatório AP-1 (SHIMANUKI *et al.*, 1995; CLARET *et al.*, 1996).

A ORF NCU03876, anotada como sendo uma proteína hipotética, provavelmente relacionada com a subunidade p39 do fator eIF3, mostrou após análise da sua seqüência polipeptídica a presença de domínios WD40 localizados nas extremidades N e C-terminais (Fig. 26C). As proteínas contendo domínios WD40 pertencem a uma grande família de proteínas de eucariotos, envolvidas numa variedade de funções como transdução do sinal e

controle transcricional. Elas coordenam a formação de complexos multi-protéicos através de seus domínios WD40 os quais sempre terminam em Trp ou Asp. Um exemplo destas proteínas são os fatores ativadores da transcrição TAF5 de *S. cerevisiae*. Nas leveduras, o fator de transcrição TFIID, fundamental na regulação da expressão gênica pela RNA polimerase II, é formado por um conjunto de proteínas que incluem a proteína TBP e 14 outros fatores associados à proteína TBP (TAFs). Através de microscopia eletrônica foi observado que este conjunto de proteínas encontra-se organizado em 3 regiões unidas entre si por ligações delicadas e um imuno-mapeamento mostrou que estas ligações eram resultantes dos domínios WD presentes em duas cópias dos fatores TAF5 localizados nestas regiões (LEURENT *et al.*, 2004)

Outra ORF considerada foi a NCU03482, a qual foi anotada como uma proteína hipotética semelhante à helicase do tipo RuvB. As DNA helicases RuvB são importantes, pois fazem parte de complexos protéicos como o Swr1 e Ino80, os quais atuam na remodelagem de cromatina. Enquanto o complexo Swr1 medeia a alteração da histona H2A para sua forma variante de maneira dependente de ATP, o complexo Ino80 remodela a cromatina deslocando os nucleossomos (PAPAMICHOS-CHRONAKIS *et al.*, 2006). A análise da sequência polipeptídica codificada por esta ORF revelou a presença de um domínio ATPase AAA associado a atividades celulares diversas e também um domínio Tip49 C-terminal (Fig. 26D). As proteínas Tip49 foram inicialmente identificadas como proteínas contendo domínios de interação com a proteína TBP que interagem com vários tipos de fatores nucleares, além de apresentar atividade DNA helicase intrínseca. Um exemplo do controle exercido por Tip49 é a repressão de alguns genes alvo durante os estágios de desenvolvimento normal de *Drosophila* pela sua associação com o fator de transcrição dMyc, um órtologo do fator c-myc de vertebrados. A interação dMyc-Tip 49 mostrou ser bastante forte e interfere em várias etapas de desenvolvimento do animal como a duração do desenvolvimento, a taxa de sobrevivência e tamanho do animal adulto (BELLOSTA *et al.*, 2005).

A ORF NCU06679 correspondente ao gene *cac-3* (*chromatin assembly-3*), um ortólogo do gene CAC-3 de *S. cerevisiae* também mostrou ser interessante alvo para experimentos posteriores. Uma região rica em aminoácidos básicos (Lys e Arg) localizada na porção C-terminal sequência protéica foi observada após a análise da sequência polipeptídica (RHRKTRSR). Sequências ricas nestes aminoácidos são descritas funcionar como sinais de localização nuclear (NLS) (DINGWALL & LASKEY, 1998). Além disso, vários domínios WD40 (Fig. 25E), cuja importância transcricional já foi descrita anteriormente para a ORF NCU03876, também foram detectados ao longo da proteína. Na levedura *S. cerevisiae*, os genes CAC (*CAC1*, *CAC2* e *CAC3*) codificam as proteínas do complexo heterotrimérico

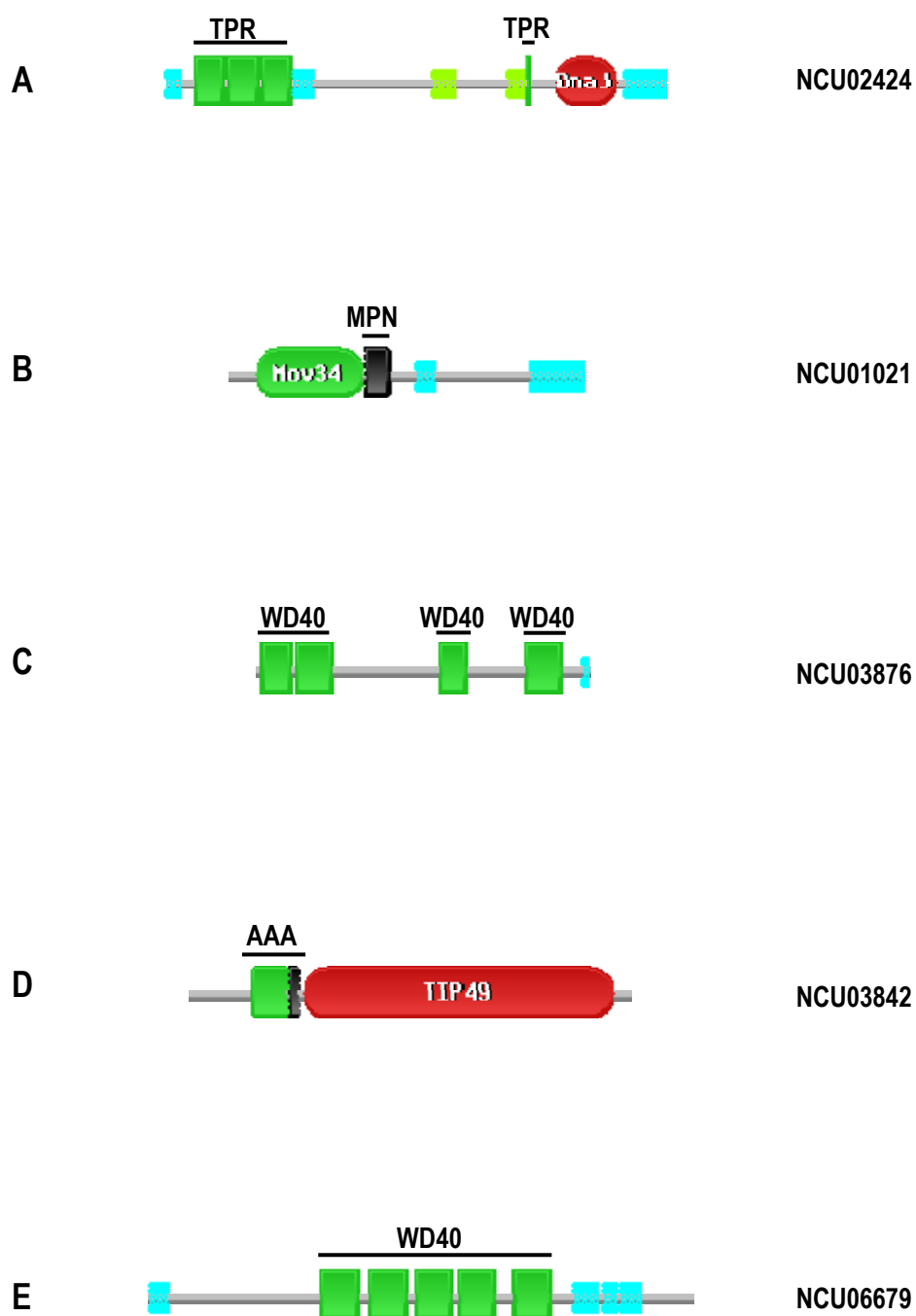


Figura 26. Esquema representativo das proteínas candidatas identificadas por espectrometria de massas. Os principais domínios identificados nas seqüências polipeptídicas estão devidamente representados (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/>).

CAF-I (*Chromatin assembly factor I*), o qual está envolvido em processos como a organização da cromatina durante a etapa de replicação de DNA (SMITH & STILLMAN, 1991) e reparo de DNA (GAILLARD *et al.*, 1996). Outras funções não relacionadas com o arranjo de cromatina também foram atribuídas às proteínas Cac. A busca por supressores multicópias do gene *IRA2* revelou que o gene *CAC3* regula negativamente a via de sinalização do AMPc, por mecanismos ainda desconhecidos (SCHNEIDER *et al.*, 1994). Além disso, células de mamíferos superexpressando a subunidade p150 do complexo CAF-I de humanos mostraram ser capazes de reverter o processo de silenciamento transcricional mediado por cromatina (TCHENIO *et al.*, 2001), demonstrando a participação do complexo CAF-I no controle epigenético da expressão gênica.

4- Influência da via de sinalização mediada por AMPc na regulação da expressão do gene gsn

A via de sinalização AMPc-PKA tem sido bastante implicada nos mecanismos de controle transcricional de genes responsivos a STRE em leveduras, devido regular a localização dos fatores transativadores MSn2p/4p (GÖRNER *et al.*, 1998). Na verdade, a idéia de que deva existir uma via comum para a ativação de genes responsivos a estresse foi reforçada quando se descobriu que muitos destes genes induzidos por estresse eram regulados negativamente pela via AMPc-PKA. Em *S. cerevisiae*, esta via de sinalização encontra-se muito bem caracterizada e parece estar envolvida em vários processos celulares, tais como sensibilidade a nutrientes, regulação da proliferação celular, armazenamento de carboidratos de reserva e resposta a estresse (RUIS & SCHÜLLER, 1995; THEVELEIN, 1994; THEVELEIN & WINDE; 1999). Quando a adenilato ciclase é ativada, ou pelas proteínas da família Ras ou pela proteína G acoplada a um sistema receptor de membrana, produz moléculas de AMPc a partir de ATP, as quais se ligam nas subunidades regulatórias da PKA e permite a dissociação das subunidades suas subunidades catalíticas ativando-a, promovendo alterações em diferentes sistemas celulares, como metabolismo de carboidratos de reserva (Fig. 27).

Trabalhos realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram que os níveis de glicogênio em uma linhagem de *N. crassa* cuja via de sinalização do AMPc é enfraquecida (linhagem *cr-1*) foram bastante elevados ao longo do crescimento vegetativo do fungo. O contrário foi observado quando o acúmulo de glicogênio foi determinado na linhagem mutante *mcb*, a qual se caracteriza por apresentar alta atividade PKA (DE PAULA, 2004).

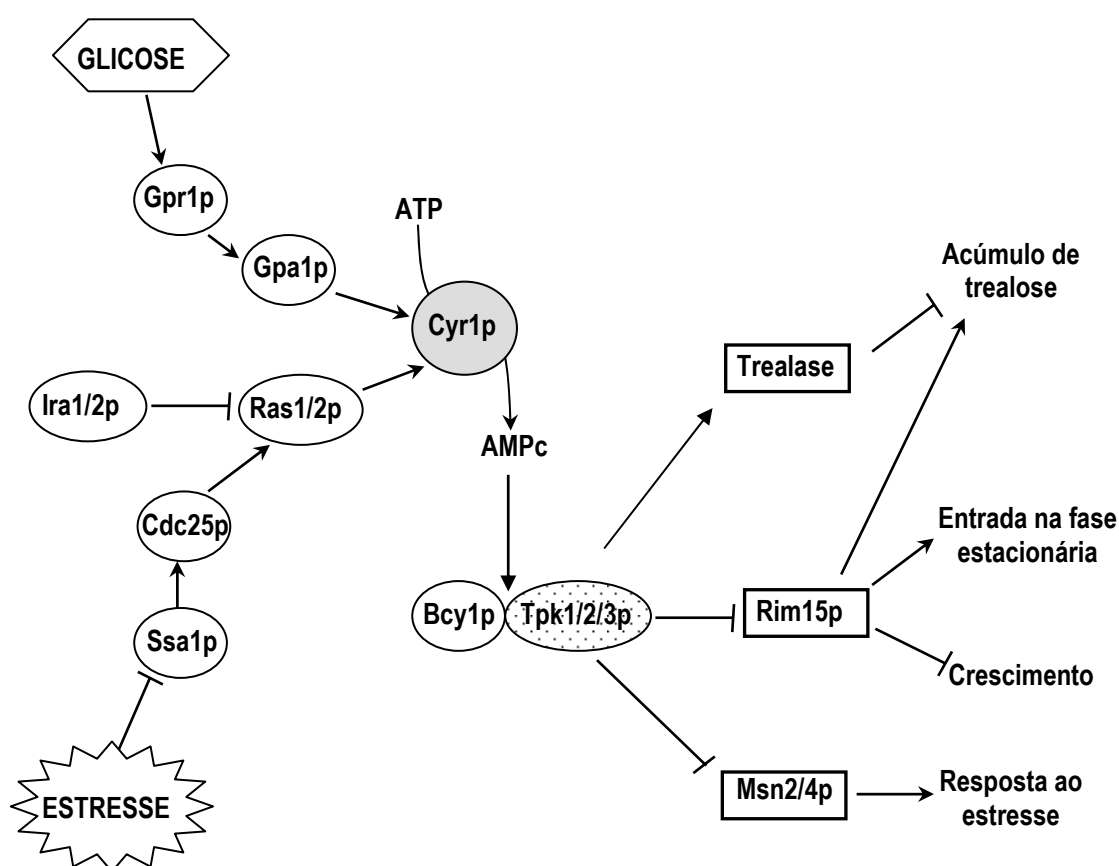


Figura 26. Modelo de regulação da via PKA e alguns de seus alvos em *S. cerevisiae*. O sistema acoplado receptor-proteína G encontra-se envolvido na ativação da síntese de AMPc por glicose. O aumento na concentração de proteínas desnaturadas em resposta às condições estressantes recruta as proteínas Hsp70 (Ssa1p), reduzindo sua interação com a Cdc25p, e consequentemente, a produção de AMPc. A regulação negativa da atividade PKA por condições estressantes e/ou privação de glicose ativa a proteína quinase Rim15p e leva a um acúmulo nuclear dos fatores de transcrição Msn2/4p, resultando em parada do crescimento, acúmulo de trealose e ativação de mecanismos de proteção. As setas apontam para as interações positivas enquanto que as barras apontam as interações negativas. As interações representadas não são necessariamente diretas (ESTRUCH, 2000).

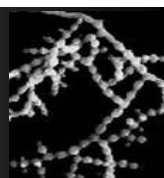
Nosso principal objetivo foi analisar os níveis de transcrito *gsn* nestas linhagens mutantes, tanto na situação de crescimento vegetativo do fungo quanto na situação de choque térmico e verificar se a via de sinalização estudada interfere na transcrição gênica nas condições ambientais analisadas. Enquanto na linhagem selvagem um pico máximo de expressão gênica foi observado após 24 h de cultivo, na linhagem *cr-1*, onde os níveis de AMPc são praticamente ausentes, foram observadas flutuações no perfil de expressão do gene *gsn* ao longo da curva de crescimento. Para a linhagem mutante apresentando uma PKA hiperativa (linhagem *mcb*), os níveis de mensageiro *gsn* permaneceram praticamente constantes durante todo o crescimento. Alterações nos padrões de expressão gênica em resposta a variações nos níveis de AMPc celular já foram descritas para células de *S. cerevisiae*. A expressão de alguns genes *HSP* mostrou ser aumentada nas células mutantes *ras2*, onde a atividade PKA encontra-se bastante reduzida enquanto que em mutantes *bcy1*, onde a atividade PKA encontra-se exacerbada, os níveis de transcritos foram fortemente reduzidos (RUIS & SCHÜLLER, 1995; ENGELBERT *et al.*, 1994).

Podemos concluir, portanto, que os mecanismos de controle transcricional existentes na levedura envolvendo a via de sinalização AMPc-PKA atuam de maneira diferente do fungo. Não foi possível estabelecermos uma correlação direta entre os níveis de AMPc e atividade PKA em *N. crassa* no controle transcricional do gene *gsn* uma vez que o perfil de expressão gênica observado nos mutantes *cr-1* foram bastante variáveis ao longo da curva de crescimento. Na situação de choque térmico, os níveis de transcrito *gsn* mostraram ser reduzidos nas duas linhagens analisadas, em relação à linhagem selvagem, confirmando a participação da via de sinalização na resposta ao estresse. Resultado contrário pôde ser observado em *S. cerevisiae*, onde o choque térmico ativa a transcrição de genes responsivos a estresse através dos consensos STRE e dos transativadores Msn2/4p e a localização nuclear destes transativadores é inversamente proporcional à atividade PKA. Portanto, células de levedura apresentando PKA hiperativa são incapazes de responder ao estresse térmico apropriadamente, acarretando numa redução da transcrição dependente de STRE dos genes alvos.

Uma vez que os ensaios de hibridização mostraram o envolvimento do AMPc no controle transcricional do gene *gsn*, realizamos ensaios de EMSA para verificarmos se os níveis de AMPc interferem de alguma maneira na formação do complexo STRE1-proteínas nucleares. A detecção de bandas de DNA de mobilidade reduzida tanto para a amostra não submetida ao choque térmico quanto para o extrato HS30 da linhagem *cr-1* sugerem que os baixos níveis de AMPc favorecem a formação de complexos DNA-proteínas mesmo na ausência de aumento de temperatura. Além disso, as diferenças observadas nos *shifts* obtidos para a amostra ZERO e HS30 sugerem que as proteínas contidas no complexo formado no tempo ZERO não são necessariamente as mesmas contidas no complexo

formado com o extrato HS30. Quando a linhagem apresentando PKA hiperativa (*mcb*) foi analisada, a presença de um *shift* extremamente intenso próximo à origem do gel foi detectada para a amostra ZERO, sugerindo que o aumento na taxa de fosforilação pela PKA favoreceu a ligação de proteínas ao elemento STRE. O *shift* observado quando a amostra HS30 foi usada apresentou uma intensidade e tamanho menor do que o observado para a amostra ZERO, indicando que na situação de choque térmico, a fosforilação ocasionada pela PKA pode estar controlando negativamente as localizações nucleares de algumas proteínas, ocasionando redução na taxa de transcrição do gene *gsn*, confirmando os resultados obtidos por Northern blot para choque térmico. Fica claro, portanto, que os níveis de AMPc celulares são fundamentais no controle da formação de complexos DNA-proteínas e consequentemente, na ativação ou repressão da transcrição do gene *gsn*, sobretudo na condição de estresse térmico.

Conclusões



Analisando detalhadamente os resultados obtidos durante cada etapa do desenvolvimento deste trabalho, foi possível estabelecermos as seguintes conclusões:

1- Caracterização dos elementos transcrpcionais regulatórios presentes nas regiões flaqueadoras do gene gsn

- Os elementos HSE e STRE localizados na região 5' flaqueadora do gene são funcionais e a capacidade destes elementos em serem reconhecidos e ligados por proteínas nucleares de *N. crassa* encontra-se publicada no artigo "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 (2004) 272: 550-561]
- Embora o controle transcricional mediado pela região 3' flaqueadora de genes tenha sido relatado apenas para eucariotos superiores, o elemento STRE localizado na região 3' flaqueadora do gene *gsn* mostrou ser funcional e pode, portanto, estar envolvido na regulação da expressão gênica no fungo.

2- Caracterização preliminar das regiões do promotor gsn importantes para a transcrição gênica

2.1. Para os ensaios realizados na levedura S. cerevisiae

- Os fatores de transcrição de *S. cerevisiae* foram capazes de reconhecer o promotor exógeno *gsn*, produzindo um perfil de expressão semelhante ao observado para o promotor endógeno GSY2, apenas em menor intensidade
- A ausência de atividade enzimática observada quando a região contendo os elementos HSE é removida sugere a presença de elementos do tipo *enhancer* nesta região
- A ativação da transcrição gênica mostrou ser independente do consenso TATA box e parece ser direcionada pelos elementos regulatórios localizados no intron da região 5'-UTR

2.2. Para os ensaios realizados no fungo

- O fenótipo selvagem para acúmulo de glicogênio mostrou ser restaurado na linhagem *gsnrip* para todas as construções analisadas. Entretanto, devido à linhagem utilizada para a transformação do fungo favorecer a recombinação ectópica das cópias extras de DNA, fica difícil a interpretação dos resultados nesta linhagem. A utilização de uma linhagem do fungo que favoreça eventos de recombinação homóloga deverá, no futuro, fornecer dados mais consistentes que os atualmente disponíveis

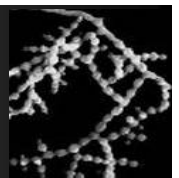
3- Identificação de proteínas envolvidas no controle transcricional do gene gsn durante o choque térmico

- As proteínas nucleares que ligam no elemento STRE do promotor *gsn* apresentam MM entre 30 e 50 kDa
- A detecção de atividade de ligação DNA-proteína em duas frações protéicas de pontos isoelétricos distintos (3,54 - 4,08 e 6,77 - 7,31) sugere que pelo menos duas proteínas diferentes são capazes de reconhecer e ligar na região do promotor *gsn* abrigando o consenso STRE
- Os ensaios de hibridização e retardamento em gel, acoplados a géis 2D e MALDI permitiram a identificação de várias proteínas nucleares de *N. crassa*. A análise das seqüências polipeptídicas destas proteínas permitiu a seleção de 5 alvos interessantes, devido à presença de domínios protéicos que permitem interações DNA-proteína e proteína-proteína. A expressão destas proteínas bem como seu uso em ensaios funcionais deverão confirmar estas evidências

4- Influência da via de sinalização mediada por AMPc na regulação da expressão do gene gsn

- As alterações observadas nos padrões de expressão gênica em resposta às variações no conteúdo de AMPc celular (*cr-1*) e atividade PKA (*mcb*) mostraram que a via de sinalização mediada por AMPc participa, de maneira direta ou indireta, na modulação da transcrição
- As diferenças observadas nos padrões de ligação DNA-proteína(s) nas análises de EMSA, utilizando como sonda o consenso STRE do promotor *gsn* e extratos nucleares das linhagens selvagem, *cr-1* e *mcb* sugerem que a ligação STRE-proteínas é dependente de AMPc
- Todos os consensos CRE encontrados no promotor *gsn* são funcionais. Embora não tenham sido encontrados ortólogos CREB em *N. crassa*, as proteínas “CREB-like” de *N. crassa* mostraram ser ativadas por fosforilação formando complexos DNA-proteínas e a formação destes complexos mostrou ser dependente do conteúdo de AMPc celular

Bibliografia



AHN, S.-G.; LIU, P. C.; KLYACHKO, K.; MORIMOTO, R. I.; THIELE, D. J. The loop domain of heat shock transcription factor 1 dictates DNA-binding specificity and responses to heat stress. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 16, p. 2134-2145, Aug. 2001.

