

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP

Instituto de Química de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

PCL-1, uma ciclina multifuncional envolvida na regulação do metabolismo do glicogênio, germinação, divisão celular e na resposta ao estresse por cálcio em Neurospora crassa

Thiago de Souza Candido

THIAGO DE SOUZA CANDIDO

PCL-1, uma ciclina multifuncional envolvida na regulação do metabolismo do glicogênio, germinação e divisão celular e na resposta ao estresse com cálcio em *Neurospora crassa*

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

Orientador: Prof. Dr. Maria Célia Bertolini

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Candido, Thiago de Souza
C217p PCL-1, uma ciclina multifuncional envolvida na
regulação do metabolismo do glicogênio, divisão celular e na
resposta ao estresse por cálcio em *Neurospora crassa* /
Thiago de Souza Candido. – Araraquara : [s.n.], 2016
108 f. : il.

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

1. Polissacarídeos. 2. Fosforilação. 3. *Neurospora crassa*.
4. Ciclo celular. 5. Glicogênio. I. Título.

THIAGO DE SOUZA CANDIDO

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

Araraquara, 15 de setembro de 2016.

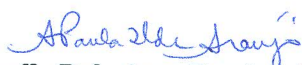
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. Maria Célia Bertolini (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



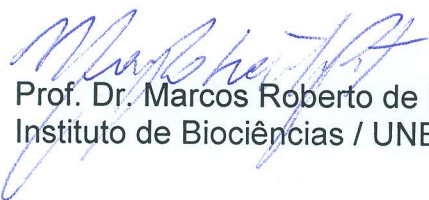
Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Profª. Drª. Ana Paula Ulian de Araújo
Instituto de Física / USP / São Carlos - SP



Profª. Drª. Maria Teresa Marques Novo Mansur
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCar / São Carlos - SP



Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes
Instituto de Biociências / UNESP / Botucatu - SP

DADOS CURRICULARES

Thiago de Souza Candido

1. Dados Pessoais

Nascimento: 16 de Julho de 1987

Nacionalidade: brasileiro

Naturalidade: Ribeirão Preto –SP

Estado Civil: solteiro

Filiação: Carlos Lindemberg Candido e Maria Tereza Coelho de Souza

Endereço Residencial: R. Oscar Schwarz, 126

Jardim Santa Rosa – Jaú-SP

CEP: 14209-522

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara

Rua Prof. Francisco Degni, 55

Quitandinha– Araraquara-SP

CEP: 14800-900

2. Formação Acadêmica

Doutorado em Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, concluído em agosto de 2016 (em curso).

Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia, Instituto de Química de Araraquara, UNESP, Araraquara, SP, concluído em julho de 2013.

Bacharelado em Ciências Biológicas, Ênfase Biomédica, Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, Araraquara, SP, concluído em dezembro de 2010.

3. Publicações

Candido, T. S., Gonçalves, R. D., Felício, A. P., Freitas, F. Z., Cupertino, F. B., De Carvalho A. C., Bertolini, M. C. (2014) A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation. *Biochem J.* **464**: 323-334.

Cupertino, F. B., Virgilio, S., Freitas, F. Z., Candido, T. S., Bertolini, M. C. (2015) Regulation of glycogen metabolism by the CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins in *Neurospora crassa*. The role of CRE-1 as the central transcriptional regulator. *Fungal Genet. Biol.* **77**: 82-94.

4. Trabalhos apresentados em congressos nacionais

Candido, T. S., Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. The ORF NCU08772 encodes a putative cyclin involved in germination and glycogen accumulation in *Neurospora crassa*. 43^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu, PR, 2014.

Gonçalves, R. D., Candido, T. S., Bertolini, M. C. Functional characterization of the SNF1 protein in *Neurospora crassa*. 43^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu, PR, 2014.

5. Trabalhos apresentados em congressos internacionais

Candido, T. S., Felício, A. P., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. Protein kinases affecting glycogen accumulation and likely regulating the glycogen synthase phosphorylation status in *Neurospora crassa*. 27^o Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, 2013.

Cupertino, F. B.; Virgilio, S.; Freitas, F. Z.; Candido, T. S. Bertolini, M. C. The transcriptional repressor CRE-1 regulates glycogen metabolism in *Neurospora crassa*. 27^o Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, 2013.