ALONSO, M. D.; LOMAKO, J.; LOMAKO, W. M.; WHELAN, W. J. A new look at the biogenesis of glycogen. **FASEB J.**, Bethesda, v. 9, n. 12, p. 1126-1137, Sept. 1995.

AMOROS, M.; ESTRUCH, F. Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 39, n. 6, p. 1523-1532, Mar. 2001.

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, 1987.

BAI, G.; ZHANG, Z.; WERNER, R.; NUTTAL, F. Q.; TAN, A. W. H.; LEE, E. Y. C. The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 14, p. 7843-7848, May 1990.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 27, n. 11, p. 499-506, Nov. 1941.

BECK, I.; RAMIREZ, S.; WEINMANN, R.; CARO, J. Enhancer element at the 3'-flanking region controls transcriptional response to hypoxia in the human erythropoietin gene. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 24, p. 15563-15566, Aug. 1991.

BECKER, J. U.; VOHMANN, H. J.; KÖNIG-EILERS, C. Glycogen metabolism in resting and growing-cells of *Saccharomyces carlsbergensis*. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v. 123, n. 2, p. 143-149, Nov. 1979.

BELLOSTA, P.; HULF, T.; BALLA-DIOP, S.; USSEGLIO, F.; PRADEL, J.; ARAGNOL, D.; GALLANT, P. Myc interacts genetically with Tip48/Reptin and Tip49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 102, n. 33, p. 11799-11804, Aug. 2005.

BERGERS, G.; GRANINGER, P.; BRASELMANN, S.; WRIGHTON, G.; BUSSLINGER, M. Transcriptional activation of the *fra-1* gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 15, n. 7, p. 3748-3758, July 1995.

BIENZ, M.; PELHAM, H. B. R. Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the *Xenopus hsp70* gene and when linked to a heterologous promoter. **Cell**, Cambridge, MA, v. 45, n. 5, p. 753-760, June 1986.

BIENZ, M.; PELHAM, H. R. B. Mechanisms of the heat shock gene activation in higher eukaryotes. **Adv. Genet.**, San Diego, v. 24, p. 31-72, 1987.

BISTIS, G. N.; PERKINS, D. D.; READ, N. D. Cell types of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newsl.**, Kansas City, v. 50, p. 17-19, 2003.

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.; POLYMERIS, 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. 68, n. 1, p. 1-108, Mar. 2004.

BOY-MARCOTTE, E.; TADI, D.; PERROT, M.; BOUCHERIE, H.; JACQUET, M. High cAMP levels antagonize the reprogramming of gene expression that occurs at the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, Reading, v. 142, n. 3, p. 459-467, Mar. 1996.

BOY-MARCOTTE, E.; PERROT, M.; BUSSEAU, F.; BOUCHERIE, H.; JACQUET, M. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 180, n. 5, p. 1044-1052, Mar. 1998.

BROACH, J. R.; DESCHENES, R. J. The function of *RAS* genes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Adv. Cancer Res.**, San Diego, v. 54, p. 79-138, 1990.

BROWNER, M. F.; NAKANO, K.; BANG, A. G.; FLETTERICK, R. J. Human muscle glycogen synthase cDNA sequence: a negatively charged protein with an asymmetric charge distribution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 86, n. 5, p. 1443-1447, Mar. 1989.

BRUCHEZ, J. J. P.; EBERLE, J.; RUSSO, V. E. A. Regulatory sequences in the transcription of *Neurospora crassa* genes: CAAT box, TATA box, Introns, Poly(A) tail formation sequences. **Fungal Genet. Newsl.**, Kansas City, v. 40, p. 89-98, 1993.

CAMERON, S.; LEVIN, L.; ZOLLER, M.; WIGLER, M. cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism and heat shock resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell**, Cambridge, MA, v. 53, n. 4, p. 555-566, May 1988.

CANNON, J.; GITAN, R.; TATCHELL, K. Yeast cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit mutations display a variety of phenotypes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 20, p. 11897-11904, July 1990.

CANNON, J.; TATCHELL, K. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cAMP-dependent protein kinase. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 7, n. 8, p. 2653-2663, Aug. 1987.

CARLING, D.; AGUAN, R.; WOODS, A.; VERHOEVEN, A. M.; BERIM, R. K.; BRENNAN, C. H.; SIDEBOTTOM, C.; DAVISON, M. D.; SCOTT, J. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 15, p. 11442-8, Apr. 1994.

CARLING, D.; HARDIE, D. G. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1012, n. 1, p. 81-6, June 1989.

CASADABAN, M. J.; COHEN, S. N. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.**, New York, v. 138, n. 2, p. 179-207, Apr. 1980.

CAUSTON, H. C.; REN, B.; KOH, S. S.; HARBISON, C. T.; KANIN, E.; JENNINGS, E. G.; LEE, T. I.; TRUE, H. L.; LANDER, E. S.; YOUNG, R. A. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 21, n. 2, p. 323-337, Feb. 2001.

CHU, B.; SONCIN, F.; PRICE, B. D.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Sequential phosphorylation by mitogen-activated protein kinase and glycogen synthase kinase 3 represses transcriptional activation by heat shock factor 1. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 271, n. 48, p. 30847-30857, Nov. 1996.

CHU, B.; ZHONG, R.; SONCINI, F.; STEVENSON, M. A.; CALDERWOOD, S. K. Transcriptional activity of heat shock factor 1 at 37°C is repressed through phosphorylation on two distinct serine residues by glycogen synthase kinase 3 α and protein kinases C α and C ζ . **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, n. 29, p. 18640-18646, July 1998.

CLARET, F. X.; HIBI, M.; DHUT, S.; TODA, T.; KARIN, M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. **Nature**, London, v. 383, n. 6599, p. 453-457, Oct. 1996.

COLONNA, W. J.; MAGEE, P. T. Glycogenolytic enzymes in sporulating yeast. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 134, n. 3, p. 844-853, June 1978.

COMB, M.; BIRNBERG, N. C.; SEASHOLTZ, A.; HERBERT, E.; GOODMAN, H. M. A cyclic-AMP- and phorbol-ester inducible DNA element. **Nature**, London, v. 323, n. 6086, p. 353-356, Sept.-Oct. 1986.

CRAIG, J. C.; SCHUMACHER, M. A.; MANSOOR, S. E.; FARRENS, D. L.; BRENNAN, R. G.; GOODMAN, R. H. Consensus and variant cAMP-regulated enhancers have distinct CREB-binding properties. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 15, p. 11719-11728, Apr. 2001.

CYR, D. M.; LANGER, T.; DOUGLAS, M. G. DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v. 19, n. 4, p. 176-181, Apr. 1994.

DAS, A. K.; COHEN, P. W.; BARFORD, D. The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. **EMBO J.**, Oxford, v. 17, n. 5, p. 1192-1199, Mar. 1998.

DAVIS, R. H. **Neurospora**: contributions of a model organism. New York: Oxford University Press, 2000.

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.

DAVIS, R. H.; SERRES, F. J. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. **Meth. Enzymol.**, New York, v. 17A, p. 70-143, 1970.

DE CESARE, D.; JACQUOT, S.; HANAUER, A.; SASSONE-CORSI, P. Rsk-2 activity is necessary for epidermal growth factor induced phosphorylation of CREB protein and transcription of *c-fos* gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 95, n. 21, p. 12202–12207, Oct. 1998.

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. **Metabolismo do glicogênio em *Neurospora crassa***: um estudo molecular e bioquímico e análise de interação proteína-proteína. 164 f. 2004. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

DE PINHO, C. A.; POLIZELI, M. L. T. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F. Mobilization of trehalose in mutants of the cyclic AMP signaling pathway, *cr-1* (CRISP-1) and *mcb* (microcycle conidiation), of *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 199, n. 1, p. 85-89, May 2001.

DINGWALL, C.; LASKEY, R. A. Nuclear import: a tale of two sites. **Curr. Biol.**, London, v. 8, n. 5, p. R922-R924, Dec. 1998.

ENGELBERT, D.; ZANDI, E.; PARKER, C. S.; KARIN, M. The yeast and mammalian Ras pathways control transcription of heat shock genes independently of heat shock transcription factor. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 14, n. 7, p. 4929-4937, July 1994.

ENJALBERT, B.; PARROU, J. L.; FRANÇOIS, J. F. Combinatorial control by the protein kinases PKA, PHO85 and SNF1 of the transcriptional induction of the *Saccharomyces cerevisiae* GSY2 gene at the diauxic shift. **Mol. Genet. Genomics**, Berlin, v. 271, n. 6, p. 697-708, July 2004.

ESSER, K.; KUENEN, R. **Genetics of fungi**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1967.

ESTRUCH, F. Stress controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 469-486, Oct. 2000.

FARKAS, I.; HARDY, T. A.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Isolation of the GSY1 gene encoding 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.

FEDER, M. E.; HOFMANN, G. E. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 61, p. 243-282, 1999.

FELINSKI, E. A.; QUINN, P. G. The CREB constitutive activation domain interacts with TATA-binding protein associated factor 110 (TAF110) through specific hydrophobic residues in one of the three subdomains required for both activation and TAF110 binding. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 274, n. 17, p. 11672-11678, Apr. 1999.

FELINSKI, E. A.; KIM, J.; LU, J.; QUINN, P. G. Recruitment of an RNA polymerase II complex is mediated by the constitutive activation domain in CREB, independently of CREB phosphorylation. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 21, n. 4, p. 1001-1010, Feb. 2001.

FERNÁNDEZ-BAÑARES, I.; CLOTET, J.; ARIÑO, J.; GUINOVART, J. J. Glycogen hyperaccumulation in *Saccharomyces cerevisiae* ras2 mutant. A biochemical study. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 290, n. 1/2, p. 38-42, Sept. 1991.

FINCHAN, J. R. S.; DAY, P. R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. 4th ed. New York: Black-Well Scientific Publication, 1979.

FINK, J. S.; VERHAVE, M.; KASPER, S.; TSUKADA, T.; MANDEL, G.; GOODMAN, R. H. The CGTCA sequence motif is essential for biological activity of the vasoactive intestinal peptide gene cAMP-regulated enhancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 85, n. 18, p. 6662-6666, Sept. 1988.

FIOL, C. J.; MAHRENHOLZ, A. M.; WANG, Y.; ROESKE, R. W.; ROACH, P. J. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, n. 29, p. 14042-14048, Oct. 1987.

FLOTOW, H.; GRAVES, P. R.; WANG, A.; FIOL, C. J.; ROESKE, R. W.; ROACH, P. J. Phosphate groups as substrate determinants for casein kinase I Action. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 24, p. 14264-14269, Aug. 1990.

FRANÇOIS, J.; NEVES, M. J.; HERS, H. G. The control of trehalose biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for a catabolite inactivation and repression of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase. **Yeast**, Chichester, v. 7, n. 6, p. 575-587, Aug.-Sept. 1991.

FRANÇOIS, J.; HIGGINS, D. L.; CHANG, F.; TATCHELL, K. Inhibition of glycogen synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* by the mating pheromone alpha-factor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, n. 10, p. 6174-6180, Apr. 1991.

FRANÇOIS, J. M.; THOMPSON-JAEGER, S.; SKROCH, J.; ZELLENKA, U.; SPEVAK, W.; TATCHELL, K. *GAC1* may encode a regulatory subunit for protein phosphatase type 1 in *S. cerevisiae*. **EMBO J.**, Oxford, v. 11, n. 1, p. 87-96, Jan. 1992.

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.

FRANÇOIS, J.; VILLANUEVA, M. E.; HERS, H. The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion *in vivo* of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 174, n. 3, p. 551-559, June 1988.

FREITAS, F. Z. **Organização estrutural do gene da glicogênio sintase de *Neurospora crassa***: caracterização parcial da região promotora. 106 f. 2002. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 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. Genet. Genomics**, Berlim, v. 272, n. 5, p. 550-561, Dec. 2004.

FU, Y.-H.; MARZLUF, G. A. *nit-2*, the major positive-acting nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a sequence-specific DNA-binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 87, n. 14, p. 5331-5335, July 1990.

FURUKAWA, K.; TAGAYA, M.; INOUE, M.; PREISS, J.; FUKUI, T. Identification of lysine¹⁵ at the active site in *Escherichia coli* glycogen synthase. Conservation of a Lys-X-Gly-Gly sequence in the bacterial and mammalian enzymes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 4, p. 2086-2090, Feb. 1990.

GAILLARD, P. H.; MARTINI, E. M.; KAUFMAN, P. D.; STILLMAN, B.; MOUSTACCHI, E.; ALMOUZNI, G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. **Cell**, Cambridge, MA, v. 86, n. 6, p. 887-96, Sept. 1996.

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.

GANCEDO, J. M. Yeast carbon catabolite repression. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 62, n. 2, p. 334-361, June 1998.

GIARDINA, C.; LIS, J. T. Dynamic protein-DNA architecture of a yeast heat shock promoter. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 15, n. 5, p. 2737-2744, May 1995.

GIMENO, C. J.; LJUNGDAHL, P. O.; STYLES, C. A.; FINK, G. R. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. **Cell**, Cambridge, MA, v. 68, n. 6, p. 1077-1090, Mar. 1992.

GONZALEZ, G. A.; MONTMINY, M. R. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. **Cell**, Cambridge, MA, v. 59, n. 4, p. 675-680, Nov. 1989.

GOPALAKRISHNAN, L.; SCARPULLA, R. C. Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COX IV gene expression. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 1, p. 105-113, Jan. 1994.

GÖRNER, W.; DURCHSCHLAG, E.; MARTINEZ-PASTOR, M. T.; ESTRUCH, F.; AMMERER, G.; HAMILTON, B.; RUIS, H.; SCHÜLLER, C. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger

protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 4, p. 586-597, Feb. 1998.

GOW, N. A. R. Tip growth and polarity. In: GOW, N. A. R.; GADD, G. M. **The growing fungus**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 277-299.

GROOT, E.; BEBELMAN, J. P.; MAGER, W. H.; PLANTA, R. J. Very low amounts of glucose cause repression of the stress-responsive gene *HSP12* in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, Reading, v. 146, n. 2, p. 367-375, Feb. 2000.

HAGIWARA, M.; BRINDLE, P.; HAROOTUNIAN, A.; RIVIER, J.; VALE, W.; TSIEN, R.; MONTMINY, M. R. Coupling of hormonal stimulation and transcription via cyclic AMP-responsive factor CREB is rate limited by nuclear entry of protein kinase A. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 13, n. 8, p. 4852-4859, Aug. 1993.

HAHN, J.-S.; HU, Z.; THIELE, D. J.; IYER, V. R. Genome-wide analysis of the biology of stress responses through heat shock transcription factor. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 24, n. 12, p. 5249-5256, June 2004.

HANDEN, J. S.; ROSENBERG, H. F. An improved method for southwestern blotting. **Front. Biosci.**, Tampa, v. 2, p. 9-11, June 1997.

HARDY, T. A.; HUANG, D.; ROCH, P. J. Interactions between cAMP-dependent and SNF1 proteins kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 45, p. 27907-27913, Nov. 1994.

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.

HARRIS, S. D. Septum formation in *Aspergillus nidulans*. **Curr. Opin. Microbiol.**, London, v. 4, n. 6, p. 736-739, Dec. 2001.

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.

HASHIKAWA, N.; SAKURAI, H. Phosphorylation of the yeast heat shock transcription factor is implicated in gene-specific activation dependent on the architecture of the heat shock element. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 24, n. 9, p. 3648-3659, May 2004.

HAWKSWORTH, D. L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species stimate revisited. **Mycol. Res.**, Cambridge, MA, v. 105, p. 1422-1432, 2001.

HERZIG, R. P.; SCACCO, S.; SCARPULLA, R. C. Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, n. 17, p. 13134-13141, Apr. 2000.

HICKEY, P. C.; JACOBSON, D. J.; READ, N. D.; GLASS, L. N. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 37, n. 1, p. 109-119, Oct. 2002.

HIRATA, Y.; ANDOH, T.; ASAHARA, T.; KIKUCHI, A. Yeast glycogen synthase kinase 3 activates Msn2p-dependent transcription of stress responsive genes. **Mol. Biol. Cell.**, Bethesda, v. 14, n. 1, p. 302-312, Jan. 2003.

HOFER, T.; SPIELMANN, P.; STENGEL, P.; STIER, B.; KATSCHINSKI, D. M.; DESBAILLETS, I.; GASSMANN, M.; WENGER, R. H. Mammalian PASKIN, a PAS-serine/threonine kinase related to bacterial oxygen sensors. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 288, n. 4, p. 757-764, Nov. 2001.

HOLMBERG, C. I.; TRAN, S. E.; ERIKSSON, J. E.; SISTONEN, L. Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, UK, v. 27, n. 12, p. 619-627, Dec. 2002.

HUANG, D.; FARKAS, I.; ROACH, P. J. Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 16, n. 8, p. 4357-4365, Aug. 1996.

HUANG, D.; MOFFAT, J.; WILSON, W. A.; MOORE, L.; CHENG, C.; ROACH, P. J.; ANDREWS, B. Cyclin partners determine Pho85p protein kinase substrate specificity *in vitro* and *in vivo*: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 18, n. 6, p. 3289-3299, June 1998.

HUANG, K. P.; CABIB, E. Yeast glycogen synthetase is the glucose-6-phosphate dependent form. I. Purification and properties. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 249, n. 12, p. 3851-3857, June 1974.

HUANG, T. S.; KREBS, E. G. Amino acid sequence of a phosphorylation site in skeletal muscle glycogen synthetase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 75, n. 3, p. 643-650, Apr. 1977.

IGUCHI-ARIGA, S. M.; SCHAFFNER, W. CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 3, n. 5, p. 612-619, May 1989.

JAKOBSEN, B. K.; PELHAM, H. R. B. Constitutive binding of yeast heat shock factor to DNA *in vivo*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 8, n. 11, p. 5040-5042, Nov. 1988.

JOHNSTON, G. C.; PRINGLE, J. R.; HARTWELL, L. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Exp. Cell Res.**, Orlando, v. 105, n. 1, p. 79-98, Mar. 1977.

JOHNSTON, M.; CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In: JONES, E. W.; PRINGLE, J. R.; BROACH, J. R. **Gene Expression**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. p.193-281. (The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, v. 2).

KANE, S. M.; ROTH, R. Carbohydrate metabolism during ascospore development in yeast. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 118, n. 1, p. 8-14, Apr. 1974.

KIM, T. H.; BARRERA, L. O.; ZHENG, M.; QU, C.; SINGER, M. A.; RICHMOND, T. A.; WU, Y.; GREEN, R. D.; REN, B. A high-resolution map of active promoters in the human genome. **Nature**, London, v. 436, n. 7052, p. 876-880, Aug. 2005.

KINGSTON, R. E.; SCHUETZ, T. J.; LARIN, Z. Heat-inducible human factor that binds to a human hsp70 promoter. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 7, n. 4, p. 1530-1534, Apr. 1987.

KLINE, M. P.; MORIMOTO, R. I. Repression of the Heat Shock Factor 1 transcriptional activation domain is modulated by constitutive phosphorylation. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 17, n. 4, p. 2107-2115, Apr. 1997.

KNAUF, U.; NEWTON, E. M.; KYRIAKIS, J.; KINGSTON, R. E. Repression of human heat shock factor 1 activity at control temperature by phosphorylation. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 21, p. 2782-93, Nov. 1996.

KOBAYASHI, N.; McENTEE, K. Identification of *cis* and *trans* components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 13, n. 1, p. 248-256, Jan. 1993.

KROEGER, P. E.; MORIMOTO, R. I. Selection of new HSF1 and HSF2 DNA-binding sites reveals difference in trimer cooperativity. **Mol. Cell Biol.**, Washington, v. 14, n. 11, p. 7592-7603, Nov. 1994.

KRUMLAUF, R.; MARZLUF, G. A. Characterization of the sequence complexity and organization of the *Neurospora crassa* genome. **Biochemistry**, Washington, v. 18, n. 17, p. 3705-3713, Aug. 1979.

KUMAR, A.; LARSEN, C. E.; PREISS, J. Biosynthesis of bacterial glycogen. Primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose:alpha-1,4-glucan, 4-glucosyltransferase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgA* gene. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, n. 34, p. 16256-16259, Dec. 1986.

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.

LARSON, J. S.; SCHUETZ, T. J.; KINGSTON, R. E. Activation in vitro of sequence-specific DNA binding by a human regulatory factor. **Nature**, London, v. 335, n. 6188, p. 372-375, Sept. 1988.

LELOIR, L. F. Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. **Science**, Washington, v. 172, n. 990, p. 1299-1303, June 1971.

LENBURG, M. E.; O'SHEA, E. K. Signaling phosphate starvation. **Trends Biochem. Sci.**, Cambridge, UK, v. 21, n. 10, p. 383-387, Oct. 1996.

LEUNG, P. S.; PREISS, J. Biosynthesis of bacterial glycogen: primary structure of *Salmonella typhimurium* ADP glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgC* gene. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 169, n. 9, p. 4355-4360, Sept. 1987.

LEURENT, C.; SANDERS, S. L.; DEMENY, M. A.; GARBETT, K. A.; RUHLMANN, C.; WEIL, P. A.; TORA, L.; SCHULTZ, P. Mapping key functional sites within yeast TFIID. **EMBO J.**, Oxford, v. 23, n. 4, p. 719-727, Feb. 2004.

LILLIE, S. H.; PRINGLE, J. R. Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, Sept. 1980.

LIU, J. S.; PARK, E. A.; GURNEY, A. L.; ROESLER, W. J.; HANSON, R. W. Cyclic AMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) gene transcription is mediated by multiple promoter elements. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 266, n. 28, p. 19095-19102, Oct. 1991.

LIU, X. D.; THIELE, D. J. Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 10, n. 5, p. 592-603, Mar. 1996.

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.

MACDANIEL, D.; CAPLAN, A. J.; LEE, M. S.; ADAMS, C. C.; FISHEL, B.; GROSS, D. S.; GARRARD, W. T. Basal-level expression of the yeast *HSP82* gene requires a heat shock regulatory element. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 9, n. 11, p. 4789-4798, Nov. 1989.

MAHESHWARI, R. Microconidia of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.**, Orlando, v. 26, n. 1, p. 1-18, Feb. 1999.

MAHRENHOLZ, A. M.; WANG, Y.; ROACH, P. J. Catalytic site of rabbit glycogen synthase isozymes. Identification of an active site lysine close to the amino terminus of the subunit. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, n. 22, p. 10561-10567, Aug. 1988.

MANNHAUPT, G.; MONTRONE, C.; HAASE, D.; MEWES, H. W.; AIGN, V.; HOHEISEL, J. D.; FARTMANN, B.; NYAKATURA, G.; KEMPKEN, F.; MAIER, J.; SCHULTE, U. What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. **Nucleic Acids Res.**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 1944-1954, Apr. 2003.

MARCHLER, G.; SCHÜLLER, C.; ADAM, G.; RUIS, H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. **EMBO J.**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 1997-2003, May 1993.

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.**, Oxford, v. 15, n. 9, p. 2227-2235, May 1996.

MATTHEWS, R. P.; GUTHRIE, C. R.; WAILES, L. M.; ZHAO, X.; MEANS, A. R.; McKNIGHT, G. S. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase types II and IV differentially regulate CREB dependent gene expression. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 14, n. 9, p. 6107-6116, Sept. 1994.

MAYR, B.; MONTMINY, M. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.**, London, v. 2, n. 8, p. 599-609, Aug. 2001.

MEASDAY, V.; MOORE, L.; RETNAKARAN, R.; LEE, J.; DONOVIEL, M.; NEIMAN, A. M.; ANDREWS, B. A family of cyclin-like proteins tha interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 17, n. 3, p. 1212-1223, Mar. 1997.

MEYER, U.; MONNERJAHN, C.; TECHEL, D.; RENSING, L. Interaction of the *Neurospora crassa* heat shock factor with the heat shock element during heat shock and different developmental stages. **FEMS Microbiol. Lett.**, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 255-261, Apr. 2000.

MITCHELHILL, K. I.; STAPLETON, D.; GAO, G.; HOUSE, C.; MICHELL, B.; KATSIS, F.; WITTERS, L. A.; KEMP, B. E. Mammalian AMP-activated protein kinase shares structural and functional homology with the catalytic domain of yeast Snf1 protein kinase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 269, n. 4, p. 2361-2364, Jan. 1994.

MONTMINY, M. R.; SEVARINO, K. A.; WAGNER, J. A.; MANDEL, G.; GOODMAN, R. H. Identification of a cyclic-AMP responsive element within the rat somatostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 83, n. 18, p. 6682-6686, Sept. 1986.

MORIMOTO, R. I. Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 24, p. 3788-3796, Dec. 1998.

MORANO, K. A.; THIELE, D. J. Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. **Gene Expr.**, Elmsford, v. 7, n. 4/6, p. 271-282, 1999.

MOSKVINA, E.; SCHÜLLER, C.; MAURER, C. T.; MAGER, W. H.; RUIS, H. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. **Yeast**, Chichester, v. 14, n. 11, p. 1041-1040, Aug. 1998.

MYERS, A. M.; TZAGOLOFF, A.; KINNEY, D. M.; LUSTY, C. J. Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for constructions of *lacZ* fusions. **Gene**, Amsterdam, v. 45, n. 3, p. 299-310, 1986.

NAGATA, O.; TAKASHIMA, T.; TANAKA, M.; TSUKAGOSHI, N. *Aspergillus nidulans* nuclear proteins bind to a CCAAT element and the adjacent upstream sequence in the promoter region of the starch-inducible Taka-amylase A gene. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. 237, n. 1/2, p. 251-260, Feb. 1993.

NAKAJIMA, T.; UCHIDA, C.; ANDERSON, S.; PARVIN, J.; MONTMINY, M. Analysis of a cAMP-responsive activator reveals a two-component mechanism for transcriptional induction via signal-dependent factors. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 11, n. 6, p. 738-747, Mar. 1997.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000.

NEWMAYER, D.; PERKINS, D. D.; BARRY, E. G. An annotated pedigree of *Neurospora crassa* laboratory wild types. showing the probable origin of the nucleolus satellite and showing that certain stocks are not authentic. **Fungal Genet. Newslett.**, Kansas City, v. 34, p. 46-51, 1987.

NI, H. T.; LAPORTE, D. C. Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 1197-1205, June 1995.

NOVENTA-JORDÃO, M. A.; POLIZELI, M. L. T. M.; BONINI, B. M.; JORGE, J. A.; TEREZI, 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.

NUTTAL, F. Q.; GANNON, M. C.; BAI, G.; LEE, E. Y. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. **Arch. Biochem. Bioph.**, New York, v. 311, n. 2, p. 443-449, June 1994.

OHLER, U.; LIAO, G. C.; NIEMANN, H.; RUBIN, G. M. Computational analysis of core promoters in the *Drosophila* genome. **Genome Biol.**, London, v. 3, n. 12, p. 0087.1-0087.12, Dec. 2002.

ORHO, M.; NIKULA-IJÄS, P.; SCHALIN-JÄNTTI, C.; PERMUTT, M. A.; GROOP, L. C. Isolation e characterization of the human muscle glycogen synthase gene. **Diabetes**, New York, v. 44, n. 9, p. 1099-1105, Sept. 1995.

OSIEWACZ, H. D. **Molecular biology of fungal development**. New York: Marcel Decker, 2002.

PALL, M. L. The use of Ignite (Basta;glufosinate; phosphinothricin) to select transformants of bar-containing plasmids in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newslett.**, Kansas City, v. 40, p. 58, 1993.

PAPAMICHOS-CHRONAKIS, M.; KREBS, J. E.; PETERSON, C. L. Interplay between Ino80 and Swr1 chromatin remodeling enzymes regulates cell-cycle checkpoint adaptation in response to DNA damage. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 20, n. 17, p. 2437-2449, Sept. 2006.

PARK, H. O.; CRAIG, E. A. Positive and negative regulation of basal expression of a yeast *HSP70* gene. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 9, n. 5, p. 2025-2033, May 1989.

PARROU, J. L.; ENJALBERT, B.; FRANÇOIS, J. STRE- and cAMP-independent transcriptional induction of *Saccharomyces cerevisiae* *GSY2* encoding glycogen synthase during diauxic growth on glucose. **Yeast**, Chichester, v. 15, n. 14, p. 1471-1484, Oct. 1999.

PARROU, J. L.; ENJALBERT, B.; PLOURDE, L.; BAUCHE, A.; GONZALEZ, B.; FRANÇOIS, J. Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v. 15, n. 3, p. 191-203, Feb. 1999.

PELHAM, H. R. Activation of heat shock genes in eukaryotes. **Trends Genet.**, Cambridge, MA, v. 1, p. 31-35, 1985.

PELHAM, H. R. A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* *hsp70* heat shock gene. **Cell**, Cambrigde, MA, v. 30, n. 2, p. 517-528, Sept. 1982.

PELHAM, H. R.; BIENZ, M. A synthetic heat shock promoter element confers heat inducibility on the herpes simplex virus *tk* gene. **EMBO J.**, Oxford, v. 1, n. 11, p. 1473-1477, 1982.

PENG, Z. Y.; TRUMBLY, R. J.; REIMANN, E. M. Purification and characterization glycogen synthase from a glycogen-deficient strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 265, n. 23, p. 13871-13877, Aug. 1990.

PERKINS, D. D.; TURNER, B. C.; BARRY, E. G. Strains of *Neurospora crassa* collected from nature. **Evolution**, v. 30, n. 2, p. 281-313, June 1976.

PICTON, C.; AITKEN, A.; BILHAM, T.; COHEN, P. Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Organization of the seven sites in the polypeptide chain. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 124, n. 1, p. 37-45, May 1980.

PIRAS, R.; ROTHMAN, L. R.; CABIB, E. Regulation of muscle glycogen synthetase by metabolites. Differential effects on the I and D forms. **Biochemistry**, Washington, v. 7, n. 1, p. 56-66, Jan. 1968.

PIRKKALA, L.; NYKANEN, P.; SISTONEN, L. Roles of the heat shock transcription factors in regulation of the heat shock response and beyond. **FASEB J.**, Bethesda, v. 15, n. 7, p. 1118-1131, May 2001.

PREISS, J.; ROMEO, T. Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, New York, v. 47, p. 299-329, 1994.

PROFT, M.; GIBBONS, F. D.; COPELAND, M.; ROTH, F. P.; STRUHL, K. Genome wide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot. Cell.**, Washington, v. 4, n. 8, p. 1343-1352, Aug. 2005.

QUINN, P. G.; GRANNER, D. K. Cyclic AMP-dependent protein kinase regulates transcription of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene but not binding of nuclear factors to the cyclic AMP regulatory element. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 10, n. 7, p. 3357-3364, July 1990.

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.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; LARNER, J. Ca^{+2} -stimulated phosphorylation of muscle glycogen synthase by phosphorylase b kinase. **J. Cyclic Nucleotide Res.**, New York, v. 4, n. 4, p. 254-257, Aug. 1978.

ROSE, M.; BOTSTEIN, D. Construction and use of gene fusions *laZ* (β -galactosidase) which are expressed in yeast. **Methods Enzymol.**, New York, v. 101, p. 167-180, 1983.

ROTHMAN-DENES, L. B.; CABIB, E. Two forms of yeast glycogen synthetase and their role in glycogen accumulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 66, n. 3, p. 967-974, July 1970.

RUIS, H. Yeast stress responses: achievements, goals and a look beyond yeast. In: HOHMANN, S.; MAGER, W. H. **Yeast Stress Responses**. Austin: R. G. Landes Company, 1997. p. 231-247.

RUIS, H.; SCHÜLLER, C. Stress signaling in yeast. **Bioessays**, Cambridge, UK, v. 17, n. 11, p. 956-966, Nov. 1995.

RUTTER, J.; PROBST, B. L.; MCKNIGHT, S. L. Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. **Cell**, Cambridge, MA, v. 111, n. 1, p. 17-28, Oct. 2002.

RUTTER, J.; MICHNOFF, C. H.; HARPER, S. M.; GARDNER, K. H.; MCKNIGHT, S. L. PAS kinase: an evolutionarily conserved PAS domain-regulated serine/threonine kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 98, n. 16, p. 8991-8996, July 2001.

SAKURAI, H.; FUKASAWA, T. A novel domain of the yeast heat shock factor that regulates its activation function. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 285, n. 3, p. 696-701, July 2001.

SALUJA, D.; VASSALLO, M.; TANESE, N. Distinct subdomains of human TAFII130 are required for interactions with glutamine-rich transcriptional activators. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 18, n. 10, p. 5734-5743, Oct. 1998.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANTORO, N.; JOHANSSON, N.; THIELE, D. J. Heat shock element architecture is an important determinant in the temperature and transactivation domain requirements for heat shock transcription factor. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 18, n. 11, p. 6340-6352, Nov. 1998.

SCHIESTL, R. H.; GIETZ, R. D. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. **Curr. Genet.**, New York, v. 16, n. 5/6, p. 339-346, Dec. 1989.

SCHIMITT, A. P.; McENTEE, K. Msn2p, a zinc finger DNA binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 93, n. 12, p. 5777-5782, June 1996.

SCHNEIDER, K. R.; SMITH, R. L.; O'SHEA, E. K. Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. **Science**, Washington, v. 266, n. 5182, p. 122-126, Oct. 1994.

SCHÜLLER, H. J.; ENTIAN, K. D. Extragenic suppressors of yeast glucose derepression mutants leading to constitutive synthesis of several glucose-repressible enzymes. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 173, n. 6, p. 2045-2052, Mar. 1991.

SCHULTE, U.; BECKER, I.; MEWES, H. W.; MANNHAUPT, G. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 3-13, Mar. 2002.

SCHWARTZ, C. J.; SAMPSON, H. M.; HLOUSEK, D.; PERCIVAL-SMITH, A.; COPERLAND, J. W. R.; KRAUSE, H. M. FTZ-Factor 1 and *Fushi tarazu* interact via conserved nuclear receptor and coactivator interaction motifs. **EMBO J.**, Oxford, v. 20, n. 3, p. 510-519, Feb. 2001.

SHIMANUKI, M.; SAKA, Y.; YANAGIDA, M.; TODA, T. A novel essential fission yeast gene *pad1⁺* positively regulates *pap1⁺*-dependent transcription and is implicated in the maintenance of chromosome structure. **J. Cell. Sci.**, London, v. 108, n. 2, p. 569-579, Feb. 1995.

SHORT, J. M.; WYNshaw-BORIS, A.; SHORT, H. P.; HANSON, R. W. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) promoter-regulatory region. II. Identification of cAMP and glucocorticoid regulatory domains. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, n. 21, p. 9721-9726, July 1986.

SKURAT, A. V.; DIETRICH, A. D. Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 279, n. 4, p. 2490-2498, Jan. 2004.

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, A.; WARD, M. P.; GARRET, S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. **EMBO J.**, Oxford, v. 17, n. 13, p. 3556-3564, July 1998.

SMITH, S.; STILLMAN, B. Stepwise assembly of chromatin during DNA replication *in vitro*. **EMBO J.**, Oxford, v. 10, n. 4, p. 971-980, Apr. 1991.

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, 1995.

SORGER, P. K.; NELSON, H. C. Trimerization of a yeast transcriptional activator via a coiled-coil motif. **Cell**, Cambridge, MA, v. 59, n. 5, p. 807-813, Dec. 1989.

SORGER, P. K.; PELHAM, H. R. Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. **Cell**, Cambridge, MA, v. 54, n. 5, p. 855-864, Sept. 1988.

SORGER, P. K. Yeast heat shock factor contains separable transient and sustained response transcriptional activators. **Cell**, Cambridge, MA, v. 62, n. 4, p. 793-805, Aug. 1990.

SORGER, P. K.; LEWIS, M. J.; PELHAM, H. R. Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. **Nature**, London, v. 329, n. 6134, p. 81-84, Sept. 1987.

SPRINGER, M. L.; YANOFSKY, C. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 3, n. 4, p. 559-571, Apr. 1989.

SUN, P.; ENSLEN, H.; MYUNG, P.; MAURER, R. Differential activation of CREB by Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase type II and type IV involves phosphorylation of a site that negatively regulates activity. **Genes Dev.**, Cold Spring Harbor, v. 8, n. 21, p. 2527-2539, Nov. 1994.

TAGAYA, M.; NAKANO, K.; FUKUI, T. A new affinity labeling reagent for the active site of glycogen synthase. Uridine diphosphopyridoxal. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 260, n. 11, p. 6670-6676, June 1985.

TAMAI, K. T.; LIU, X.; SILAR, P.; SOSINOWSKI, T.; THIELE, D. J. Heat shock transcription factor activates yeast metallothionein gene expression in response to heat and glucose starvation via distinct signaling pathways. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 14, n. 12, p. 8155-8165, Dec. 1994.

TAN, Y.; ROUSE, J.; ZHANG, A.; CARIATI, S.; COHEN, P.; COMB, M. J. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. **EMBO J.**, Oxford, v. 15, n. 17, p. 4629-4642, Sept. 1996.

TCHENIO, T.; CASELLA, J. F.; HEIDMANN, T. A truncated form of the human CAF-1 p150 subunit impairs the maintenance of transcriptional gene silencing in mammalian cells. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 21, n. 6, p. 1953-1961, Mar. 2001.

TERENZI, H. F.; FLAWIA, M. N.; TORRES, H. N. A *Neurospora crassa* morphological mutant showing adenylate cyclase activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 58, n. 4, p. 990-996, June 1974.

THEDEI JUNIOR, G.; DOUBOWETZ, T. H.; ROSSI, A. Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture medium and phosphate excretion in

Neurospora crassa. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v. 27, n. 5, p. 1129-1134, May 1994.

THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Reviews**, Washington, v. 48, n. 1, p. 42-59, Mar. 1984.

THEVELEIN, J. M. Signal transduction in yeast. **Yeast**, Chichester, v. 10, n. 13, p. 1753-1790, Dec. 1994.

THEVELEIN, J. M.; WINDE, J. H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 33, n. 5, p. 904-918, Sept. 1999.

THOMPSON-JAEGER, S.; FRANÇOIS, J.; GAUGHRAN, J. P.; TATCHELL, K. Deletion of *SNF1* affects the nutrient response to yeast and resembles mutations which activate the adenylate cyclase pathway. **Genetics**, Baltimore, v. 129, n. 3, p. 697-706, Nov. 1991.

TIMBLIN, B. K.; BERGMAN, L. W. Elevated expression of stress response genes resulting from deletion of *PHO85* gene. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 25, n. 5, p. 981-990, Dec. 1997.

TODA, T.; UNO, I.; ISHIKAWA, T.; POWERS, S.; KATAOKA, T.; BROEK, D.; CAMERON, S.; BROACH, J.; MATSUMOTO, K.; WIGLER, M. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. **Cell**, Cambridge, MA, v. 40, n. 1, p. 27-36, Jan. 1985.

TRINCI, A. P. J. Regulation of hyphal branching and hyphal orientation. In: JENNINGS, D. H.; RAYNER, A. D. M. **The ecology and physiology of the fungal mycelium**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1984. p. 23-52.

TRINCI, A. P. J.; WIEBE, M. G.; ROBSON, G. D. The mycelium as an integrated entity. In: WESSER, J. G. H.; MEINHARDT, F. **The mycota**. Berlín: Springer-Verlag, 1994. v. 1, p. 175-193.

TRUJILLO, M. A.; SAKAGASHIRA, M.; EBERHARDT, N. L. The human growth hormone contains a silencer embedded within an Alu repeat in the 3' flanking region. **Mol. Endocrinol.**, Baltimore, v. 20, n. 10, p. 2559-2575, Oct. 2006.

TURNER, G.; HARRIS, S. D. Genetic control of polarized growth and branching in filamentous fungi. In: GOW, N. A. R.; ROBSON, G. D.; GADD, G. M. **The fungal colony**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1997. p. 229-260.

UNNIKRISHNAN, I.; MILLER, S. T.; MEINKE, M.; LAPORTE, D. C. Multiple positive and negative elements involved in the regulation of expression of *GSY1* in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 278, n. 29, p. 26450-26457, July 2003.

VARELA, J. C.; PRAEKELT, U. M.; MEACOCK, P. A.; PLANTA, R. J.; MAGER, W. H. The *Saccharomyces cerevisiae* HSP12 gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 15, n. 11, p. 6232-6245, Nov. 1995.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microb. Genet. Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, Y.; BELL, A. W.; HERMODSON, M. A.; ROACH, P. J. Liver isozyme of rabbit glycogen synthase - aminoacid sequences surrounding phosphorylation sites recognized by cyclic AMP-dependent protein kinase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, n. 36, p. 16909-16915, Dec. 1986.

WANG, Z.; WILSON, W. A.; FUJINO, M. A.; ROACH, P. J. Antagonistic controls of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase, and the cyclin-dependent kinase Pho85p. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 21, n. 17, p. 5742-5752, Sept. 2001a.

WANG, Z.; WILSON, W. A.; FUJINO, M. A.; ROACH, P. J. The yeast cyclins Pcl6p e Pcl7p are involved in the control of glycogen storage by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v. 506, n. 3, p. 277-280, Oct. 2001b.

WILLIAMSON, B. D.; FAVIS, R.; BRICKEY, D. A.; RUTHERFORD, C. L. Isolation and characterization of glycogen synthase in *Dictyostelium discoideum*. **Dev. Genet.**, New York, v. 19, n. 4, p. 350-364, 1996.

WILSON, W. A.; MAHRENHOLZ, A. M.; ROACH, P. J. Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 19, n. 10, p. 7020-7030, Oct. 1999.

WILSON, W. A.; SKURAT, A. V.; PROBST, B.; DEPAOLI-ROACH, A.; ROACH, P. J.; RUTTER, J. Control of mammalian glycogen synthase by PAS kinase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 102, n. 46, p. 16596-16601, Nov. 2005.

WILSON, W. A.; WANG, Z.; ROACH, P. J. Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Proteomics**, Bethesda, v. 1, n. 3, p. 232-242, Mar. 2002.

WU, C. Heat shock transcription factors: structure and regulation. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, Palo Alto, v. 11, p. 441-469, 1995.

WU, C. Two protein binding sites in chromatin implicated in the activation of heat shock genes. **Nature**, London, v. 308, n. 5965, p. 229-234, May 1984.

XIA, S. W.; GUO, Y.; VILABOA, N.; ZUO, J.; VOELLMY, R. Transcriptional activation of heat shock factor HSF1 probed by phosphopeptide analysis of factor ³²P-labeled *in vivo*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 273, n. 15, p. 8749-8755, Apr. 1998.

XU, J.; GONG, Z. Z. Intron requirement for AFP gene expression in *Trichoderma viride*. **Microbiology**, Reading, v. 149, n. 11, p. 3093-3097, Nov. 2003.

XUE, Y.; BATLLE, M.; HIRSCH, J. P. GPR1 encodes a putative G protein-coupled receptor that associates with the Gpa2p Gα subunit and functions in a Ras-independent pathway. **EMBO J.**, Oxford, v. 17, n. 7, p. 1996-2007, Apr. 1998.

YAMAMOTO, A.; MIZUKAMI, Y.; SAKURAI, H. Identification of a novel class of target genes and a novel type of binding sequence of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 280, n. 12, p. 11911-11919, Mar. 2005.

YAMAMOTO, K. K.; GONZALEZ, G. A.; BIGGS, W. H. 3RD; MONTMINY, M. R. Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. **Nature**, London, v. 334, n. 6182 p. 494-498, Aug. 1988.