Virgilio, S.; Candido, T. S.; Bertolini, M. C. Glycogen metabolism is regulated by the circadian clock in *Neurospora crassa*. 27^o Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, 2013.

Candido, T. S., Cupertino, F. B., Imamura, K. B., Bertolini, M. C. The ORF NCU08772 encodes a putative multifunctional cyclin involved in germination, cell cycle regulation, and glycogen metabolism in *Neurospora crassa*. 28º Fungal Genetics Conference, Pacific Grove, CA, 2015.

6. Apresentação de seminário geral

Candido, T. S. Metabolismo de carboidratos de reserva e regulação proteica pós-traducional em *Neurospora crassa*. Seminário Geral no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Instituto de química, UNESP, Araraquara, SP, 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese à minha mãe, que o tempo todo me proporcionou suporte, carinho, atenção e um amor incondicional para eu ter forças para desenvolver esta longa jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado saúde e determinação para cumprir esta jornada.

Ao Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP, por ter aberto as portas para a realização do curso de doutorado.

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

À Prof. Dr. Maria Célia Bertolini, minha orientadora pela amizade, pelos conhecimentos transmitidos e pela confiança depositada em meu trabalho.

Aos meus amigos de laboratório Fer Cuper, Fer Zanolli, Eliane, Flávia, Carol, Stela, Susi, Henrique, Messias, Vivia, Erick, Kely e Pablo pelos conhecimentos e conselhos transmitidos, pelos cafés da tarde juntos e pelas ótimas lembranças e risadas.

Ao Dr. Rodrigo, pelo suporte técnico e científico que contribuiu muito para meu crescimento pessoal e acadêmico, pelo companheirismo e pela enorme amizade criada nesses seis anos de convivência.

Ao Tarcísio, pela grande ajuda técnica neste período que foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho e aos demais técnicos do Departamento de Bioquímica.

À minha namorada Mariana pelo grande amor, apoio e companheirismo durante esta jornada de muito trabalho e desafios.

Obrigado!

RESUMO

O fungo *Neurospora crassa* tem sido amplamente usado como um organismo modelo para os aspectos fundamentais da biologia dos eucariotos. Neste trabalho, foi investigado o papel funcional de uma ciclina de *N. crassa* (PCL-1), codificada pela ORF NCU08772 e ortóloga a Pcl10 de *Saccharomyces cerevisiae*. Na levedura, a proteína Pcl10, em conjunto com a proteína quinase dependente de ciclina Pho85, fosforila a enzima glicogênio sintase, a enzima regulatória da síntese de glicogênio. A fosforilação resulta na inativação da enzima e, portanto, em diminuição do acúmulo de glicogênio. A linhagem $\Delta pcl-1$ de *N. crassa* apresentou um atraso na germinação dos conídios e um retardo na progressão do ciclo celular quando comparado com a linhagem selvagem, sugerindo que esta ciclina pode regular o desenvolvimento e a divisão celular. Além disto, a linhagem nocauteada acumulou níveis mais elevados de glicogênio que a linhagem selvagem indicando o papel na regulação do metabolismo deste carboidrato. A fosforilação da enzima glicogênio sintase de *N. crassa* (GSN) foi analisada na linhagem nocaute através de análises de atividade enzimática, e os resultados mostraram que a GSN apresentou baixo índice de fosforilação, portanto alta atividade durante o crescimento, um resultado que pode explicar o alto acúmulo de glicogênio observado. Este resultado foi confirmado por análise de 2D-PAGE seguida por *western blot*, utilizando anticorpos anti-GSN. GSN apresentou na linhagem mutante isoformas menos fosforiladas que a enzima presente na linhagem selvagem. As proteínas recombinantes PHO85, PCL-1 foram utilizadas em ensaios de fosforilação *in vitro* da enzima GSN e os resultados mostraram que a enzima GSN foi fosforilada pelo complexo PHO85/PCL-1 no sítio putativo Ser636. O papel da ciclina na resposta ao cálcio foi investigado, e os resultados mostraram que a linhagem $\Delta pcl-1$ mostrou uma resistência ao estresse provocado por altas concentrações de cálcio quando comparada com a linhagem selvagem. Análises de expressão gênica por RT-qPCR foram realizadas e a linhagem $\Delta pcl-1$ mostrou estar envolvida na regulação de genes do metabolismo do cálcio. Os resultados indicam que a proteína PCL1 de *N. crassa* pode ser uma ciclina multifuncional e pode estar envolvida na regulação de vários processos celulares essenciais dependendo do ambiente.