ZAHRINGER, H.; HOLZER, H.; NWAKA, S. Stability of trehalase neutral during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of camp-dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. **Eur. J. Biochem.**, Oxford, v. 255, n. 3, p. 544-551, Aug. 1998.

ZAHRINGER, H.; THEVELEIN, J. M.; NWAKA, S. Induction of neutral trehalase nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 35, n. 2, p. 397-406, Jan. 2000.

ZHANG, S.; HACHAM, M.; PANEPINTO, J.; HU, G.; SHIN, S.; ZHU, X.; WILLIAMSON, P. The Hsp70 member, Ssa1, acts as a DNA-binding transcriptional co-activator of laccase in *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, Boston, v. 62, n. 4, p. 1090-1101, Nov. 2006.

ZHANG, W.; BROWNER, M. F.; FLETTERICK, R. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Primary structure of rabbit skeletal muscle glycogen synthase deduced from cDNA clones. **FASEB J.**, Bethesda, v. 3, n. 13, p. 2532-2536, Nov. 1989.

Anexo I



Original Paper

**Regulation of xylanase in *Aspergillus phoenicis*: a physiological
and molecular approach**

**Ana Carolina Segato Rizzatti^a, Fernanda Zanolli Freitas^b; Maria Célia Bertolini^b; Simone
Carvalho Peixoto-Nogueira^c; Héctor Francisco Terenzi^a; João Atilio Jorge^a; Maria de
Lourdes Teixeira de Moraes Polizeli^{a*}**

*^aDepartamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto –
USP, SP; ^bDepartamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química -
UNESP, Araraquara, SP; ^cDepartamento de Bioquímica e Imunologia, Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto – USP, SP*

(*) Corresponding author: Prof^a Dra Maria de Lourdes T. M. Polizeli, Departamento de
Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São
Paulo, Av. Bandeirantes, 3900, 14040-901 - Ribeirão Preto - SP, Brazil. Phone: +55 16 3602-
4680 – Fax: +55 16 3602-4886. E-mail: polizeli@ffclrp.usp.br.

Abstract

Microbial xylanolytic enzymes have a promissory biotechnological potential and are extensively applied in industries. In this context, xylanase induction studies by *Aspergillus phoenicis* were carried on. Xylanase activity was predominantly extracellular in media supplemented with xylan birchwood (94.7%), xylose (97.1%) or β -methylxyloside (93.4%). Addition of 1% glucose to media supplemented with xylan or xylose resulted in catabolic repression of xylanase synthesis. This phenomenon was reverted when 100 μ M cAMP or dibutyryl-cAMP was added to the medium. These physiological data were corroborated at molecular level. A genomic DNA fragment, which is part of a gene encoding xylanase was used as probe to analyze the gene expression by growing the fungus under inducing or repressing conditions of xylanase activity. The results of gene transcription were similar to the physiological results, that is, transcription was induced when xylan, xylose or β -methylxyloside were added to the medium, and repressed in the presence of glucose. In addition, the gene transcription was reverted by cAMP or dibutyryl-cAMP.

Keywords: fungi, *Aspergillus phoenicis*, xylanase enzyme, cAMP, gene transcription

1. Introduction

Xylans are hemicelluloses present in the cell wall and in the middle lamella of plant cells comprehending the second most abundant natural non-cellulose polysaccharide (Collins et al., 2005). It is composed of different proportions of monosaccharide units, such as D-xylose, D-mannose, D-glucose, L-arabinose, D-galactose and D-glucuronic acid. These polysaccharides can be hydrolyzed by endo-1,4- β -xylanase (EC 3.2.1.8), which cleaves glycosidic bonds in the xylan backbone, thus reducing the degree of polymerization of the substrate. This enzyme can be obtained from bacteria, yeasts and filamentous fungi, but filamentous fungi are more attractive because they secrete higher levels of these enzymes into the medium, in contrast with yeast and bacteria (Polizeli et al., 2005). Xylanases can be used in different industries to manufacture animal food (Twomey et al., 2003), bread (Camacho and Aguilar 2003), textile (Brühlmann et al., 2000; Csiszár et al., 2001), and to clarify juice (Wong et al., 1998) and cellulose pulp in paper industry (Sandrim et al., 2005).

Despite of the biotechnological potential of xylanases, not many studies discuss the biochemical regulation of this enzymatic system. Morosoli et al. (1989) reported that xylanase production by *Cryptococcus albidus* is induced by xylan or β -methylxyloside, a non-metabolizable inducer, and that xylose represses the production of the enzyme. In this microorganism, addition of exogenous cAMP elicits a 1.5 to 2-fold increase in xylanase production in the presence of the inducer, but does not relieve the repression caused by xylose. This cyclic nucleotide also affects the cells growth rate. The authors suggested that a 15-nucleotide sequence located upstream from the xylanase gene could be part of a cAMP regulatory site. Catabolic repression is also described by Ruijter and Visser (1997) in *Aspergillus nidulans* and *A. niger*. The authors suggest that the CREA protein plays a major role in carbon repression; CREA inhibits transcription of many target genes by binding to specific sequences in the promoter of these genes.

Thus, the aim of this work was to analyze the effect of several carbon sources as inducers and repressors of the xylanolytic activity produced by *Aspergillus phoenicis*, and the effect of cyclic AMP on the catabolic regulation of the enzyme, using biochemical and molecular approaches.

2. Materials and methods

2.1. Organism and culture conditions

The fungus *A. phoenicis* RP-02 was isolated from soil samples from Ribeirão Preto (São Paulo State, Brazil) and identified according to Raper and Fennell (1965) and Klich and Pitt (1988). The organism was maintained at 30°C on slants of solid Vogel (1964) medium supplemented with 0.75% yeast extract and 0.75% peptone. Liquid cultures were started with a spore inoculum (10^7 spores.ml⁻¹) in Vogel Minimal Liquid medium (VML medium) (Vogel, 1964) supplemented with different carbon substrates, as indicated for each experiment.

2.2. Extraction of xylanolytic enzymes

Mycelia were harvested by filtration, rinsed with distilled water, blotted on filter paper and stored at -15°C until used. The mycelial mass was disrupted in a mortar with acid-washed sea sand at 4°C. After addition of 10 ml citrate-phosphate buffer (McIlvaine, 1921), pH 4.0, cell disruption was continued for more 15 min. The slurry was then centrifuged (12,100xg, 15 min), and the supernatant was used to determine intracellular activity and protein levels according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin as standard. The culture filtrate was dialysed overnight against the same buffer, and used to determine extracellular activity.

2.3. Determination of xylanase activity

Xylanase was assayed by measuring the reducing groups released from birchwood xylan (Miller, 1959). The reaction mixture consisted of 250 µl of 1% xylan, 150 µl of McIlvaine buffer, pH 4.0 and 100 µl of enzyme extract appropriately diluted. The reaction mixture was incubated at 50°C for 15 min. One enzymatic unit was defined as the amount of enzyme that released 1 µmol xylose per minute under the assay conditions.

2.4. PCR amplification and isolation of a DNA fragment encoding xylanase

Degenerated oligonucleotides were designed based on an amino acid sequence alignment of xylanase proteins from different organisms. The oligonucleotides were used to amplify by PCR a DNA fragment from genomic DNA (Weiland, 1997). The primers 1F (5'-ATYGARTACTACATYGTBGA-3'), 2F (5'-TACTTRGCYGTBTACGGHTGG-3'), 1R (5'-GTRGCVACRATCTGGTAGTT-3') and 2R (5'-GCCCARGCGTTGAARTGGT-3') correspond to oligonucleotide sequences encoding highly conserved amino acid sequences in *Aspergillus*. One fragment of the expected size (approximately 300 bp) was amplified using the primers F2 and R1. The nucleotide sequence was determined in both strands, and is available at GenBank under Accession no. DQ306885. Nucleotide and protein sequences were analyzed at the BCM Sequence Launcher web site. Sequence alignment was performed by using the ClustalW 2.0 program, and the identities and similarities were determined by using the BoxShade 3.21 program.

2.5. Growth conditions for gene expression assay

Gene expression in different growth conditions was analysed by Northern blot. For that, *A. phoenicis* mycelia were pre-cultured in VML medium supplemented with 1% glucose during 72 h at 42°C. One aliquot was withdrawn, filtered, frozen in dry ice, and stored at -80°C for further processing (control, before induction). The remaining culture was filtered, transferred to different induction media, and incubated during 6 h at 42°C. The induction media were VML medium supplemented with: 0.1% xylan; 0.1% xylan + 0.1% glucose; 0.1% xylan + 0.1% glucose + 100 µM cAMP; 0.1% xylan + 100 µM cAMP; 0.1% xylan + 0.1% glucose + 100 µM dibutyryl-cAMP; 0.1% xylan + 100 µM dibutyryl-cAMP; 0.1% xylose; 0.1% xylose + 0.1% glucose; 0.1% xylose + 0.1% glucose + 100 µM cAMP; 0.1% xylose + 100 µM cAMP; 0.1% xylose + 0.1% glucose + 100 µM dibutyryl-cAMP; 0.1% xylose + 100 µM dibutyryl-cAMP. After induction, the mycelia were harvested and the total RNA was prepared (Sokolovsky et al., 1995). RNA (10 µg) was separated by electrophoresis on an 1.2% formaldehyde-agarose gel, and transferred to neutral nylon membranes (Hybond-N, Amersham) in 2 X SSPE (Sambrook and Russell, 2001). The blot was probed with a genomic DNA fragment (approximately 300

bp), radiolabelled by random priming, in 5 ml of Ultrahyb hybridization solution (Ambion) at 42°C. After overnight hybridization the blot was washed twice for 10 min in 2 X SSPE, 0.1% SDS and twice for 15 min in 0.1 X SSPE, 0.1% SDS and exposed to X-ray film.

3. Results

3.1. Carbon regulation and effect of cyclic AMP on xylanase production

For the experiment shown in Table 1, *A. phoenicis* was initially cultivated in VML medium supplemented with 1% glucose during 72 h. After that, the mycelium was rinsed and resuspended in fresh VML medium supplemented with different carbon sources as indicated, and incubated for an additional 48 h period. As compared with the control, there was mycelium growth for all the conditions assayed, except when lactose or β -methylxyloside was used as carbon sources (data not shown). Significant enzymatic levels were detected in the cultures supplemented with xylose, xylan of different origins and β -methylxyloside. For these conditions the endo-1,4- β -xylanase was predominantly extracellular (94.7% in xylan birchwood, 97.1% in xylose and 93.4% in β -methylxyloside). Addition of glucose to media supplemented with these inducers reduced the activity in approximately 68%. Ribose, a pentose sugar, did not induce the xylanase activity, and some induction was observed in the presence of arabinose. In the fungus *A. sydowii* no induction was observed in the presence of ribose, however only a slight induction was described in the presence of arabinose (Ghosh and Nanda, 1994). In an attempt to differentiate induction of xylanase activity from either enzyme stabilisation and/or pro-enzyme activation, cycloheximide was added to the inducer media. A drastic reduction of the enzymatic activity levels was observed, thus confirming “de novo” synthesis (data not shown).

After that, experiments aiming to observe the effect of cyclic AMP were carried on. First, the fungus was cultivated for 6 h in VML supplemented with 1% glucose for 72 h at 42°C, and then transferred to four fresh liquid media: (1) induction medium, 0.1% xylan or xylose; (2) induction medium + 0.1% glucose; (3) induction medium + 0.1% glucose + 100 μ M cAMP or dibutyryl-cAMP; (4) induction medium + 100 μ M cAMP or dibutyryl-cAMP. When glucose was added to the medium supplemented with xylan or xylose a marked reduction on the extracellular enzymatic activity and on total enzymatic synthesis was observed (75% and 66%, respectively), confirming the previous results. The glucose promoted repression was alleviated when cAMP was added (23% on xylan cultures and 32% on xylose cultures) or in

the presence of dibutyryl-cAMP (32% on xylan cultures or 28% on xylose cultures) (Fig. 1). Considering these results, the effect promoted by cyclic AMP could be on gene expression, either at transcription level or involving posttranslational modifications. To address this question the gene transcription was analysed by Northern blot.

3.2. Isolation of a DNA fragment encoding xylanase in *A. phoenicis*

Degenerate oligonucleotides designed from an amino acid sequence alignment among *Aspergillus* xylanases were used as an attempt to amplify a DNA fragment encoding xylanase in *A. phoenicis*. One fragment of 300 bp was amplified and after DNA sequencing showed to encode a polypeptide sequence corresponding to part of a xylanase protein. We propose the name *ApxIn* for the gene and ApXLN for the corresponding protein. Sequence alignment between the amino acid sequence, deduced from the nucleotide sequence, and xylanase proteins from different filamentous fungi showed high identity among the sequences (Fig. 2A). This result suggested that the amplified fragment corresponded to the nucleotide sequence of the gene encoding xylanase-like protein in *A. phoenicis*. The amino acid sequence of the fragment was used to analyze the phylogeny among xylanase proteins (Fig. 2B). The phylogenetic tree showed close proximity of the polypeptide from *A. phoenicis* to the protein from *A. oryzae*.

3.3. Expression of the *ApxIn* gene

Gene expression in *A. phoenicis* mycelium was analysed in cultures submitted to experimental conditions known to promote induction or repression of xylanase activity. Total RNA extracted from mycelium submitted to the different culture conditions was analyzed by Northern blot using the 300 bp fragment as probe. RNA analysis showed that the gene was expressed as a full-length RNA transcript of approximately 1.2 kb, which corresponds to the transcript size of xylanase genes from different fungi.

Induction of transcription was observed when cells were exposed to the medium containing xylan or xylose as unique carbon sources (Fig. 3, lanes 2 and 8). There was no gene transcription in the absence of the inducers (Fig. 3, lane 1). Glucose strongly represses

the induction of xylan and xylose (Fig 3, lanes 3 and 9). However, the glucose repression was completely abolished by the addition of cAMP (Fig. 3, lanes 4 and 10) or its analogue dibutyryl-cAMP (Fig. 3, lanes 6 and 12). Addition of these cyclic nucleotides does not interfere in the gene transcription induced by xylan or xylose (Fig. 3, compare lanes 5 and 7 to lane 3 for induction by xylan, and lanes 11 and 13 to 8 for induction by xylose).

4. Discussion

The xylanase produced by *A. phoenicis* was induced by xylan, xylose and β -methylxyloside. Xylanolytic enzymes induced by xylan or xylose have been reported in other microorganisms such as *Aspergillus sydowii* (Ghosh and Nanda, 1994), *A. terreus* (Hrmová et al., 1991) and *A. tubigiensis* (de Graaff et al., 1994). In *A. nidulans* xylose does not induce xylanolytic activity (Piñaga et al., 1994), suggesting the existence of different mechanisms of enzymatic induction in the *Aspergillus* genus. Others organisms, such as, *Streptomyces* sp (Flores et al., 1996), *Trichosporon cutaneum* SL409 (Liu et al., 1999) and *Clostridium absonum* (Rani and Nand, 2000) produce xylanase in the presence of either xylan or xylose. However, *Prevotella bryantii* (Miyazaki et al., 2005) and *Cellulomonas flavigena* (Hidalgo-Lara et al., 2005) do not produce xylanase in the presence of xylose. β -methylxyloside, has been shown as a good xylanolytic inducer for *Cryptococcus albidus* (Morosoli et al., 1989), *Thermoascus auratiacus* (Gomes et al., 1994) and *Aspergillus awamorii* (Simão et al., 1997 a, b). In *Cellulomonas flavigena* this compound was not able to induce xylanase, however when this organism was cultivated in medium with xylan or sugar cane bagasse plus β -methylxyloside, the extracellular xylanase production increased 25 or 46%, respectively (Hidalgo-Lara et al., 2005). Carbon sources such as sophorose or sorbitol were also assayed as xylanase inducers in *Trichoderma reesei* (Aro et al., 2003). It was detected induction of two different xylanases in cultures supplemented with sophorose in a strain deleted in the gene *ace1*. In the same strain, growth in sorbitol, as the sole carbon source was severely impaired, suggesting that the product of the gene *ace1* may regulate expression of important genes.

The regulation studies carried out with *Aspergillus phoenicis* showed reduction in the enzymatic levels when xylan or xylose was added of glucose, which was reverted by addition of cAMP or dibutyryl-cAMP. Similar results were described by Ghosh and Nanda (1994) for *A. sydowi*, that is, glucose inhibited xylanase production, and the inhibition was reverted by addition of exogenous cAMP. In *Streptomyces* sp. cAMP causes a repression in xylanase synthesis (Nakanishi and Yasui, 1980). Repression by glucose seems to be a common phenomenon observed on xylanases biosynthesis (Miyazaki et al., 2005), but a few studies reported the influence of cAMP in this process (Kulkarni et al., 1999).

As cited by Orejas et al. (2001) and Ruijter and Visser (1997) in *A. nidulans* and *A. niger*, in the presence of glucose, the CREA protein inhibits gene transcription probably due its joining to the promoter region from xylanolytic genes. The CREA protein from *A. nidulans* presents specific regions (as zinc fingers) that probably allow its binding to gene promoter sequences inhibiting this gene expression. Probably, when glucose is present occurs an increasing of CREA affinity by DNA and when the glucose levels decrease, also decreases the CREA affinity for its binding sites and the carbon repression reverts (Ruijter and Visser, 1997).

Not only CREA protein participates in the carbon repression mechanisms, cyclic AMP (cAMP) also seems to be involved. In *S. cerevisiae* the addition of glucose to cells resulted in a transient level of cAMP and, this transient increase seems to be a signal of the presence of easily fermentable carbon sources in order to change the metabolism accordingly (Thevelein, 1994). In *A. nidulans* the level of cAMP either increases when glucose is present and decreases after glucose depletion (Zonneveld, 1976). The addition of cAMP also resulted in a two-fold decreased of glucoamylase mRNA level produced by *A. awamori* (Bhella and Altosaar, 1988).

The physiological results observed in this work for *A. phoenicis* were confirmed at molecular level by analyzing the presence of the xylanase gene transcript under conditions known to induce or repress xylanase activity. It was observed that glucose decreased the mRNA levels, and that the effect was abolished in the presence of cyclic nucleotides. This is an important result, since few studies have carefully shown the transcription regulation of xylanase, and indicates that, in *A. phoenicis*, cyclic nucleotide regulates xylanase gene expression at transcription level.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). M.C.B.; H.F.T.; J.A.J.; M.L.T.M.P. are Research Fellows of CNPq. A.C.S.R., F.Z.F. and S.C.P.N are Doctors recipient from CNPq. This work is part of A.C.S.R. thesis. We thank Ricardo Fernandes Alarcon, and Mauricio de Oliveira for technical assistance.

References

- Aro, N., Ilmén, M., Saloheimo, A., Penttilä, M., 2003. ACEI of *Trichoderma reesei* is a repressor of cellulase and xylanase expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1), 56-65.
- Bhella, R.S., Altosaar, I., 1988. Role of cAMP in the mediation of glucose catabolite repression of glucoamylase synthesis in *Aspergillus awamori*. *Curr. Genet.* 14, 247-252.
- Brühlmann, F., Leupin, M., Erismann, K.H., Fiechter, A., 2000. Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *J. Biotechnol.* 76, 43-50.
- Camacho, N.A., Aguilar, O.G., 2003. Production, purification and characterization of a low molecular mass xylanases from *Aspergillus* sp. and its application in bakery. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 104, 159-172.
- Collins, T., Gerday, C., Feller, G., 2005. Xylanases, xylanases families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 3-23.
- Csiszár, E., Urbánszki, K., Szakás, G., 2001. Biotreatment of deized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *J. Mol. Catal. B. Enzym.* 11, 1065-1072.
- de Graaff, L.H., van den Broeck, H.C., Ooijen, A.J.J., 1994. Regulation of the xylanase-encoding *xlnA* gene of *Aspergillus tubigensis*. *Mol. Microbiol.* 12, 479-490.
- Flores, M.E., Perea, M., Rodríguez, O., Malváez, A., Huitron, C., 1996. Physiological studies on induction and catabolic repression of β -xylosidase and endoxylanase in *Streptomyces* sp. CH-M-1035. *J. Biotechnol.* 49, 179-187.
- Ghosh, M., Nanda, G., 1994. Physiological studies on xylose induction and glucose repression of xylanolytic enzymes in *Aspergillus sydowii* MG49. *FEBS Microbiol. Lett.*, 117, 151-156.
- Gomes, D.J., Gomes, J., Steiner, W., 1994. Factors influencing the induction of endo-xylanase by *Thermoascus aurantiacus*. *J. Biotechnol.* 33, 87-94.
- Hidalgo-Lara, M.E., Farrés, G.S.A., Montes-Horcasitas, M.C., 2005. β -methyl-xyloside: positive effect on xylanase induction in *Cellulomonas flavigera*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32(8), 345-348.

- Hrmová, M., Petraková, E., Biely, P., 1991. Induction of cellulose and xylan-degrading enzyme system in *Aspergillus terreus* by homo and heterodisaccharides composed of glucose and xylose. J. Gen. Microbiol. 137, 541-547.
- Klich, M.A., Pitt, J.L., 1998. A laboratory guide to common *Aspergillus* species and their Telomorphs. Published by Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. FEMS Microbiol. Rev. 23, 411-456.
- Liu, W., Lu, Y., Ma, G., 1999. Induction and glucose repression of endo- β -xylanase in the yeast *Tricosporon cutaneum* SL409. Process Biochem. 34, 67-72.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 267-275.
- McIlvine, T.C. 1921. A buffer solution for colorimetric comparison. J. Biol. Chem. 49, 183-186.
- Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, 426-429.
- Miyazaki, K., Hirase, T., Kojima, Y., Flint, H.J., 2005. Medium- to large-sized xylo-oligosaccharides are responsible for xylanase induction in *Prevotella bryantii* B14. Microbiology 15, 4121-4125.
- Morosoli, R., Durand, S., Boucher, F., 1989. Stimulation of xylanases synthesis in *Cryptococcus albidus* by cAMP. FEMS Microbiol. Lett. 57, 57-60.
- Nakanishi, K., Yasui, T., 1980. Kinetic studies on xylanase induction by β -xylosidase in *Streptomyces* sp. Agric. Biol. Chem. 44, 1885-1889.
- Orejas, M., MacCabe, A.P., Pérez-Gonzales, J.A., Kumar, S., Ramón, D., 2001. The wide-domain carbon catabolite repressor CreA indirectly controls expression of the *Aspergillus nidulans* xlnB gene, encoding the acidic endo- β -(1,4)-xylanase X₂₄. J. Bacteriol. 183(5), 1517-1523.
- Piñaga, F., Fernández-Espinar, M.T., Vallés, S., Ramón, D., 1994. Xylanase production in *Aspergillus nidulans*, induction and carbon catabolite repression. FEMS Microbiol. Lett. 115, 319-324.