Palavras-chave: proteína quinase, ciclina, glicogênio, GSN, PHO85, PCL1.

ABSTRACT

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for the fundamental aspects of eukaryotes biology. This work investigated the functional role of a *N. crassa* cyclin (PCL-1), encoded by the ORF NCU08772, and orthologous to the *Saccharomyces cerevisiae* Pcl10 cyclin. In yeast, Pcl10 protein, together with the Pho85 cyclin-dependent protein kinase, phosphorylates the glycogen synthase enzyme, the regulatory enzyme in glycogen synthesis. Phosphorylation results in enzyme inactivation and therefore in decreased glycogen accumulation. The *N. crassa* $\Delta pcl-1$ strain showed a delay in conidia germination and in the progression of the cell cycle compared to the wild-type strain, suggesting that the cyclin may regulate development and cell division. Furthermore, the mutant strain accumulated higher glycogen levels than wild-type strain indicating its role in the regulation of the carbohydrate metabolism. The phosphorylation rate of the *N. crassa* glycogen synthase (GSN) was analyzed in the mutant strain by enzymatic activity assays, and the results showed that GSN was less phosphorylated during growth; therefore, high activity, and this result may explain the high glycogen accumulation observed in the mutant strain. This result was confirmed by 2D-PAGE gels followed by western blot using anti-GSN antibodies. The GSN isoforms presented in the mutant strain were less phosphorylated than the enzyme present in the wild-type strain. The recombinant proteins PHO85 and PCL-1 were used in *in vitro* phosphorylation assays of GSN enzyme, and the results showed that the enzyme was phosphorylated by the PHO85/PCL-1 complex at the putative site Ser636. The role of the cyclin in the response to calcium was investigated, and the results showed that the $\Delta pcl-1$ strain is more resistant than the wild-type strain to the stress caused by high calcium concentration. Gene expression analysis by RT-qPCR was performed to analyze genes involved in calcium metabolism, and the $\Delta pcl-1$ strain showed to regulate the expression of some calcium metabolism genes. The results indicate that the *N. crassa* PCL1 cyclin may be multifunctional and may be involved in the regulation of several cellular processes depending on the environment.

Key-words: protein kinase, cyclin, glycogen, GSN, PHO85, PCL1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do fungo <i>Neurospora</i>	3
Figura 2 - Modelo esquemático do metabolismo do glicogênio no fungo <i>N. crassa</i> .	7
Figura 3 - Características dos sítios de regulação da Glicogênio sintase.	12
Figura 4 - Diagrama de multifuncionalidade da quinase Pho85.	16
Figura 5 - Relação das proteínas obtidas por mutagênese sítio-dirigida.	29
Figura 6 - Alinhamento das sequências das ciclinas de <i>S. cerevisiae</i> e a ciclina PCL-1 de <i>N. crassa</i> .	39
Figura 7 - Alinhamento das sequências das quinases dependentes de ciclina Pho85 de <i>S. cerevisiae</i> e PHO-1 de <i>N. crassa</i> .	40
Figura 8 - Concentração de glicogênio nas linhagens selvagem e mutante na ciclina ($\Delta pcl-1$).	42
Figura 9 - Atividade da enzima glicogênio sintase nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$.	43
Figura 10 - Identificação das isoformas fosforiladas da enzima GSN por <i>Western blot</i> .	44
Figura 11 - Análise da expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo do glicogênio nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$.	46
Figura 12 - Fosforilação in vitro da enzima GSN selvagem e mutantes em sítios de fosforilação pelo complexo PHO-1/PCL-1.	49
Figura 13 - Análise da germinação nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$.	52
Figura 14 - Análise da morfologia nuclear durante a germinação nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$.	54
Figura 15 - Análise do ciclo celular ao longo da germinação.	55
Figura 16 - Análise do crescimento das linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$ sob estresse com cálcio em 24 horas.	58
Figura 17 - Análise do crescimento das linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$ sob estresse com cálcio em 30 horas.	59
Figura 18 - Análise de expressão gênica dos genes <i>pmr-1</i> , <i>nca-2</i> e <i>nca-3</i> por RT-qPCR em condições de estresse de cálcio na linhagem $\Delta pcl-1$ e selvagem.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para os experimentos de RT-qPCR.	26
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem molecular.	28
Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para os experimentos de RT-qPCR	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