- Polizeli, M.L.T.M., Rizzatti, A.C.S., Monti, R., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Amorim, D.S., 2005. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67, 577-591.
- Rani, D.S., Nand, K., 2000. Production and thermostable cellulase-free xylanase by *Clostridium absonum* CFR-720. *Process Biochem.* 36, 355-362.
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Ruijter, G.J.G., Veisser, J., 1997. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 103-114.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Sandrim, V.C., Rizzatti, A.C.S., Terenzi, H.F., Jorge, J.A., Milagres, A.M.F., Polizeli, M.L.T.M., 2005. Purification and biochemical characterization of two xylanases produced by *Aspergillus caespitosus* and their potential of kraft pulp bleaching. *Process Biochem.* 40(5), 1823-1828.
- Simão, R.C.G., Souza, C.G.M., Peralta, R.M. 1997a. The use of methyl- β -D-xyloside as a substrate for xylanase production by *Aspergillus tamarii*. *Can. J. Microbiol.* 43, 56-60.
- Simão, R.C.G., Souza, C.G.M., Peralta, R.M., 1997b. Induction of xylanase in *Aspergillus tamarii* by methyl- β -D-xyloside. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 267-271.
- Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., Russo, V.E.A., 1995. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 37, 41-43.
- Thevelein, J.M., 1994. Signal transduction in yeast. *Yeast* 10, 1753-1790.
- Twomey, L.N., Pluske, J.R., Rowe, J.B., Choct, M., Brown, W., McConnell, M.F., Pethick, D.W., 2003. The effects of increasing levels of soluble non-starch polysaccharides and inclusion of feeds enzymes in dog diets on faecal quality and digestibility. *Anim. Feed Sci. Technol.* 108(1-4), 71-82.
- Vogel, H.F., 1964. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. *Am. Nat.* 98, 435-446.
- Weiland, J.J. 1997. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genet. Newsl.* 44, 60-63.
- Wong, K.K.Y., Tan, L.U.L., Saddler, J.N., 1998. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52(3), 305-317.

Zonneveld, B.J.M., 1976. The effect of glucose and manganese on adenosine-3',5'-monophosphate levels during growth and differentiation of *Aspergillus nidulans*. Arch. Microbiol. 108, 41-44.

Legends

Fig. 1 Effect of glucose, dibutyryl-cAMP or cAMP on xylanase production. The culture media were supplemented with xylan or xylose (CS= carbon source). Extracellular specific activity (**A and C**); intracellular specific activity (**B and D**). Cultures **A** and **B** were added by 0.1% CS; 0.1% CS + 0.1% glucose; 0.1% CS + 0.1% glucose + 100µM dibutyryl-cAMP or 0.1% CS + 100µM dibutyryl-cAMP. Cultures **C** and **D** were added by 0.1% CS; 0.1% CS + 0.1% glucose; 0.1% CS + 0.1% glucose + 100µM cAMP or 0.1% CS + 100µM cAMP. The fungus was previously grown on Vogel medium supplemented with 1% glucose, during 72h, at 42°C and transferred to the different media during 6 h. N = 4.

Fig. 2 (a) Amino acid sequences alignment of xylanases from different filamentous fungi. Identical amino acids are represented in black and conservative changes in gray background. Sequences were aligned using the ClustalW 1.8 program at the *BCM Search Launcher* and similarities were determined by using the BoxShade 3.21 program (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). The accession numbers at the NCBI website are: *A. oryzae* XynG1 (BAA19744), *A. phoenicis* (DQ306885), *A. fumigatus* XynG1 (EAL89062), *A. niger* XlnB (AAS46914), *A. sulphureus* XlnB (AAZ95432), *A. kawachii* XlnB (AAS46914), and *E. nidulans* XlnB (CAA90074). **(b)** Phylogenetic analysis based on polypeptide sequences of xylanase proteins from filamentous fungi (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

Fig. 3 Northern blot hybridization of the *A. phoenicis* gene *Apxln*. Analysis was performed by using 10 µg of total RNA extracted from cells exposed to different growth conditions. **(A)** Upper panel shows the autoradiography using the genomic DNA fragment of 300 bp. Lower panel shows the 18S rRNA used as quantitative loading control. **(B)** Densitometry analysis of the relative induction. Lane 1, total RNA extracted before treatment. Lanes 2 to 13 correspond to total RNA extracted after growth in different culture conditions; lane 2, 0.1% xylan; lane 3, 0.1% xylan + 0.1% glucose; lane 4, 0.1% xylan + 0.1% glucose + 100 µM cAMP; lane 5, 0.1% xylan + 100 µM cAMP; lane 6, 0.1% xylan + 0.1% glucose + 100 µM dibutyryl-cAMP; lane 7, 0.1% xylan + 100 µM dibutyryl-cAMP; lane 8, 0.1% xylose; lane 9, 0.1% xylose + 0.1% glucose; lane 10, 0.1% xylose + 0.1% glucose + 100 µM cAMP; lane 11, 0.1% xylose + 100

μM cAMP; lane 12, 0.1% xylose + 0.1% glucose + 100 μM dibutyryl-cAMP; lane 13, 0.1% xylose + 100 μM dibutyryl-cAMP.

Table 1

Xylanase production by *Aspergillus phoenicis* on different carbon source*

Carbon source (1%)	Xylanase (U.mg protein ⁻¹)	
	Extracellular	Intracellular
Control**	1.15	0.11
Arabinose	8.90	1.13
Fructose	3.31	0.01
Galactose	1.70	0.40
Glucose	2.37	0.01
Mannose	2.50	0.72
Ribose	2.22	0.13
Xylose	152.00	4.50
Xylose + glucose	40.00	1.20
Celobiose	1.52	0.05
Raffinose	1.42	0.20
Lactose	0	0.13
Maltose	5.90	0.65
Sucrose	4.14	0.34
Starch	13.10	1.11
Xylan (birchwood)	172.40	9.60
Xylan (oat spelt)	171.40	15.70
Xylan (beechwood)	173.00	15.80
Xylan + glucose	90.00	4.50
Xylitol	3.14	0.53
β-methylxyloside	152.30	10.80
β-methylxyloside + glucose	25.00	6.00

(*) The fungus was previously grown on VLM medium supplemented with 1% glucose, during 72 h, at 42°C. After this period the mycelium was washed with distilled sterile water and re-incubated in media supplemented with 1% different carbon sources, during 48 h at 42°C. (**) No carbon source.

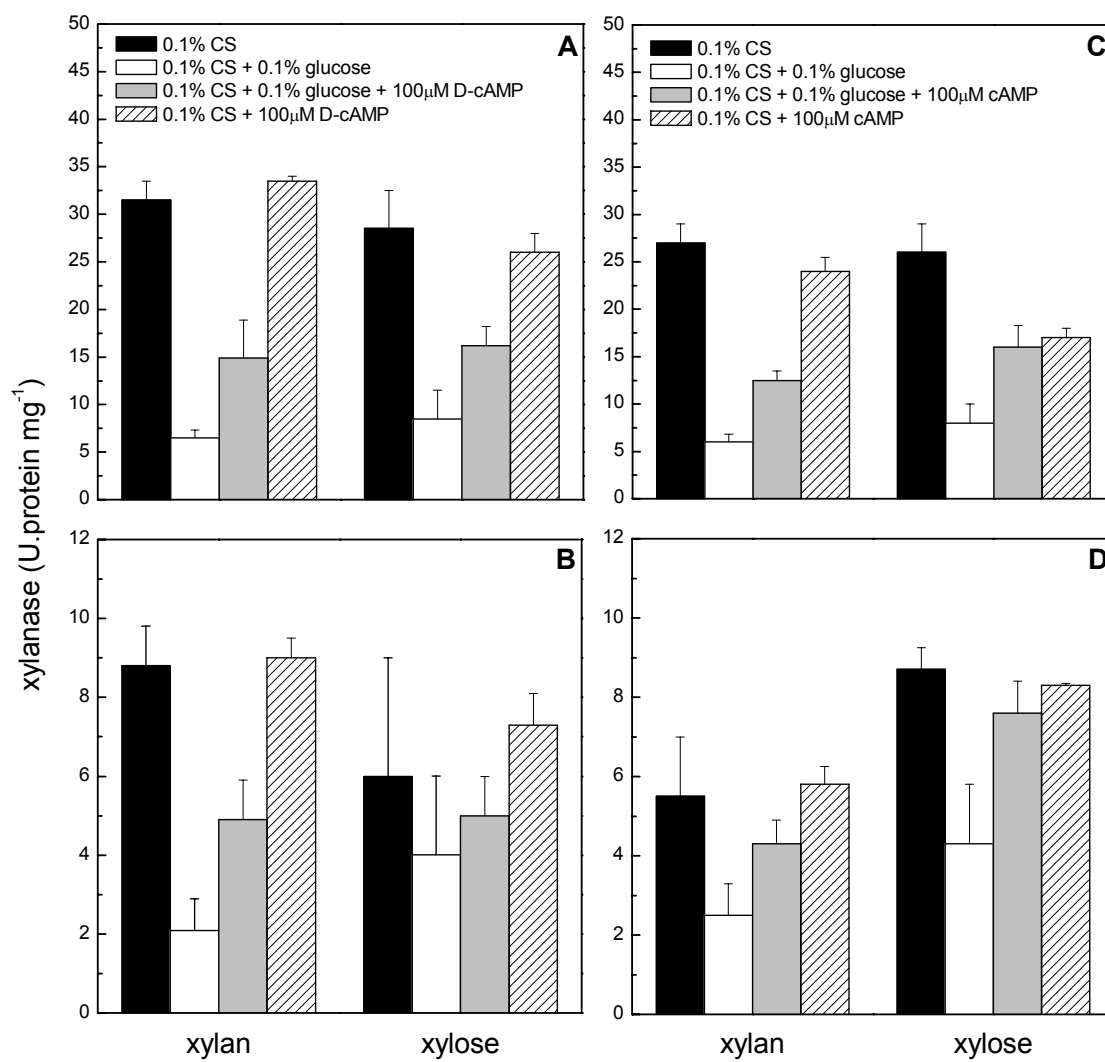


Fig. 1

A

```

A.phoenApXln 1 -----
A.oryzXynG1 1 -MVSFSSLLLA VSAVSCALAAPGDSTLVELAKRAITTSSET-----GTNNGYYSFWT
A.fumigXynG1 1 -MVSFSSLLLA AASTVAGVLATPGSEQYVELAKROLTSSQT-----GTNNGYYSFWT
A.nidulXyn1 1 MVSFKSLLVLCCAALGAFATPVG-SEDLAAREASLLERST---PSSTGWSNGYYSFWT
A.fumigXynB 1 -MVSFSYLLLA CSAATGALAAPVE-PETTSFNETALHEFAERAGTPSSTGWNNGYYSFWT
E.nidulXlnB 1 -MVSFSSLLLA CSAVTAFAPPS---DQSIAERSLSERST---PSSTGTSGGYYSFWT
A.nigerXlnB 1 -MLTKNLLLCFAAAKAVLAVPHDSVVERS DALHKL SERST---PSSTGENNGFYYSFWT
A.sulphXlnB 1 -MLTKNLLLCFAAAKAVLAVPHDSVVERS DALHKL SERST---PSSTGENNGFYYSFWT
A.kawachXlnB 1 -MLTKNLLLCFAAAKAVLAVPHDSVVERS DALHKL SERST---PSSTGENNGYYSFWT
A.kawachXylC 1 ---MKVTAASAGLLGHAFAPVP-----QPVLVRSAGINVVQNY
A.awamoXyn1 1 ---MKVTAAFAGLLVTAFAPVP-----EPVLVRSAGINVVQNY
A.sulphXylA 1 ---MKVTAAFAGLLVTALAAPAP-----GPVLVRSAGINVVQNY
A.usamiXln 1 ---MKVTAAFASLLVTAFAPAP-----EPVLVRSAGINVVQNY

```

```

A.phoenApXln 1 -----
A.oryzXynG1 52 NGGGDV EYTNNGNGGQYSVKNTN--CDNFVAGKGWNP GS AKT VTYSGE MESNSNS-VYSLY
A.fumigXynG1 52 DGGGDV TYTNNGNGGQYQVDWNN--CGNFVAGKGWNP ASEKAVTYSGSWQTSGNG-YLSVY
A.nidulXyn1 56 DGGGDV TYTNAGAGGSYTVQNSN--VGNFVGGKGWNP GS TRTINYGGSFNPSGNG-YLAVY
A.fumigXynB 59 DGGGDV TYTNAGAGGSYSVNWNRN--VGNFVGGKGWNP GS ARTINYGGSFNPSGNG-YLAVY
E.nidulXlnB 52 DGGGDV TYTNAGAGGSYTVWTK--VGNFVGGKGWNP GS SQTISYSGSFIPSGNG-YLSVY
A.nigerXlnB 56 DGGGDV TYTNAGAGSYTVWNSN--VGNFVGGKGWNP GS AQDITYSGTFTPSGNG-YLSVY
A.sulphXlnB 56 DGGGDV TYTNAGAGSYTVWNSN--VGNFVGGKGWNP GS AQDITYSGTFTPSGNG-YLSVY
A.kawachXlnB 56 DGGGDV TYTNAGAGSYTVWNSN--VGNFVGGKGWNP GS AKDITYSGNFTPSGNG-YLSVY
A.kawachXylC 38 NGNLADFTYDESAGTFSMYMEDGVSSDFVVG LGWTTGSSNAITSYSAEYSAGSSSYLAVY
A.awamoXyn1 38 NGNLGDFTYDESAGTFSMYMEDGVSSDFVVG LGWTTGSSNAITYSAEYSAGSSSYLAVY
A.sulphXylA 38 NGNLGDFTYDESAGTFSMYMEDGVSSDFVVG LGWTTGSSNPTISYADTFTPSGSSSYLAVY
A.usamiXln 38 NGNLGDFTYDESTGTFSMYMEDGVSSDFVVG LGWTTGSSKSITYSAQYSAGSSSYLAVY

```

```

A.phoenApXln 1 -WTTSP LVELYIVDKYGDYDPSSGLTELGTVDSDGTYKIYQTTREDADSTEGTATFKQY
A.oryzXynG1 109 GWTQNPLVEYIYVDKYGDYDPSTGATELGTVESDGGTYKIYKTTRENAPSTEGTSTFNQY
A.fumigXynG1 109 GWTTSP LVEYIYVESYGSYDPSTGATHLGTVESDGATYNLYKTTTRNAPSTOGTATFDQY
A.nidulXyn1 113 GWTQNPLIEYIYVESYGTYNPGSGGQHRGTVYSDGATYDIYTATRYNAPSTEGTATFEQF
A.fumigXynB 116 GWTTNPLIEYIYVESYGTYNPGSGGTFRGTVNTDGGTYNIYTAVRYNAPSTEGTKTFTQY
E.nidulXlnB 109 GWTQNPLIEYIYVESYGDYNPGTAGTHQGTLES DGSTYDIYTATRENAPSTEGTATFTQF
A.nigerXlnB 113 GWTTDPLIEYIYVESYGDYNPGSGGTYKGTVTS DGSVYDIYTATRTNAASTOGTATFTQY
A.sulphXlnB 113 GWTTDPLIEYIYVESYGDYNPGSGGTYKGTVTS DGSVYDIYTATRTNAASTOGTATFTQY
A.kawachXlnB 113 GWTTDPLIEYIYVESYGDYNPGSGGTRGNYSSDGSVYDIYTATRTNAPSTOGTATFSQY
A.kawachXylC 98 GWVNYPQAEYIYVEDYGDYNPCSSATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQY
A.awamoXyn1 98 GWVNYPQAEYIYVEDYGDYNPCSSATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQY
A.sulphXylA 98 GWVNYPQAEYIYVEDYGDYNPCSSATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNEPSITGTSTFTQY
A.usamiXln 98 GWVNYPQAEYIYVEDYGDYNPCSSATSLGTVYSDGSTYQVCTDTRTNAPSTITGTSTFTQY

```

```

A.phoenApXln 60 WSVRTEGRIGGTVTTQNHFD A WENLGL ELGT FN YQIVH-----
A.oryzXynG1 169 WSVRQSGRVGGTITTAQNHFD A WANGVLQLGTHNYMILATEGYKSSGSATITVE-
A.fumigXynG1 169 WSVRTSHRQSGTVTTKNHFD A WRNAGLQLGNFDYMI VATEGYQSSGSATITVS-
A.nidulXyn1 173 WSVRQSKRTGGTVTTANHFNAWAALGMRLGTHNYQIVATEGYQSSGSASITVY-
A.fumigXynB 176 WSVRTSKRTGGTVTMANHFNAWSRLGMNLGTHNYQIVATEGYQSSGSASITVY-
E.nidulXlnB 169 WSVRQSKRTSGSVTTQNHFD A WSQLGMTLGTHNYQIVAVEGYQSSGSATITVS-
A.nigerXlnB 173 WSVRQNKRVGGTVTTSNHFNAAWAKLGMNLGTHNYQIVATEGYQSSGSSSITVQ-
A.sulphXlnB 173 WSVRQNKRVGGTVTTSNHFNAAWAKLGMNLGTHNYQIVATEGYQSSGSSSITVQ-
A.kawachXlnB 173 WSVRQNKRVGGTVTTSNHFNAAWAKLGMNLGTHNYQIVATEGYQSSGSSSITVQ-
A.kawachXylC 158 FSVRESTRTSGTVTVANHFNFWAQHCFGN SDFNYQVMAVEAWSGAGSASVTISS
A.awamoXyn1 158 FSVRESTRTSGTVTVANHFNFWAQHCFGN SDFNYQVMAVEAWSGAGSASVTISS
A.sulphXylA 158 FSVRESTRTSGTVTVANHFNFWAQHCFGN SDFNYQVMAVEAWSGAGSASVTISS
A.usamiXln 158 FSVRESTRTSGTVTIANHFNFWAQHCFGN SDFNYQVMAVEAWNAGSASVTISS

```

B

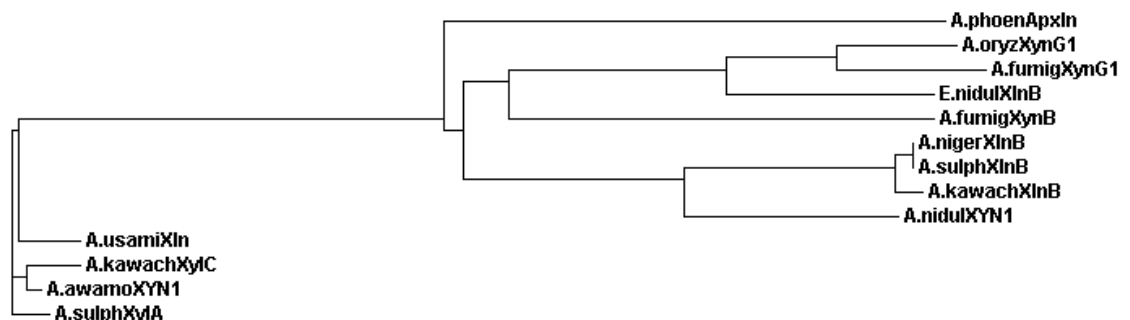
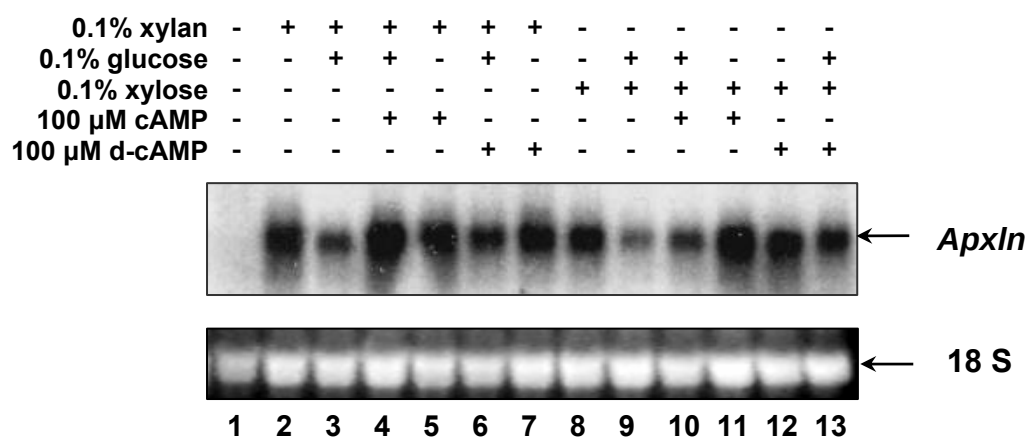


Fig. 2

A



B

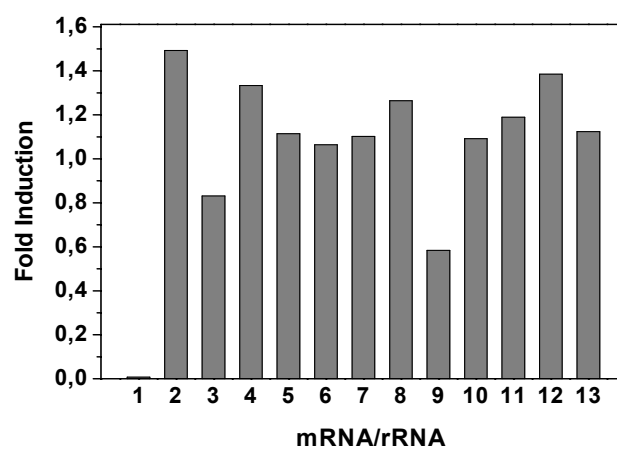


Fig. 3

Anexo II



F. Zanolli Freitas · M. C. Bertolini

Genomic organization of the *Neurospora crassa* *gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock

Received: 24 June 2004 / Accepted: 26 October 2004 / Published online: 19 November 2004
© Springer-Verlag 2004

Abstract Glycogen synthase, an enzyme involved in glycogen biosynthesis, is regulated by phosphorylation and by the allosteric ligand glucose-6-phosphate (G6P). In addition, enzyme levels can be regulated by changes in gene expression. We recently cloned a cDNA for glycogen synthase (*gsn*) from *Neurospora crassa*, and showed that *gsn* transcription decreased when cells were exposed to heat shock (shifted from 30°C to 45°C). In order to understand the mechanisms that control *gsn* expression, we isolated the gene, including its 5' and 3' flanking regions, from the genome of *N. crassa*. An ORF of approximately 2.4 kb was identified, which is interrupted by four small introns (II–V). Intron I (482 bp) is located in the 5'UTR region. Three putative Transcription Initiation Sites (TISs) were mapped, one of which lies downstream of a canonical TATA-box sequence (5'-TGTATAAA-3'). Analysis of the 5'-flanking region revealed the presence of putative transcription factor-binding sites, including Heat Shock Elements (HSEs) and STress Responsive Elements (STREs). The possible involvement of these motifs in the negative regulation of *gsn* transcription was investigated using Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) with nuclear extracts of *N. crassa* mycelium obtained before and after heat shock, and DNA fragments encompassing HSE and STRE elements from the 5'-flanking region. While elements within the promoter region are involved in transcription under heat shock, elements in the 5'UTR intron may participate in transcription during vegetative growth. The results thus suggest that *N. crassa* possesses *trans*-acting elements that interact with the 5'-flanking region to regulate *gsn* transcription during heat shock and vegetative growth.

Keywords HSE and STRE elements · Promoter region · *Neurospora crassa* · Heat shock · *gsn* gene

Introduction

Glycogen is a storage carbohydrate that functions as a carbon and energy reserve and, when necessary, it is degraded to produce glucose. The biosynthesis of glycogen in eukaryotic organisms is a highly conserved process and involves the same set of enzymes. Biosynthesis begins with glycogenin (Viskupic et al. 1992), which by self-glucosylation forms an oligosaccharide primer that is further elongated by the enzyme glycogen synthase (Leloir 1971). This reaction involves the formation of α -1,4 glycosidic bonds. Another enzyme, the branching enzyme, catalyzes the addition of glucose units via α -1,6 glycosidic bonds.

Glycogen synthase (EC 2.4.1.11) is the rate-limiting enzyme for glycogen biosynthesis. This enzyme can be down-regulated by multiple phosphorylation mechanisms in which the phosphorylated enzyme is activated by the allosteric effector glucose-6-phosphate (Rothman-Denes and Cabib 1971). Nucleotide sequences encoding glycogen synthases have been isolated from many organisms; however, the phosphorylation sites have been well characterized only in enzymes from rabbit and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Gsy2p). In the enzyme from rabbit muscle, nine phosphorylation sites are present, which are located in both the N- and C-terminal regions (Roach et al. 2001), while the yeast enzyme has only three C-terminal phosphorylation sites (Hardy and Roach 1993). In the yeast, two genes, *GSY1* and *GSY2* (Farkas et al. 1990, 1991), code for glycogen synthases, of which Gsy2p is the predominant form, accounting for 80% of the total activity (Farkas et al. 1991). Recently, a cDNA encoding glycogen synthase (*gsn*) has been isolated from *Neurospora crassa*. Its protein product shows 57% and 67% identity to the rabbit and Gsy2 proteins, respectively (de Paula et al. 2002).

Communicated by M. Collart

F. Zanolli Freitas · M. C. Bertolini (✉)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química,
Instituto de Química, UNESP, 14800-900 Araraquara, SP, Brazil
E-mail: mcbertol@iq.unesp.br
Tel.: +55-16-33016675
Fax: +55-16-33227932

In *S. cerevisiae*, synthesis and degradation of glycogen vary with environmental conditions and stages of the life cycle (Johnston and Carlson 1992). Thus, cells growing in the presence of glucose accumulate glycogen, both during diauxic growth in a relatively nutrient-poor medium and during the approach to stationary phase in a rich medium (Lillie and Pringle 1980). Glycogen accumulation is also induced by conditions that stress the cells, such as nutrient limitation (Lillie and Pringle 1980) and heat shock (Parrou et al. 1997). Such conditions induce the transcription of the *GSY2* gene (Ni and LaPorte 1995), which accounts for the accumulation of glycogen in these situations.

The STRESS RESPONSIVE ELEMENT (STRE) motif, which is found in the promoter regions of stress-responsive genes in *S. cerevisiae*, was previously demonstrated to participate in the induction of the *GSY2* transcription under conditions of stress (Ni and LaPorte 1995; Parrou et al. 1999a; 1999b; Enjalbert et al. 2004). However, this *cis*-regulatory element is not essential for the induction of the *GSY2* transcription in all stress conditions. Recently, Enjalbert et al. (2004) demonstrated that the activation of *GSY2* at the diauxic shift on glucose was independent of the STRE element. Two yeast transcription factors, the zinc-finger proteins Msn2p and Msn4p, bind to STRE in response to different forms of stress (Martinez-Pastor et al. 1996; Schmitt and McEntee 1996). In *S. cerevisiae*, most of the enzymes involved in the metabolism of the reserve carbohydrates glycogen and trehalose have one or several STRE elements (Varela et al. 1995).

The HEAT SHOCK ELEMENT (HSE) is found in multiple copies in the promoter regions of genes that are responsive to heat stress (Bienz and Pelham 1987). These elements may act as enhancers and are recognized by homotrimeric proteins called HEAT SHOCK FACTORS (HSFs) (Bienz and Pelham 1986). In higher organisms, HSF normally exists as a monomer in an inactive state, but forms trimers upon exposure to heat stress; the inactive form is located in the nucleus and/or cytoplasm depending on the organism (Sarge et al. 1993). In *S. cerevisiae*, HSF is constitutively trimerized, and must be phosphorylated in order to activate transcription (Sorger et al. 1987). This phosphorylation is temperature dependent (Sorger and Pelham 1988). Whereas a single, essential gene encodes HSF in *S. cerevisiae* (Sorger and Pelham 1988), a family of functional differentiated HSFs (HSF1–HSF4) has been identified in higher eukaryotes (Morimoto 1993).

N. crassa accumulates glycogen late in the exponential phase and degrades it when cells reach the stationary phase (de Paula et al. 2002). In addition, glycogen synthase mRNA and glycogen levels decrease when *N. crassa* mycelium is exposed to stress conditions such as carbon source deprivation, induction of conidiation, and heat shock (Noventa-Jordão et al. 1996; de Paula et al. 2002). In order to investigate the elements involved in the transcriptional regulation of the *N. crassa gsn* gene under heat shock, we have isolated

the *gsn* gene including its 5' and 3' flanking regions. STRE and HSE elements were identified in the 5' flanking region and their involvement in the regulation of *gsn* transcription under heat shock was investigated.

Materials and methods

E. coli and *N. crassa* strains and growth conditions

The *Escherichia coli* strain BNN132 was used for plasmid excision from the *N. crassa* genomic DNA library. The *E. coli* strains XL-1 Blue and MC1061 were used for screening and plasmid manipulation, respectively. Bacterial strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium containing ampicillin or tetracycline at final concentrations of 100 µg/ml and 15 µg/ml, respectively. The *N. crassa* strain FGSC424 (wild type) was purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC, Department of Microbiology, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kan.) and cultivated on Vogel's minimal medium (Vogel 1956) supplemented with 2% sucrose.

For heat shock experiments, conidia (2×10^7 /ml) were germinated in Vogel's minimal medium supplemented with 2% sucrose for 24 h at 30°C and 250 rpm. A 250-ml sample was then removed, filtered and frozen in liquid nitrogen. The remaining mycelium was recovered by filtration, and transferred to 1 l of fresh Vogel's liquid medium preheated at temperatures varying from 35 to 45°C. Samples (250 ml) were harvested after 15 and 30 min at 45°C (HS15 and HS30 samples, respectively), dried and frozen at –80°C.

Screening of a *N. crassa* genomic library and sequencing of the glycogen synthase gene

A *N. crassa* genomic library constructed in λ BAR-GEM7-2 was purchased from the FGSC. The library (2×10^8 pfu) was plated on the *E. coli* strain XL-1 Blue, and the resulting plaques were transferred to neutral Hybond nylon membranes. The full-length sequence of the *gsn* cDNA (de Paula et al. 2002), labeled with [α - ^{32} P]dATP by random priming, was used as a probe to screen the library. Hybridization was carried out in 6×SSPE, 50% formamide and 0.5× Blotto (2.5% non-fat dry milk in 0.5% Na₂F). Membranes were then washed with 2×SSPE, 0.1% SDS (42°C, 30 min), followed by 1×SSPE/0.1% SDS (42°C, 30 min) and 0.5×SSPE/0.1% SDS (50°C, 30 min) (Sambrook and Russell 2001). Plasmids were rescued by plasmid excision after transformation of the *E. coli* strain BNN132. The clone containing the largest insert (~6.0 kb, pIV9A-1) was analyzed by restriction analysis and PCR amplification to confirm the size of the *gsn* gene.

The nucleotide sequence of the *gsn* gene was determined by automatic sequencing of both strands using an

ABI-PRISM 377 automatic sequencer (Perkin Elmer), and is available in GenBank under the Accession No. AF417205.

Intron boundaries were determined by comparing the nucleotide sequence of the pIV9A-1 insert to that of the *gsn* cDNA, and by using the SPL program (Search for Potential Splicing Sites) in the BCM Gene Finder. The MotifFinder program was used, together with the TRANSFAC 5.0 database, to analyze the 5' flanking region against a fungal matrix.

RNA analysis and glycogen assay

Total RNA was extracted with LiCl (Sokolovsky et al. 1995) from samples of *N. crassa* mycelium after 30 min of growth at different temperatures, and *gsn* transcription was analyzed by Northern hybridization using the ³²P-labeled *gsn* cDNA as probe (Sambrook and Russell 2001). The *gpd* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) gene was used as a control. The entire coding sequence was amplified from *N. crassa* genomic DNA using specific oligonucleotides.

Glycogen was quantified by digestion with amyloglucosidase after ethanol precipitation (Hardy and Roach 1993).

Primer extension analysis

For primer extension analysis, total RNA from late exponential phase (24 h) was used. A 100-ng aliquot of the oligonucleotide EP2 (5'-CGAACGGGAAGGG-CACGGT-3'), complementary to the 5' UTR region of the *gsn* gene (positions -728 to -746) was end-labeled using 50 μ Ci [γ -³²P]dATP (3000 Ci/mmol) and 10 U of T₄ polynucleotide kinase. Approximately 10⁶ cpm of oligonucleotide were co-precipitated with 30 μ g of total RNA in 100 μ l of STE buffer (100 mM TRIS-HCl pH 7.4, 10 mM EDTA, 1 M NaCl) by the addition of 10 μ l of 3 M sodium acetate (pH 5.2), and 275 μ l of 100% ethanol at -80°C for 1 h. The nucleic acid was recovered by centrifugation, dried under vacuum, resuspended in 100 μ l of hybridization buffer (80% formamide, 10 mM PIPES-KOH pH 6.4, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0) and annealed for 10 min at 85°C, 1 h at 65°C and overnight at 48°C. The RNA-primer hybrid was then precipitated, harvested and dried as above. Primer extension was carried out in a 40- μ l reaction mixture containing 50 mM TRIS-HCl pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 2 U of RNaseOUT (GibcoBRL), each dNTP at 0.25 mM, 50 ng of actinomycin D, 0.5 mM spermidine-HCl, 20 μ Ci of [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol), and 5 U of MoMLV reverse transcriptase (SuperScript II MoMLV-RT; GibcoBRL) at 47°C for 90 min. The RNA was digested with 250 ng of RNase A at 37°C for 10 min, and the reaction was extracted with phenol:chloroform.

The cDNAs were precipitated and separated on an 6% polyacrylamide gel containing 8 M urea in 1×TBE buffer.

Isolation of nuclei and preparation of nuclear extracts

Mycelium collected before heat shock and at different times after heat shock (45°C) was used for the isolation of nuclei. Frozen samples were ground to a powder under liquid nitrogen in a pre-chilled mortar, suspended in buffer A [10 mM PIPES-KOH pH 7.0, 25% (w/v) glycerol, 10 mM β -mercaptoethanol, 0.5% Triton X-100] at a concentration of 20 g/100 ml, and homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer with a Teflon pistil. The homogenate was centrifuged (1000× g, 10 min, 4°C) and the precipitate was re-extracted with buffer A. Supernatants were combined, filtered through Miracloth and centrifuged (5000× g, 10 min, 4°C). The pellet, consisting of the crude nuclear fraction, was suspended in 2 ml of buffer B (buffer A without Triton X-100), layered on 15 ml of buffer C (5 mM PIPES-KOH pH 7.0, 40% sucrose, 5 mM MgCl₂), and centrifuged (3500× g, 30 min, 4°C). The pellet was washed in buffer B and used to prepare the nuclear extracts. Nuclei were stained with Giemsa and examined under the microscope to determine their integrity and quantity.

Nuclear extracts were prepared as follows. Nuclei were suspended in a small volume of nuclear extraction buffer [15 mM HEPES-KOH pH 7.9, 10% (w/v) glycerol, 500 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 10 μ g/ml each of antipain and pepstatin A, 25 mM benzamidine, 50 mM NaF] and stirred on ice for 30 min. Crude nuclear extract was obtained after centrifugation (14,000 rpm, 15 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 (15,000× g, 20 min, 4°C). The final crude extract was frozen as aliquots in liquid nitrogen and stored at -80°C. Total protein was determined using BSA as standard.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

DNA-protein binding reactions were carried out in 30 μ l of 1× binding buffer [25 mM HEPES-KOH pH 7.9, 20 mM KCl, 10% (w/v) glycerol, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 12.5 mM benzamidine, 2.5 μ g poly(dI-dC).(dI-dC) (Amersham-Pharmacia), 5 μ g/ml each of antipain and pepstatin A] containing 15 or 30 μ g of crude nuclear extract. Labeled (10⁵ cpm) probe was added, and reactions were incubated at room temperature for 20 min. Free probe was separated from DNA-protein complexes by electrophoresis on a native 4% polyacrylamide gel in 0.5×TBE buffer (300 V, 10 mA, 15°C). After electrophoresis, the gel was dried onto Whatman 3MM paper, and autoradiographed. For

competition assays, an excess of cold competitor DNA or oligonucleotide was added to nuclear extracts 10 min prior to incubation with the labeled probe.

DNA probes and competitors for EMSA

DNA fragments of the promoter region containing HSE elements were prepared as follows. A 618-bp fragment of the 5' flanking region of the *gsn* gene was amplified with the oligonucleotides BARGEM-R (5'-CTATT-TAGGT GACACTATAG-3') and GSN-RP3 (5'-GCAACGAAT ACTCCCATG-3'), digested with *Sfi* I, blunted, then digested with *Bam* HI and subcloned into the *Bam* HI/*Sma* I sites of pUC18, generating the plasmid pUC-HSE. A 534-bp *Bam* HI-*Eco* RI fragment was isolated from pUC-HSE and used as the HSE probe. Two shorter DNA fragments were also derived from the HSE probe. A 292-bp fragment containing the first HSE elements was amplified with the oligonucleotides pGSN-F (5'-GGAATTCTTGAAAG ACGG-GACCC-3', *Eco* RI site underlined) and HSE-R (5'-CCGATGGGTGT TGACCC-3'), digested with *Eco* RI and subcloned into the *Eco* RI/*Sma* I sites of the pUC18 vector, yielding the plasmid pUC-HSE1. A 250-bp *Eco* RI fragment was isolated from pUC-HSE1 and used as the HSE1 probe. A 315-bp fragment containing the other HSE elements was amplified with the oligonucleotides HSE-F (5'-GG GGAATTTGTGGCTGA-3') and GSN-RP3, digested with *Sfi* I, blunted, and subcloned into the *Sma* I site of the pUC18 vector, generating pUC-HSE2. The HSE2 probe (277 bp) was prepared by digesting the pUC-HSE2 plasmid with *Bam* HI and *Eco* RI.

A DNA fragment containing the STRE element of the promoter region was prepared as follows. A 377-bp fragment was amplified with the oligonucleotides GSN-FP4 (5'-GAAGGGGAACCTTTTGGC-3') and GSN-RP2 (5'-GTTAACGCAGGTCAACAG-3'), and subcloned into the *Sma* I site of pUC18 to form pUC-STRE1. A 158-bp *Bgl* II-*Nco* I fragment was isolated from pUC-STRE1 and used as the STRE1 probe. The mutant mSTRE1 was prepared by changing the sequence 5'-CCCT-3' in the pUC-STRE1 probe to 5'-AAAAG-3' by site-directed mutagenesis in a two-step PCR (Ausubel et al. 1996). The oligonucleotides mSTRE1-F (5'-CCACTGAAATCGGGATCAAAAGT GAATACTTT GGGGTAAG-3') and mSTRE1-R (5'-CTTACCCCAA AGTATTCACTTTTGATCCCG ATTTCACTGG-3') were used in the first reaction to introduce the mutations, and the oligonucleotides GSN-FP4 and GSN-RP2 were used to amplify the whole DNA fragment. The mutant nucleotides are underlined. The mSTRE1 probe was isolated in the same way as the STRE1 probe.

DNA fragments containing the HSE and STRE elements from the intron in the 5'UTR were also prepared. A 241-bp DNA fragment was amplified with the oligonucleotides GSNpm-F (5'-TCCAGTTCCGTT

TGTGC CTC-3') and HSEi-R (5'-CGGGGCCTCACT GAAGC-3'), and subcloned into the *Sma* I site of pUC18, leading to pUC-HSEi. A 250-bp *Bam* HI-*Eco* RI fragment was removed from pUC-HSEi and used as the HSEi probe. A 416-bp DNA fragment was amplified with the oligonucleotides STRE2-F (5'-GCTTCAGT-GAGGCCCG-3') and pGSN-R (5'-GGAATTCGT-GGCTCA ATATGAATGG-3'; *Eco* RI site underlined), and subcloned into the *Sma* I-*Eco* RI sites of pUC18 vector to give pUC-STRE2. A 151-bp *Sal* I-*Bam* HI fragment was isolated from pUC-STRE2 and used as the probe STRE2.

DNA probes were end-labeled by a fill-in reaction with the Klenow fragment of *E. coli* DNA polymerase I and [α - ^{32} P]dATP (3000 Ci/mmol), and purified. Unlabeled probes were used as specific DNA competitors. A DNA oligonucleotide was also used as competitor after annealing the complementary oligonucleotides STRE1-F (5'-GGGATCCCCCTTGAATAC-3') and STRE1-R (5'-GTATTCAAGGGGGATCCC-3'). The oligonucleotide was quantified by measuring the absorbance at 260 nm, and added to the reaction in 10- to 20-fold molar excess.

Results

Cloning and sequencing of the *gsn* gene

The complete sequence of the *gsn* gene was isolated by screening the λ BARGEM7-2 genomic library using the *gsn* cDNA as probe (de Paula et al. 2002). About 130,000 plaques were analyzed and nine positives were isolated after three rounds of screening. After plasmid excision, the clone containing the largest insert (pIV9A, ~6.0 kb) was isolated and the insert size was confirmed by restriction mapping and PCR. The insert contained the entire coding region of *gsn* together with the 5' (2390 bp) and 3' (1379 bp) flanking regions (Fig. 1A).

PCR amplification of the coding region from the clone pIV9A-1 led to a product approximately 300 bp longer than the corresponding fragment amplified from the *gsn* cDNA. The insert was sequenced on both strands, and the alignment between the genomic insert and the *gsn* cDNA showed that the *gsn* gene was organized in six exons interrupted by five introns. Four small introns (II-V, varying in size from 53 to 65 bp) are located in the coding region and one large intron (I; 482 bp) is located in the 5' flanking region, close to the ATG start codon. The last exon contains the translation stop codon (TAA) and the 3'UTR. Table 1 shows the sequences around the exon/intron junctions and the putative branchpoint consensus sequences, which were derived as described by Bruchez et al. (1993). All introns had the conserved sequences GT and AG at their 5' and 3' ends, respectively, in accordance with the rule for splice donors and acceptors in *N. crassa* (Gurr et al. 1987).