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

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. <i>Neurospora crassa</i> como organismo modelo de estudo	2
2. Glicogênio. Estrutura e metabolismo	5
3. Controle do metabolismo do glicogênio	7
4. Proteínas quinases e regulação da enzima glicogênio sintase por fosforilação reversível	8
4.1. Proteínas quinases	9
4.2. Regulação da enzima glicogênio sintase por fosforilação reversível	11
5. A quinase Pho85 e suas ciclinas parceiras	15
MATERIAIS E MÉTODOS	19
1. Linhagens utilizadas	20
2. Meios de cultivo	20
2.1. Meio de cultivo para <i>N. crassa</i>	20
2.1.1. Meio mínimo de Vogel (VM)	20
2.1.2. Meio <i>Synthetic Cross</i> (SC)	21
2.2. <i>Escherichia coli</i>	22
2.2.1. 2YT + 0,2% Glicose	22
2.2.2. Luria-Bertani (LB)	22
3. Obtenção de amostras miceliais durante o crescimento do fungo	22
4. Preparo do extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio	23
5. Ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase	23
6. Identificação de isoformas fosforiladas da enzima GSN	24
6.1. Extração de proteínas totais para a eletroforese bidimensional	24
6.2. Separação por eletroforese bidimensional	25
6.3. <i>Western blot</i>	25
7. Extração de RNA e análise da expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo do glicogênio	26
7.1. Extração de RNA total	27
7.2. PCR quantitativo	27
8. Clonagem dos genes <i>gsn</i> selvagem e purificação das proteínas obtidas	28
8.1. Clonagem dos cDNAs	28

8.2. Ensaios de produção das proteínas GSN selvagem e mutadas em diferentes sítios de fosforilação	29
8.3. Análise das proteínas recombinantes por <i>Western blot</i>	30
8.4. Purificação das proteínas GSN	30
9. Produção e purificação da proteína SUMO	31
10. Ensaios de fosforilação <i>in vitro</i>	31
11. Mini-extração de DNA plasmidial	32
12. Preparo e transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	33
13. Ensaios de germinação e morfologia nuclear	33
14. Ensaios de massa seca	33
15. Cruzamento das linhagens hH1- <i>sfgfp</i> e Δ <i>pcl-1</i> e análise da progressão do ciclo celular.	34
16. Ensaios de estresse com cálcio	34
16.1. Crescimento em meio sólido e líquido contendo CaCl_2	35
16.2. Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de cálcio	35
RESULTADOS	37
Parte 1	
1. Identificação da proteína PCL-1 de <i>N. crassa</i>	38
2. Determinação do conteúdo de glicogênio na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	41
3. Determinação da atividade da enzima glicogênio sintase na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	41
4. Identificação das isoformas fosforiladas da enzima GSN na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	43
5. Análise da expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicogênio na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	45
6. Fosforilação <i>in vitro</i> da enzima GSN pelo complexo PHO-1/PCL-1	46
Parte 2	
7. Análise da germinação na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	51
8. Análise da morfologia nuclear na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	53
9. Análise da progressão do ciclo celular na linhagem Δ <i>pcl-1</i>	53
Parte 3	
10. Análise do crescimento da linhagem Δ <i>pcl-1</i> em condições de estresse com cálcio	57
11. Análise da expressão dos genes <i>pmr-1</i> , <i>nca-2</i> e <i>nca-3</i> em condições de estresse	59

com cálcio na linhagem $\Delta pcl-1$.

DISCUSSÃO	62
REFERÊNCIAS	67
ANEXO 1	72
ANEXO 2	85

Introdução

1. *Neurospora crassa* como organismo modelo de estudo

Os fungos abrangem uma enorme diversidade de micro-organismos. Estima-se que exista cerca de 1,5 milhões de espécies, entre os fungos filamentosos, leveduras e basidiomicetos, sendo que menos de 5% destas espécies encontram-se descritas na literatura (HAWKSWORTH, 2001; MUELLER e SCHMIT, 2004). De grande importância biotecnológica nos ramos alimentício e farmacêutico, são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos, como enzimas e antibióticos. Além disso, também são fundamentais na decomposição da matéria orgânica e reciclagem de nutrientes da natureza (AZEVEDO, 1997). Os fungos também contribuem com uma enorme soma de conhecimento para o entendimento dos processos genéticos, bioquímicos e moleculares.