Fig. 1A, B Nucleotide sequence (**A**) and genomic organization (**B**) of the *gsn* gene and its 5' upstream sequence. **A** Intron 1 is depicted in *lower case*, with the dinucleotide splice donors and acceptors shown in *bold face* and *boxed*. The reverse primer used to map the 5' end of the transcript is also shown in *bold face* and *boxed* (–721 to –746). The three major putative TISs are indicated in *bold* and marked with *asterisks*. Four putative 5' CAP motifs with the internal consensus TTCAG are *doubly underlined*. A canonical TATA-box is represented in *bold, shaded and underlined* (TFIID). The putative HSE and STRE motifs are *shaded in gray*. The start codon (ATG), N-terminal sequence, and stop codon (TAA) are also indicated. The putative polyadenylation site is shown in *bold and underlined*. The dotted sequences correspond to the probes used in the EMSA experiments. **B** Schematic representation of the *gsn* gene, with its 5' and 3' flanking regions and ORF. The relative positions of HSEs and STREs are marked and indicated by *arrowheads* and *diamonds*, respectively. The polyadenylation site is indicated by the *filled circle*. The TATA-box sequence is indicated by the *oval* marked **T**. The *gsn* ORF is delimited by the ATG start codon and the TAA stop codon and the five introns are depicted. The putative Transcription Initiation Sites (TISs) are indicated by the *angled arrows*

A

pBARGEM7-2
 CCGGGGTACCGAATTTGGAAAGACGGGACCCGCACGGCCCACTGCGCGTTGTTGTGGATC -2341
 ←HSE
 CAATTTCAAGTTGGGAATGACGCAAAAGAGCGGGATCGTTGGATGGTTGGGGCTGTTCTT -2281
 ←HSE
 CTTGTGTACAGCCACTGTTTCTTCAGCCGAGGCAAGTACCTATGGCGGCGTCATGCTGA -2221
 HSE→ HSE→
 GCTTTTGTGTATATGACGCTGGACGCTCTTTAGAGAGAAACAGCTTTGAGGGTGAGAAA -2161
 HSE→ HSE→
 GTTGCTGGAAAAATCCCATCAAAGAAATTGGGTAGAAATCTAACTGTTTGGGTCAACACC -2101
 CATCGGCGCTGGTGGGAAATTGTGGCTGATATCGGTTTAAAGTGAATGGAGTTCGGTTGC -2041
 HSE→
 AGAATATGAGGGGTGAAGTGCAGGAATCCCGCGCCGATAGGTTGCAGTTGCAAGGGATC -1981
 HSE→
 AAGGGACTATGGAGGAGACTACAAGAAATGAATGTTGCTCTGGAACCAATGCCGGGCGAGTG -1921
 ←HSE
 GGGACCCACAGCCCACTTGTGCTTGTCTTGTCTTTTCGGGCTCGCTAGAGGTAATA -1861
 ←HSE
 TTTCTTCGCTTCTTGTCTGACTTTTTTCAATAGCCGCTCTTTGGGCCAGCTTGGCCGTGAG -1801
 ATCGGGCCCGCATGGGAGTATTCGTTGCTGTTGGTTGGGTGAAATGCAGTTAGTCGAGAG -1741
 HSE→
 GGCAACATGCGATGATCAGGACCAGACAACCCAAAGAAACCGAACGGTGGGCGTTGTTGT -1681
 TACACCCGGTATGTATGGTGTGTAAATTGGGCAATCTGATTGGGAAAGGTGACAGACAAAAG -1621
 GTGATTGACTTTGCTGAAGCGGGATACGCACTGCACAGATCTGGAGGACCTCCGTAG -1561
 ←STRE1
 AATAATATCTTACAGTCGTACCCAAAGGTAGTAATCCACTGAAATCGGGATCCCGCTTG -1501
 AATACTTTGGGTAAGGCTCGTGGGAAGACAAAGCGCGGAGAGCTTCATGTTTACGATAC -1441
 HSE→
 ATGGACTCTGAATGATGATGATGCTCAAGAGCCCGTGGAGTGGCAAGAAAAAAT -1381
 HSE→
 TGAACAGAAATACCTGTCAAAGTTGGGGCGTTGAGGTGAGGTACCGTCATGCGTCTGAAT -1321
 GGCAACTCGGTGGTTCCAAAGCTTGACGCCATGCCTGTTGACCTGCCTTAACGCGGGCAG -1261
 TCTACATACTACCAATGACGCTCGTTACGTACTGGGCGTATTGAACGGTGATGGTGCATC -1201
 GATGTTGGGACGGGCGGATTCTTATGTGCCCCTACTGTGCAGTACTGGACAGCTGTGA -1141
 * *
 CGGACCTCCAAGAGTTGCCATCGAGATCGAGCAACCCAGAAAGAGGGGAACCTTTTGGC -1081
 HSE→
 GGCGGCAACCTGGAATGCATAGCATTGGATCCCATGAGTTAGGTTTGAATATCATGAT -1021
 HSE→
 CTGTACGTAGGAAGAGGTATCTGTGTAGCAGTGTGCCCCCAGTTCAAGAGTAGCCGA -961
 TFIID→ *
 GTATGTATAAAACAAACCTCAAACCTTCTCCCTCTTCTATAGCGTTACTGCCCAATTACCT -901
 HSE→
 ACCTCTACCTATCCTATCCAAAGAGCCGGCGGCACTACCTACCTACCACTACCGACTTA -841
 CCCTCTCGCTCCCGCTTTCAGACTTCTCCTTCAGTCATCCTGTTTCAGCTTCACTTCAGACT -781
 GTCAACGTAGCGTAGGTAGTCTTTTGTCTGTCTTACCGTGGCCTTCCCGTTCCGAGCCGA -721
 CTTTCATCTCGCAGCGAGCCCACTTACACGCGCCTCCCTTGTTCACGAGGACCTCGCGTT -661
 ←HSE
 ACTCAGATTCTGACTCTTCGGGTTGGGTCTAGTATAGTGAGATTCAAGTCCAGATCTGCC -601

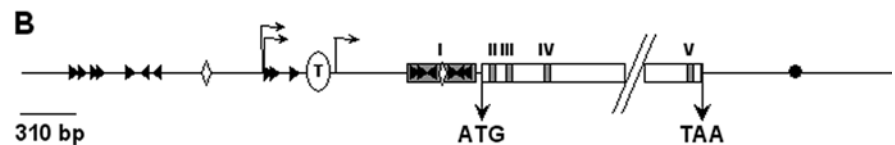
Analysis of the 5' and 3' flanking regions

The nucleotide sequences of the 5' and 3' flanking regions were analyzed with the TRANSFAC 5.0 matrix to identify potential consensus elements in both regions. A putative TATA-box motif was identified at position –955 in the 5' flanking region, and a putative polyadenylation site (TAATAGAA) was identified in the 3' flanking region, extending from position +2810 to +2817 (Fig. 1A). Comparison of the *gsn* gene sequence with the cDNA sequence demonstrated that the poly(A)

tail started at an adenine nucleotide (+2833) located 24 bp downstream of the putative polyadenylation site. Thus, the size of the 3'UTR is 474 bp. An analysis of the 5' flanking region for potential *cis*-acting transcriptional regulatory motifs identified many putative heat shock elements (HSE), all of them with the NGAAN motif, which represents two half HSEs oriented face-to-face. Another interesting feature of this region was the presence of two putative STRE elements (NAGGGGN motif), one in the promoter region, starting at position –1503, and the other in the intron in the 5'UTR, starting

Fig. 1A, B (contd.)

TCTGTTGCTGCCCGAAGGCACTGTTTTCCAGTTCCGTTTGTGCTCCCTGCCCTAGAGGT -541
 GGAACCTCTTCGA^{gtt}acgttccggtttgtgagacacacactttttcttctcctgcgacac -481
 cgcagcacctgtgtcgcagccgtcgagccggtggtattcgcagccagactcccaagcgaa -421
 cctagctcaagagatcgaagccgtgcgccc^{gggaagaggttggaaa}actcggttcaggttga -361
 gg^{ttcc}agtagcttcagtgagggccggtcccccgttcccggttcggggttttaagcttcg -301
 catccccagctgcacccctgaagcttcccaccagacccattccgggtgacattcctcg -241
 aagctctaccccaccagtgcggtgtgtctcgtcctggctacgtcgacctgatctgcttca -181
 aat^{agaac}ccaaccgtctgtgtggtccctcttcttctgctactcgcctctcttctcct -121
 ctctacgaacctgaaaaatcagtg^{ttct}gtggcagcttctgtgttacactaacacgaag -61
 ctctggacgacaga^{ag}CACTTTGACTTCGGCGCGCCGTCACCCATTTCATATTGAGCCACA -1
 M A H D N R E P R E V K N H L L F E V A 20
 ATGCCCCACGACAACCGTGAACCCCGCGAGGTCAAAAACCACTCCTCTTTGAGGTGGCG +30
 TAA^{CGCGAGCTCTGTTGCCTTGATCATCTTTTCAGAATCGTTTCAGTCATTGGTTGTGTCAGCG} +241
 TTTATGTTTCCCCAAAAAATAACACGGGCTTCGTTGGCGGAAATCGATTGTTGTCGTC +247
 CGAGCTATCCACCCTGGTCCCCGGGAGTACTGGAGCTCGCAGAGCATAGCAAGACGAGGG +253
 TGCGATAGAAGAAATCCTATCATCGTCGGGTGAGCAGGTATAAGGGTTGACGGGAGAAGG +259
 GCCGAGACGTGGGACGCAATATCCTCCCGGTCTCTTTCAACCTTCGTTGGTCCCGGT +265
 GAAGTCAAGCTCTTGTAAAGCCATAGCGGAGCGAGTTTCCAGTCCTCGACGTCGGGTTCT +271
 GAGCAGGGTACATTAGGGTAGGAACAGGACCAACGGTGTGTGTAACGTACAAATGTATTT +277
 GCCTGGCGGAGGATTCCATCGTTTTCTTGTACCTAA^{TAGAA}TCGGGCTTTCTCAGGACAT +283
 CATCGATGGTGGTGATTCCATGTGCTTAAATAGGCCGCATGGCCTTTAGTAAATAGGGTGT +289
 ATGTAGGCCCTGCATATTCTGCTTCTCAGGGGGGGGGGGGCAACCGAGGCGTTTCATAGGC +295
 TGCAGAACAACGTGCAATGAAATCCCCACTCCAGATATTAGTTAGGAGGTTAGCACTTAC +301
 AAGGACGTGGGCACGAAGCAAACTAGCATCAGTTGCCAATCATTGGAAGTCAGGAGCTCA +307
 TCTCTGTCTCTAATCTGCCCAAGTCGCCCTTTGGACAGTAAGCGCGTTTGAGGCAAAAACG +313
 CAATATCGATATATCATAGAAGGGGAAAGAGTCTTAGACCGATTCTGTGGCGCATATTCC +319
 AGCAACGGAATGAAAGCAGGCTTGACACCGACGAGGGTTCGTTGTTGCTTTTGGCGGG +325
 CAGAGATGGCGTTCACTTCCCTCAATCTGGA^{CTGTGTGCGGTGGGTGTTGTGCTTCGTTG} +331
 CCTCTCTGTCCATTTCTGACGACGCAGCAATTCTCATAAGGTAATCACAGCCGATTCTG +337
 GGAGCAACACCCAGCTCTCTTCCCTCTTTTGTGCTGCTTGAAGTTGTCAGCACCTTTCTG +343
 GTTACGACGTGCAAAACGCTTCATCGGGCGCCTCCAGCAAGCACACCAAGTCCTGTGCG +349
 ACCCTAGCCGTTGTGTACACTACTACATACATACCTATATATGTCCATGGTACGCGCTATC +355
 GTGCGTTGCTTCAAAGCCTGTGCGCTGCTTCCCCCTTTTGTAGTACCTTAGGTATG +361
 TGGTCTCCGCTACTACCTTGGTTACACCGTTGACTGCTTCCGTTCCCTCTTCCCTTAG +367
 GACTCCCTAGGACGGCATCTGCAAATTCTCGTTATATTTACCACATTTCCACGAGGTGCC +373
 GC +373



at position -282 (Fig. 1A). Four consecutive repeats of the sequence TTCAG were found downstream of the TATA box, starting at positions -788, -799, -813 and -824, respectively (Fig. 1A). These sequences represent putative cap signals for translation initiation.

Mapping of the transcription initiation site

The transcription initiation site (TIS) was determined by primer extension analysis, using an antisense primer complementary to the *gsn* gene from -728 to -746 and total RNA isolated from cells in the late exponential phase. Three extension fragments were synthesized (Fig. 2). The TIS closest to the ATG initiation codon was located at position -942, 14 nt downstream of the

TATA box, and corresponded to a C residue in the sequencing ladder. The two distal TISs were located upstream of the TATA box, at positions -1103 and -1112, and corresponded to an A and a G residue, respectively (Fig. 2). Thus, if we consider the first TIS to be the major one, the size of the 5'UTR is 460 bp. The fragment sizes are compatible with the results of our Northern analysis, which indicate the presence of only one transcript of approximately 3.0 kb.

Binding of proteins to the HSE and STRE elements in the promoter region during heat shock

Previous results from our laboratory have shown that the level of the *gsn* transcript decreases when cells are

Table 1 Intron-exon boundaries of the *gsn* gene

Intron	Nucleotide sequences of intron-exon junctions ^a		Intron size (bp)	Position (nt) ^b
	5' splice donor	3' acceptors		
I	CTTCGAGgtacgttccgt...	...ggacgacagaagCATCTTG	482	−527 to −46
II	CATCGAGgtatgcgcaaaa	...aattgttctagTTGGTGGA	59	+80 to +138
III	CAATCGgtacgtctctct	...gaatgattccagGCGGCCGTC	65	+237 to +301
IV	CTGGGCGAGgtcagtacttgc	...acaaaatcgtagTTGTATGC	53	+578 to +630
	AAGTTACCgtaagtgatgt	...ttctgattctagTGAGGAA	61	+2187 to +2247

^aNucleotide sequences of the exons are indicated in *upper case* and introns are indicated in lower case. Introns are positioned according to GT/AG rule for dinucleotide donors and acceptors of splicing (*underlined*). Note that the splice sites used for the removal of introns II and V interrupt the codons for Val27 and Pro670, respectively

^bThe intron positions in the *gsn* gene are given with reference to the TIS downstream of the TATA box as position +1

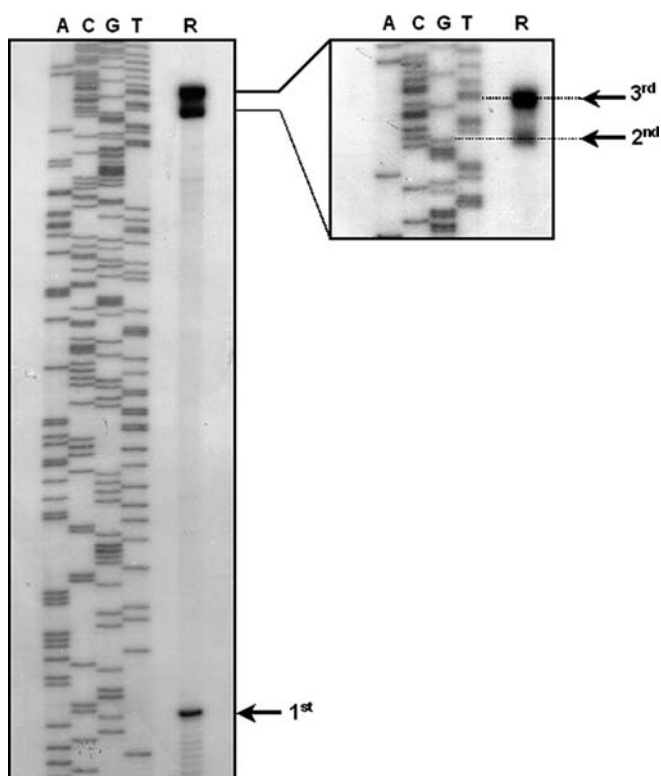


Fig. 2 Mapping of *gsn* transcripts by 5'-primer extension assay. Transcription initiation sites (TISs) were determined by using the specific oligonucleotide EP2 (5'-CGAACGGAAGGG-CACGGT-3'), which anneals at positions −728 to −746, and reverse transcriptase. The arrows indicate the 385-bp, 376-bp, and 215-bp extension products (lane R), which correspond to the 1st (G, nucleotide −1112), 2nd (A, nucleotide −1103), and 3rd (C, nucleotide −942) major TISs, respectively. A DNA sequencing reaction using the universal primer −40 (Amersham, Pharmacia) on pUC18 was loaded alongside the extension products (lanes A, C, G, and T)

subjected to heat shock (shifted from 30°C to 45°C) and recover to normal levels after cells are returned to 30°C (de Paula et al. 2002). Here we show that levels of the *gsn* transcript and of glycogen decrease when the temperature is raised from 35°C to 45°C (Fig. 3). This is a specific response of the *gsn* gene, since expression of the *gpd*

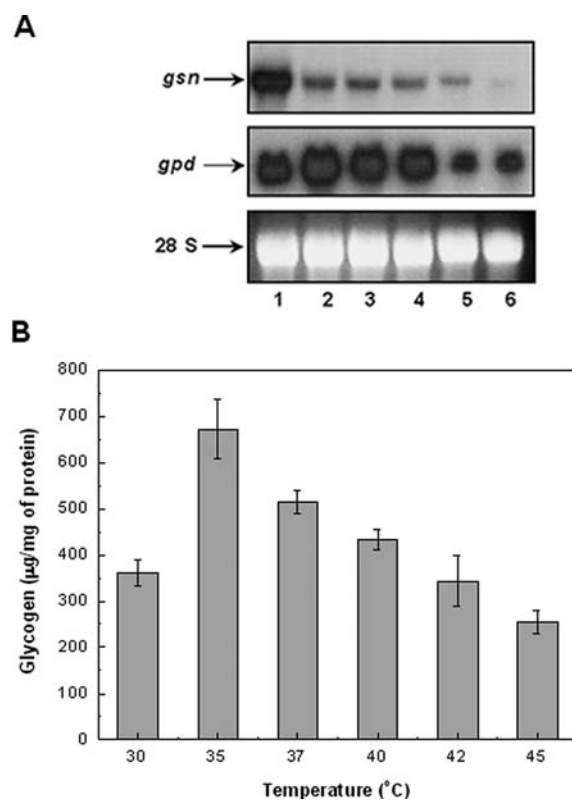


Fig. 3A, B Transcription of the *gsn* gene (A) and accumulation of glycogen (B) under heat shock. **A** Total RNA from *N. crassa* was analyzed by Northern hybridization. Aliquots of mycelia grown for 24 h at 30°C (lane 1) were shifted to different temperatures (35°C, 37°C, 40°C, 42°C and 45°C; lanes 2–6, respectively) for 30 min, and samples were collected. RNA was prepared and probed with the full-length *gsn* cDNA and the *gpd* genomic DNA. The ribosomal RNA (28S) was used to control for equal sample loading. **B** Glycogen levels after temperature shift. Results are means of three independent experiments

gene remains constant over the temperature range from 30°C to 40°C.

In order to investigate whether the STRE and HSE elements located in the promoter region are functional stress-responsive *cis*-acting elements, DNA fragments containing STRE or HSE motifs were prepared. Mycelia

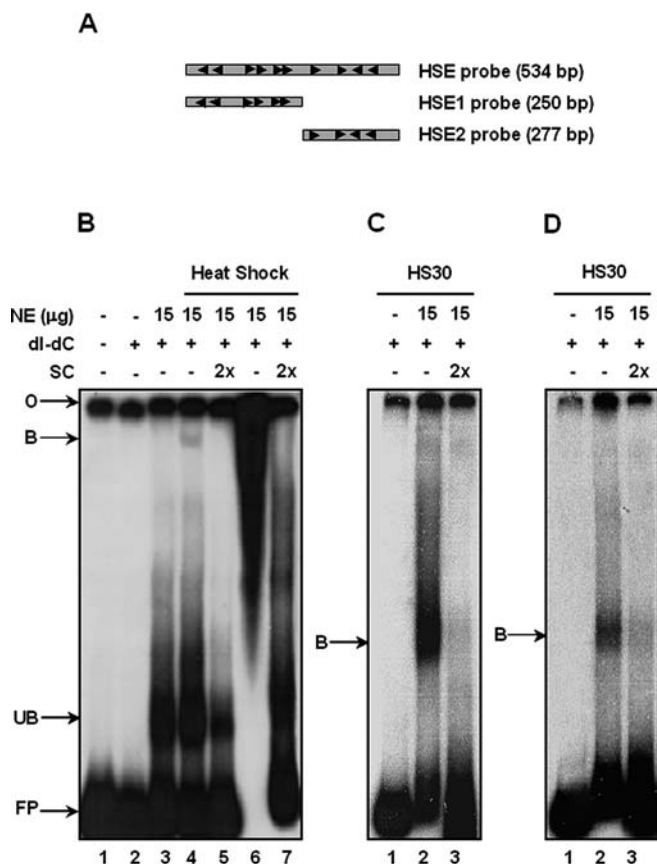


Fig. 4A–D Binding of nuclear protein(s) to HSE probes derived from the *gsn* promoter region. **A** Schematic representation of the HSE probes with the HSE motifs (arrowheads). **B** Gel shift assay with the full-length HSE probe and nuclear extracts from *N. crassa*. **B**, specific binding of protein(s) to HSEs during heat stress. Lane 1, HSE probe, no protein added. Lane 2, HSE probe plus dl-dC, no protein added. Lane 3, crude nuclear extract before heat shock (control). Lanes 4 and 5, crude nuclear extract isolated 15 min after the shift from 30°C to 45°C (Heat Shock, HS15). Lanes 6 and 7, crude nuclear extract isolated 30 min after the shift from 30°C to 45°C (Heat Shock, HS30). **C**, **D** Gel shift assay with the HSE1 and HSE2 probes. Lanes 1, HSE probe, no protein added. Lanes 2 and 3, crude nuclear extract obtained 30 min after a shift from 30°C to 45°C (HS30). O, gel origin; UB, unspecific binding of proteins to the probe; SC, specific DNA competitor; FP, free probe; NE, nuclear extract

were collected before heat shock and at 15 and 30 min after a shift to 45°C (heat shock) and nuclear extracts were prepared. DNA probes were incubated with the nuclear extracts and analyzed for protein binding by gel mobility shift assays. Two regions of the promoter were analyzed using the following probes: a 555-bp fragment containing the HSE elements (–2344 to –1811; HSE probe) and two smaller fragments derived from it (HSE1 and HSE2 probes), and a 158-bp fragment containing the STRE1 element (–1581 to –1424; STRE1 probe) (Fig. 4A). Incubation of HSE probes with nuclear extract prepared from cells after transfer to 45°C resulted in the formation of a high-molecular-weight DNA-protein complex. Binding was already observed upon incubation of the probes with extract prepared after

15 min of heat shock (Fig. 4B, lane 4) and was very strong after 30 min of heat shock (Fig. 4B, lane 6). Complex formation was inhibited in the presence of a two-fold molar excess of unlabeled specific competitor (HSE probe) (Fig. 4B, lanes 5 and 7), and no complexes were formed with proteins present in cells before heat