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

Neurospora crassa tem nutrição bastante simples e necessita de apenas uma única fonte de carbono, sais minerais e biotina (METZENBERG, 1979). Por ser de caráter heterotrófico, utiliza diferentes fontes de carbono, como glicose, manose, frutose, xilose, sacarose, maltose, celobiose e trealose. O nitrogênio é metabolizado na forma de amônia, que pode ser obtida de maneira direta ou indireta, através da transformação de nitritos, nitratos, aminoácidos ou catabolismo de proteínas e ácidos nucleicos. Tem seu crescimento ótimo em pH 5,4, mas é bastante tolerante e consegue se desenvolver numa faixa de pH variando entre 4,0 e 7,5 (METZENBERG, 1979). Trata-se de um aeróbio restrito, não patogênico, com um tempo de duplicação de aproximadamente 150 min. Tem um ciclo de vida haplóide durante o crescimento vegetativo, onde aparecem estruturas destinadas à propagação do fungo (macroconídios e microconídios) e diplóide durante a fase sexual de reprodução, quando ocorre a fusão de dois núcleos haplóides e a formação de núcleos zigóticos (METZENBERG, 1979) (Figura 1).

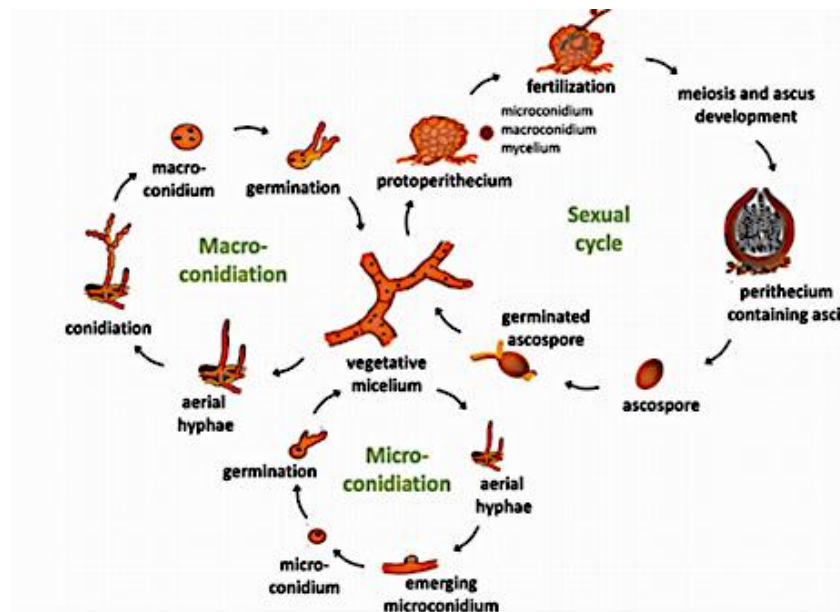


Figura 1. Ciclo de vida do fungo *Neurospora* (GYONGYOSI e KALDI, 2014).

Por se tratar de um fungo heterotático, *N. crassa* apresenta indivíduos sexualmente compatíveis de dois tipos, designados A e a. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e a maioria das 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 núcleo) ou “fêmea” (aceptora de núcleo) (FINCHAN et al., 1979). Resumidamente, a doação de núcleo ocorre por um macroconídeo, microconídeo, ou pedaço de hifa que entra em contato com a estrutura de reprodução sexual feminina denominada protoperitécio, a qual somente é formada em resposta à privação de nitrogênio (FINCHAN et al., 1979; METZENBERG, 1979).