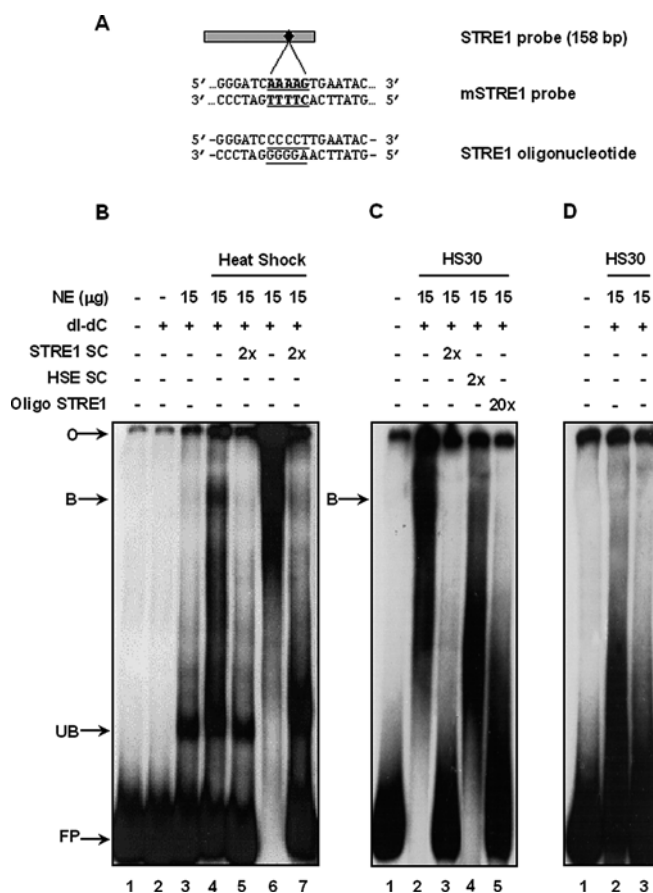


Fig. 5A–D Binding of nuclear protein(s) to STRE probes from the *gsn* promoter region. **A** Schematic representation of the STRE1 probe showing the position of the STRE1 motif (black box), the mSTRE1 probe, and the STRE1 oligonucleotide used as a specific competitor. **B** Gel shift assays were performed with the STRE1 probe and crude nuclear extracts from *N. crassa*. **B**, specific binding of protein(s) to the STRE1 element from the *gsn* promoter region. Lane 1, STRE1 probe, no protein added. Lane 2, STRE1 probe plus dl-dC, no protein added. Lane 3, crude nuclear extract before heat shock (control). Lanes 4 and 5, crude nuclear extract obtained 15 min after a shift from 30°C to 45°C (Heat Shock, HS15). Lanes 6 and 7, crude nuclear extract after 30 min of shift from 30°C to 45°C (Heat Shock, HS30). Specific DNA competitor (SC) for this assay was used in two fold molar excess. **C** Specific binding of *N. crassa* protein(s) in the HS30 nuclear extract to the STRE1 probe. Lane 1, STRE1 probe, no protein added. Lanes 2 and 3, protein binding in the absence (lane 2) and in the presence (lane 3) of STRE1 specific competitor. Lane 4, the HSE1 DNA fragment was added as a competitor to test for cross-reaction between STRE and HSE binding. Lane 5, the STRE1 oligonucleotide was used as specific competitor. **D** EMSA of HS30 nuclear extract using the mSTRE1 as probe. Lane 1, mSTRE1 probe, no protein added. Lanes 2 and 3, gel shift assay in the absence (lane 2) and in the presence (lane 3) of mSTRE1 specific competitor. SC, specific competitor; O, gel origin; UB, unspecific binding of proteins to the probe; FP, free probe; NE, nuclear extract

shock (Fig. 4B, lane 3). In order to characterize which HSE elements were important in the stress response, the HSE probe was split into two small fragments and each of these was in separate assays. DNA shifts were observed with both probes (Fig. 4C and D, lane 2), indicating that proteins present in the nuclear extract of heat-shocked cells bound to sequences containing these elements in the promoter region.

Incubation of the STRE1 probe with nuclear extracts gave similar results: nuclear proteins were also able to bind to this region of the *gsn* promoter. DNA-protein complexes were observed after incubating the cells at 45°C for 15 and 30 min (Fig. 5B, lanes 4 and 6, respectively), and their specificities were confirmed by addition of the unlabeled STRE1-specific competitor. In order to determine whether the binding was specific to the STRE1 element we also used the HSE1 fragment as a competitor. The HSE1 fragment did not affect the DNA-protein complex observed when the labeled STRE1 probe was incubated with HS30 nuclear extract (Fig. 5C, lane 4). To confirm the specific involvement of the STRE1 element in the formation of the DNA-protein complex we designed oligonucleotides which were annealed to produced a double-stranded DNA probe (18 bp) containing the consensus sequence of the STRE1 element. This oligonucleotide was used as a specific competitor by adding it to nuclear extracts of cells kept at 45°C for 30 min. The intensity of the shifted DNA band was strongly reduced in the presence of a 20-fold molar excess of unlabeled competitor (compare lanes 2 and 5 in Fig. 5C). This result was confirmed by using the mSTRE1 probe, in which the CCCCT core sequence is mutated to AAAAG. No DNA-protein complex was observed in this assay (Fig. 5D, compare lane 2 with lane 2 in Fig. 5C), suggesting specific binding of protein to this region of the *gsn* promoter. All these results indicate that the STRE core sequence (5'-CCCCT-3') is sufficient to permit binding of protein(s) activated by heat shock.

Binding of proteins to the intron in the 5'UTR

DNA probes encompassing STRE2 or the putative HSEs in intron I were also assayed for protein binding (Fig. 6A). Incubation of these probes with nuclear extracts prepared before and after heat shock resulted in the appearance of DNA-protein complexes with reduced mobility in both cases (Fig. 6B and C). A strong complex of high molecular weight (B1), which was eliminated in the presence of specific competitor, was observed upon incubation of the HSEi probe with proteins from cells that had not been exposed to heat shock (Fig. 6B, lanes 2 and 3). Two complexes (B1 and B2) were observed with the STRE2 probe under the same conditions (Fig. 6C, lane 2). Formation of both labeled complexes could be prevented by addition of the specific competitor STRE2 (Fig. 6C, lane 3). However, only the B2 complex was eliminated by the addition of the STRE1 DNA oligonucleotide (Fig. 6C, lane 4). These

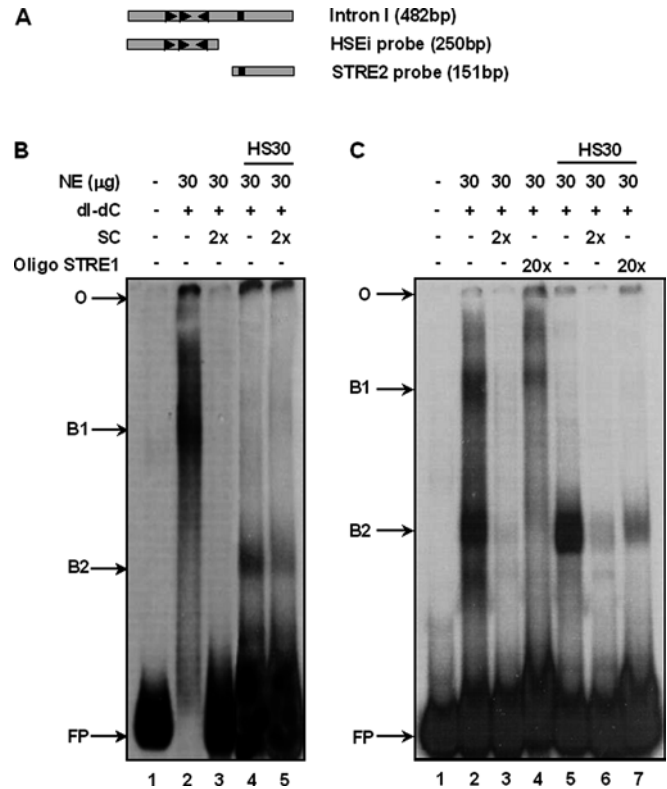


Fig. 6A–C EMSA scanning of the transcription elements located in the intron in the 5'UTR of the *gsn* gene. **A** Schematic representations of the HSEi and STRE2 probes, with the HSEs (arrowheads) and STRE2 (black box) motifs. **B** Gel shift assays were performed with the HSEi probe and crude nuclear extracts isolated from *N. crassa*. B1 and B2, specific binding before and after exposure to heat shock, respectively. Lane 1, HSEi probe, no protein added. Lanes 2 and 3, crude nuclear extract before heat shock (control). Lanes 4 and 5, crude nuclear extract after 30 min of a shift from 30°C to 45°C (HS30). **C** Gel shift assays were performed with the STRE2 probe and crude nuclear extracts from *N. crassa*. B1 and B2, specific binding before and after heat shock, respectively. Lane 1, STRE2 probe, no protein added. Lanes 2 and 3, crude nuclear extract before heat shock. Lanes 4 and 5, crude nuclear extract after 30 min of a shift from 30°C to 45°C (HS30). O, gel origin; SC, specific DNA competitor; FP, free probe; NE, nuclear extract

results indicate that protein(s) bind to intron I and might regulate gene transcription during vegetative growth of the fungus. Under heat shock conditions a complex of lower molecular weight was observed with both probes (Fig. 6B and C, lanes 4 and 5, respectively). Addition of the unlabeled specific competitor strongly reduced the intensity of both complexes (Fig. 6B and C, lanes 5 and 6, respectively), as did the STRE1 DNA oligonucleotide (Fig. 6C, lane 7). These results suggest a direct involvement of the STRE2 element in the modulation of *gsn* transcription during vegetative growth and under heat shock conditions.

Discussion

The sequence of a full-length *gsn* cDNA that codes for glycogen synthase in *N. crassa* and the effects of different

growth conditions on *gsn* transcription have been reported previously (de Paula et al. 2002). Conditions that induce heat shock and carbon starvation were demonstrated to down-regulate the expression of the *gsn* gene by Northern analysis. Determination of the transcriptional start site and the complete sequences of the promoter and the 5'UTR regions should provide insights into the regulatory mechanisms which control the transcriptional response to a stress condition such as heat shock. By screening a genomic library with the *gsn* cDNA, we have isolated and characterized the organization of the complete *gsn* gene.

The *gsn* gene is interrupted by five introns and the intron/exon junction sequences are similar to the consensus sequences found in most introns (Gurr et al. 1987). The largest intron is located in the 5'UTR region, 45 bp upstream of the ATG start codon. The presence of introns between promoter and start codon has also been reported for other genes, including the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes of *Aspergillus nidulans* (Punt et al. 1988) and *N. crassa* (Sahni and Kinsey 1997). In both of these genes, and in the *gsn* gene, the intron located in the 5'UTR is very close to the start codon, a characteristic of genes in which the intron plays a role in regulating transcription (Callis et al. 1987). The four small introns in the coding region of the gene were located in regions that encode the N- and C-terminal regions of the *N. crassa* glycogen synthase. It is well known that these regions are polymorphic and contain the phosphorylation sites (Roach et al. 2001).

Primer extension analysis with an oligonucleotide complementary to a sequence near the 5' end of the mRNA produced three extension products that were derived from distinct transcription initiation sites (TISs). Although the presence of more than one TIS is a very common feature of genes in *N. crassa* (Kapoor et al. 1995), we assume that the site at position -942 is the major transcription initiation site in the *gsn* gene, since it is present downstream of the putative TATA box. In addition, only one transcript of approximately 3.0 kb, coincident with the size expected for a *gsn* mRNA initiated at this position, was observed by Northern analysis. The other two TISs may represent alternative transcription initiation sites that are used under different conditions.

Two STRE and many HSE motifs were identified in the 5' flanking region. Since a rise in temperature decreases the levels of *gsn* mRNA (de Paula et al. 2002, and present results) we investigated the role of these *cis*-acting regulatory elements in the response to a temperature shift and under normal growth conditions. DNA probes derived from the promoter region and the intron in the 5'UTR were incubated with nuclear extracts prepared before and after exposure of the cells to a temperature shift (30°C to 45°C) and assayed for the presence of proteins that bind to these DNA sequences. Using EMSA, we observed that nuclear protein(s) bound specifically to these regions. When DNA probes from the promoter region were assayed, DNA-protein

complexes were detected only in extracts of cells that had been subjected to a temperature shift; i.e., the binding proteins were specific to heat-shocked cells. One DNA probe was rich in HSEs and the other contained a STRE motif. Using a specific DNA oligonucleotide as competitor and a DNA probe mutated in the STRE core motif we demonstrated that the STRE in the promoter was a target for binding of nuclear protein(s).

It is well known that many genes in *S. cerevisiae* require HSE and STRE motifs to activate transcription (Erskine et al. 1996). By binding to STREs, the zinc-finger transcription factors Msn2p and Msn4p mediate transcriptional induction in a multistress response. The promoter region of the glycogen synthase genes *GSY1* (Unnikrishnan et al. 2003) and *GSY2* (Ni and LaPorte 1995; Parrou et al. 1999b) both contain STREs that activate transcription under heat shock. However, in *N. crassa*, heat shock down-regulates transcription of the *gsn* gene, and this regulation may depend also on the STRE and HSE motifs present in the promoter region, as we have shown here. The involvement of STRE as a transcriptional repressor was previously demonstrated for the *HSP12* gene in *S. cerevisiae* when cells were transferred to a medium containing very low amounts of glucose (Groot et al. 2000). In addition, these authors suggested that the gene repression was independent of Msn2/4p. A search for Msn2p and Msn4p orthologs in a publicly available *N. crassa* database (<http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora>) failed to find any. This might suggest that STREs in *N. crassa* may act in a different way, and may point to a new mechanism of heat shock response in this specie. Gene repression mediated by HSEs has already been described in mammals (Cahill et al. 1996). Thus, the HSF1 represses the transcription of the prointerleukin 1 beta gene at elevated temperatures, and repression was found to be strictly dependent on an intact consensus HSE sequence in the promoter.

Using a DNA probe derived from the 5'UTR intron we demonstrated that *N. crassa* nuclear proteins bind to the HSE and STRE elements in this region. As DNA shifts were detected both before and after the temperature shift, we assume that this region might be involved in mediating basal transcription of the *gsn* gene. The level of the *gsn* mRNA increases when cells approach stationary phase, suggesting that induction results from transcriptional activation (de Paula et al. 2002). However, we do not know whether the DNA-protein complexes observed before and after the temperature shift are formed by binding of distinct nuclear proteins to different regions. Further characterization will be necessary to investigate this possibility. There is some evidence to show that introns can play a regulatory role in transcription, and that transcription of some genes depends on the first intronic sequence (Bergers et al. 1995). The fact that the first intron in the *gsn* gene is located in the 5'UTR, and is much larger than those in the coding region, may suggest that this DNA region is involved in regulating transcription of the *gsn* gene.

In the present study, we have cloned the functional promoter for the *N. crassa gsn* gene and provided evidence compatible with the assumption that HSE and STRE motifs are involved in the transcriptional regulation of this gene in heat shocked cells. Moreover, the intron located in the 5'UTR may regulate basal transcription of the *gsn* gene. Further characterization of the nuclear proteins that bind to these elements, and identification of the precise DNA sequences involved in protein binding, will provide us with the tools for a better understanding of the molecular mechanisms that control *gsn* expression under different nutritional and environmental conditions. One of the main priorities of our future work will be the isolation and identification of the protein(s) that bind to the STRE element and is (are) responsible for the regulatory effects observed in this study.

Acknowledgements We thank Dr. H. F. Terenzi (Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP), Dr. R. M. de Paula, and Dr. A. M. Silva (Instituto de Química-USP, São Paulo) for suggestions and discussion of this work; Dr. N. Monesi, Dr. M. Vallim, Dr. J. C. Oliveira, and Dr. A. O. B. Ribon for helpful suggestions on primer extension assay and EMSA. F.Z.F. was supported by a fellowship from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). This work was supported by grants from FAPESP to M.C.B. The work was carried out in compliance with the current laws governing genetic experimentation in Brazil

References

- Ausubel F, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1996) Current protocols in molecular biology. Wiley, New York
- Bergers G, Graninger P, Braselmann S, Wrighton G, Busslinger M (1995) Transcriptional activation of the *fra-1* gene by AP-1 is mediated by regulatory sequences in the first intron. *Mol Cell Biol* 15:3748–3758
- Bienz M, Pelham HR (1986) Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the *Xenopus hsp70* gene and when linked to a heterologous promoter. *Cell* 45:753–760
- Bienz M, Pelham HR (1987) Mechanisms of heat shock gene activation in higher eukaryotes. *Adv Genet* 24:31–72
- Bruchez JJP, Eberle J, Russo VEA (1993) Regulatory sequences in the transcription of *Neurospora crassa*: CAAT box, TATA box, introns, poly(A) tail formation sequences. *Fungal Genet Newslett* 40:89–96
- Cahill CM, Waterman WR, Xie Y, Auron PE, Calderwood SK (1996) Transcriptional repression of the prointerleukin 1 beta gene by heat shock factor 1. *J Biol Chem* 271:24874–24879
- Callis J, Fromm M, Walbot V (1987) Introns increase gene expression in cultured maize cells. *Genes Dev* 1:1183–1200
- De Paula R, de Pinho CA, Terenzi HF, Bertolini MC (2002) Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. *Mol Genet Genomics* 267:241–253
- Enjalbert B, Parrou JL, Teste MA, François J (2004) Combinatorial control by the protein kinases PKA, PHO85 and SNF1 of transcriptional induction of the *Saccharomyces cerevisiae* *GSY2* gene at the diauxic shift. *Mol Gen Genomics* 271:607–708
- Ersikine AM, Adams CC, Diken T, Gross DS (1996) Heat shock factor gains access to the yeast *HSC82* promoter independently of other sequence-specific factors and antagonizes nucleosomal repression of basal and induced transcription. *Mol Cell Biol* 16:7004–7017
- Farkas I, Hardy TA, dePaoli-Roach AA, Roach PJ (1990) Isolation of the *GSY1* gene encoding glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. *J Biol Chem* 265:20879–20886
- Farkas I, Hardy TA, Goebl MG, Roach PJ (1991) Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *J Biol Chem* 266:15602–15607
- Groot E, Bebelman JP, Mager WH, Planta RJ (2000) Very low amounts of glucose cause repression of stress-responsive gene *HSP12* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 146:367–375
- Gurr SJ, Unkles SE, Kinghorn JR (1987) The structure and organization of nuclear genes of filamentous fungi. In: Kinghorn JR (ed) *Gene structure in eukaryotic microbes*. IRL Press, Oxford, pp 93–139
- Hardy TA, Roach PJ (1993) Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J Biol Chem* 268:23799–23805
- Johnston M, Carlson M (1992) Regulation of carbon and phosphate utilization. In: Jones EW, Pringle JR, Broach JR (eds) *The Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., pp 193–281
- Kapoor M, Curle CA, Runham C (1995) The *hsp70* gene family of *Neurospora crassa*: cloning, sequence analysis, expression, and genetic mapping of the major stress-inducible member. *J Bacteriol* 177:212–221
- Leloir LF (1971) Two decades of research on the biosynthesis of saccharides. *Science* 172:1299–1303
- Lillie SH, Pringle JR (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* 143:1384–1394
- Martinez-Pastor M, Marchler G, Schuller C, Marchler BA, 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
- Morimoto RI (1993) Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 259:1409–1410
- Ni HT, LaPorte DC (1995) Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. *Mol Microbiol* 16:1197–1205
- Noventa-Jordão MA, Polizeli MLTM, Bonini BM, Jorge JA, Terenzi HF (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
- Parrou JL, Teste MA, 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
- Parrou JL, Enjalbert B, Plourde L, Bauche A, Gonzalez B, François J (1999a) Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15:191–203
- Parrou JL, Enjalbert B, François J (1999b) STRE- and cAMP-independent transcriptional induction of *Saccharomyces cerevisiae* *GSY2* encoding glycogen synthase during diauxic growth on glucose. *Yeast* 15:1471–1484
- Punt PJ, Dingemanse MA, Jacobs-Meijnsing BJM, Pouwels PH, van den Hondel CAMJJ (1988) Isolation and characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene of *Aspergillus nidulans*. *Gene* 69:49–57
- Roach PJ, Skurat AV, Harris RA (2001) Regulation of glycogen metabolism. In: Jefferson LS, Cherrington AD (eds) *Handbook of physiology: the endocrine pancreas and regulation of metabolism*. Oxford University Press, pp 609–647
- Rothman-Denes LB, Cabib E (1971) Glucose-6-phosphate dependent and independent forms of yeast glycogen synthetase. Their properties and interconversions. *Biochemistry* 10:1236–1242
- Sahni M, Kinsey JA (1997) Identification and cloning of the *Neurospora crassa* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, *gpd-1*. *Fungal Genet Newslett* 44:47–49

- Sambrook J, Russell DW (2001). Molecular cloning: a laboratory manual (3rd edn) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sarge KD, Murphy SP, Morimoto RI (1993) Activation of heat shock gene transcription by HSF1 involves oligomerization, acquisition of DNA-binding activity, and nuclear localization and can occur in absence of stress. *Mol Cell Biol* 13:331–336
- Schmitt AP, McEntee K (1996) Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5777–5782
- Sokolovsky V, Kaldenhoff R, Ricci M, Russo VEA (1995) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Newsl* 37:41–43
- Sorger PK, Pelham HR (1988) Yeast heat shock factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54:855–864
- Sorger PK, Lewis MJ, Pelham HR (1987) Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* 329:81–84
- Unnikrishnan I, Miller ST, Meinke M, LaPorte DC (2003) Multiple positive and negative elements involved in the regulation of expression of *GSY1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278:26450–26457
- Varela JC, Præckelt UM, Meacock PA, Planta RJ, Mager WH (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* *HSP12* gene is activated by the high-osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Mol Cell Biol* 15:6232–6245
- Viskupic E, Cao Y, Zhang W, Cheng C, DePaoli-Roach AA, Roach PJ (1992) Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning and production of fully functional protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267:25759–25763
- Vogel HJ (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol Genet Bull* 13:42–43