Em 2003, sua sequência genômica foi elucidada, alavancando as pesquisas acerca dos fungos filamentosos (GALAGAN et al., 2003). *N. crassa* possui um genoma haplóide de aproximadamente 40 Mb, sendo maior que os genomas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (ambos com cerca de 12 Mb). Este genoma está organizado em 7 cromossomos, onde estão distribuídos 10.082 genes. Galagan et al. (2003) encontraram que somente 13% dos genes identificados codificavam proteínas conhecidas em bancos de dados; 46% dos genes codificavam proteínas hipotéticas, e 41% deles codificavam proteínas que não possuíam ortólogos funcionais conhecidos, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. Outra característica interessante revelada na ocasião foi que

57% do total das proteínas não correspondiam às proteínas de leveduras, enquanto que 14% delas eram ortólogas a proteínas de animais e plantas (GALAGAN et al., 2003). Além disso, este organismo compartilha um certo número de genes com uma variedade de grupos taxonômicos e o grau de complexidade do seu genoma se aproxima bastante ao de *Drosophila melanogaster* (DUNLAP et al., 2007), sugerindo que *N. crassa* se relacione melhor com organismos eucariotos superiores do que com leveduras.

A resolução do sequenciamento do genoma de *N. crassa* permitiu o aparecimento de uma série de abordagens experimentais na comunidade científica, que foram divididas em quatro grandes projetos: (1) a criação de um banco de linhagens mutantes (*knockout*), permitindo a caracterização de genes desconhecidos; (2) a anotação funcional desses genes; (3) a montagem de um perfil transcricional baseado na criação de *microarrays* de DNA, e (4) a geração de um mapa da SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) de alta densidade (DUNLAP et al., 2007). A inativação de genes considerados alvos pela comunidade científica, bem como a caracterização funcional dos produtos destes genes, somado às análises fenotípicas das linhagens mutantes, vem permitindo expandir o conhecimento do genoma funcional em fungos, por meio da comparação de importantes processos biológicos entre organismos modelos distintos.

Em *N. crassa*, dois processos de geração de linhagem mutantes estão bem descritas: a mutação por RIP (*Repeat Induced Point Mutation*) e a técnica de *knockout*. A inativação por RIP baseia-se na introdução de uma cópia extra do gene alvo no fungo. Os transformantes, contendo uma cópia adicional do gene, introduzem mutações pontuais na sequência genômica quando submetidos ao cruzamento seguido de meiose (SELKER, 1990). Esta técnica foi bastante utilizada na década passada e, embora seja um método útil e eficaz, demanda muito tempo para ser desenvolvido (NINOMIYA et al., 2004). Além disso, nem todas as sequências de DNA são suscetíveis ao RIP (SELKER, 1990). O procedimento de *knockout* é mais rápido e baseia-se no mecanismo de recombinação homóloga, onde ocorre a troca do gene alvo por outro a partir das extremidades de sequências homólogas (NINOMIYA et al., 2004). A recombinação homóloga é um fenômeno extremamente raro em *N. crassa*, porém frequente em *S. cerevisiae*. Na recombinação não-homóloga, o DNA exógeno é integrado em qualquer região do genoma, sendo um mecanismo conservado evolutivamente em humanos, plantas e insetos. Dentre as proteínas envolvidas nesse processo, destacam-se as proteínas Ku70 e Ku80, as quais formam um heterodímero que se liga nas extremidades do DNA, compondo um complexo de reparação das fitas (WALKER et al., 2001). As proteínas Ku70 e Ku80 são conservadas tanto em

leveduras quanto em humanos, e em *N. crassa*, seus homólogos foram nomeados como *mus-51* e *mus-52*, respectivamente. Utilizando destas observações, Ninomiya et al. (2004) desenvolveram um procedimento, baseado na técnica de PCR, para a inativação desses genes e, desta maneira, construir linhagens de *N. crassa* nas quais o processo de recombinação não-homóloga é bloqueado, favorecendo a recombinação homóloga. Esta técnica de *knockout* permitiu a construção de coleções de linhagens mutantes de *N. crassa*, nos genes codificadores de fatores de transcrição e proteínas quinases e, assim, alavancar a genômica funcional nestes campos. Atualmente, tais linhagens encontram-se depositadas no *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA), e estão disponíveis para a comunidade científica.

2. Glicogênio. Estrutura e metabolismo

Os micro-organismos possuem a capacidade de utilizar uma grande variedade de nutrientes com o propósito de adaptar-se continuamente às mudanças das condições ambientais. Muitos deles, incluindo leveduras e bactérias, acumulam glicogênio em períodos de abundância de nutrientes e degradam quando as células são submetidas a certos tipos de estresse, como por exemplo, escassez de nutrientes (HARRIS, 1997). O glicogênio é uma molécula ramificada, constituída por resíduos de glicose unidos covalentemente por ligações glicosídicas α -1,4 lineares e α -1,6 ramificadas. Devido à sua estrutura, este carboidrato de reserva é capaz de armazenar uma grande quantidade de resíduos de glicose no interior da célula sem elevar a osmolaridade intracelular. A ramificação da molécula do carboidrato também é importante porque permite aumentar a quantidade de extremidades não redutoras da molécula, ocasionando uma rápida mobilização de seus resíduos de glicose pela ação de enzimas envolvidas em sua degradação (MELÉNDEZ et al., 1997).

De uma forma geral, os processos de síntese e degradação do glicogênio em organismos eucariotos evolutivamente distantes são muito bem conservados, e envolvem as mesmas enzimas. A síntese do glicogênio se inicia pela formação do nucleotídeo doador de glicose UDP-glicose (UDPG) a partir de glicose-1-fosfato e do nucleotídeo UTP, uma reação catalisada pela enzima UDP-glicose pirofosforilase. A seguir, a síntese continua pela ação sequencial das enzimas glicogenina, glicogênio sintase e enzima ramificadora. A enzima glicogenina foi primeiramente caracterizada na levedura *S. cerevisiae* e sua ação catalítica consiste na formação de um oligossacarídeo iniciador constituído por 8 a 12 resíduos de glicose pela adição de resíduos glicosil provenientes da UDPG a três resíduos de tirosina da própria enzima

em uma reação de auto-glicosilação (MU et al., 1996; ROACH e SKURAT, 1997). É importante ressaltar que mesmo tendo a sua estrutura resolvida (GIBBONS et al., 2002), pouco se sabe sobre como os processos de auto-glicosilação e alongamento do oligossacarídeo iniciador do glicogênio são catalisados pela enzima glicogenina. O fungo *N. crassa* possui uma isoforma de glicogenina (GNN), a qual é constituída por 687 resíduos de aminoácidos (PAULA et al., 2005a). Esta proteína apresenta em sua região N-terminal seu domínio responsável por sua autoglicosilação, o qual é constituído por dois sítios de glicosilação (Tyr 196 e Tyr 198) (PAULA et al., 2005b). Em sua região C-terminal, esta proteína apresenta o domínio responsável por sua interação com a enzima glicogênio sintase (PAULA et al., 2005b). Os mecanismos regulatórios da expressão do gene que codifica a enzima glicogenina não são bem conhecidos. Entretanto, no fungo *N. crassa*, sua expressão é possivelmente controlada pela disponibilidade de nutrientes e estresse (PAULA et al. 2005a).

Após a etapa de iniciação da síntese, a enzima glicogênio sintase é a responsável pela polimerização do oligossacarídeo inicial ligado à molécula de glicogenina. Para isso, resíduos glicosil provenientes do UDPG são adicionados por meio de ligações glicosídicas α -1,4 à extremidade não redutora da cadeia polissacarídica em crescimento. Recentemente, a estrutura tridimensional da enzima glicogênio sintase de levedura foi resolvida, revelando que esta proteína atua na forma de um tetrâmero (BASKARAN et al., 2011). Finalmente, a enzima glicosil-(4–6)-transferase, enzima ramificadora, catalisa a transferência de uma cadeia com aproximadamente 6 ou 7 resíduos de glicose a partir de uma extremidade para um resíduo de glicose na mesma cadeia ou em outra distinta, formando as ligações ramificadas α -1,6 da molécula de glicogênio.

O processo de degradação do glicogênio envolve as enzimas glicogênio fosforilase e enzima desramificadora. A enzima glicogênio fosforilase é responsável pela clivagem de resíduos de glicose unidos por meio de ligações α -1,4 nas extremidades não redutoras do glicogênio, liberando glicose-1-fosfato que é convertido em glicose-6-fosfato pela ação da enzima fosfoglicomutase. Já a enzima desramificadora é responsável pelas funções de transferase e α -(1,6)-glicosidase na degradação do glicogênio. Inicialmente esta enzima transfere 4 a 5 resíduos de glicose a partir de uma ligação α -1,6 para uma extremidade não redutora de outra ramificação, assumindo uma função de transferase. Além disso, esta enzima hidroliza o resíduo de glicose no ponto de ramificação α -1,6, assumindo uma função de glicosidase. É importante ressaltar que esta enzima é energeticamente menos eficiente em relação à enzima glicogênio fosforilase pelo fato de requerer o consumo de ATP para a liberação de resíduos livres de glicose. Um modelo esquemático do metabolismo do glicogênio,



fosforilação reversível, esta enzima pode apresentar uma forma desfosforilada, que caracteriza sua forma ativa e um número variável de formas pouco ativas ou fosforiladas, as quais diferem em suas dependências pela glicose-6-fosfato, seu efetor alostérico (ROSELL-PEREZ et al., 1962; TÉLLEZ- IÑÓN et al., 1969).

As enzimas glicogênio sintase geralmente são conservadas nas suas regiões centrais enquanto que suas regiões N- e C-terminais, onde estão localizados seus sítios de fosforilação, são caracterizadas por variações nas sequências (ROACH, 1990; BAI et al., 1990; HARDY e ROACH, 1993). Uma vez fosforilada, esta enzima fica em sua forma inativa, a qual pode ser restaurada por alosterismo efetuado pela glicose-6-fosfato. Em *N. crassa*, a via de sinalização dependente de AMPc exerce um importante mecanismo de controle sobre a atividade desta enzima. Foi observado que linhagens mutantes do fungo apresentando atividade da enzima proteína quinase dependente de AMPc (PKA) exacerbada, mostraram alterações tanto no acúmulo de glicogênio, como na expressão do gene *gsn* codificador da enzima glicogênio sintase (*gsn*). Além disso, os estudos *in vitro* também apontaram que esta via de sinalização influencia a fosforilação da enzima glicogênio sintase do fungo (GSN) (FREITAS et al., 2010).

Do ponto de vista regulatório, as enzimas glicogênio sintase melhor estudadas são as de mamíferos e uma das isoformas da levedura *S. cerevisiae*. Em mamíferos vários cDNAs foram isolados incluindo de músculo e fígado humanos, músculos de coelho e rato. Nos micro-organismos, também foram isolados os cDNAs de *Dictiostelium discoideum* (WILLIAMSON et al., 1996), de *Neurospora crassa* (PAULA et al., 2002) e dos genes *GSY1* e *GSY2* de *S. cerevisiae* (FARKAS et al., 1990, 1991). Como consequência da era genômica, também existem vários genes que codificam as enzimas de bactérias e eucariotos inferiores depositados em bancos de dados. O alinhamento dessas proteínas permite, de um modo geral, observar a existência uma região central conservada, e as variações nas regiões N- e C-terminais, como mencionado anteriormente (PEDERSON et al., 2000). *N. crassa* contém apenas um gene (*gsn*) codificando a enzima GSN, a qual possui 66% e 67% de identidade com as proteínas Gsy1 e Gsy2 de *S. cerevisiae*, respectivamente, e 56% e 58% de identidade com a sintases de músculo de coelho e de músculo humano, respectivamente.

4. Proteínas quinases e regulação da enzima glicogênio sintase por fosforilação reversível

4.1. Proteínas quinases

Dentre as maneiras pelas quais as vias de sinalização são capazes de controlar as respostas biológicas em um organismo, a fosforilação reversível de proteínas, catalisada por diferentes proteínas quinases e fosfatases, pode ser considerada a principal. As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato da molécula de ATP e, em casos excepcionais de GTP, para resíduos de treonina, serina (quinase específica para serina/treonina) ou tirosina (quinase específica para tirosina). Essas enzimas são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. Nos humanos, a fosforilação destes resíduos de aminoácidos corresponde, respectivamente, a 86,4% em serinas, 11,8% em treoninas e 1,8% em tirosinas (OLSEN et al., 2006). As quinases podem existir nas formas ativa e inativa, as quais são reguladas por uma variedade de mecanismos incluindo fosforilação, modulação alostérica e interações proteína-proteína (JOHNSON, 2009).

A primeira demonstração de que a fosforilação atua como um mecanismo regulatório foi descrita com a ativação da glicogênio fosforilase da sua forma menos ativa (forma *b*) para sua forma ativa (forma *a*) na presença de ATP (FISCHER e KREBS, 1955). A glicogênio sintase foi a segunda enzima cujo controle por fosforilação foi descoberto e durante anos este foi considerado o principal mecanismo de regulação do metabolismo de glicogênio.

A conclusão do Projeto Genoma Humano permitiu reunir as proteínas quinases em duas categorias principais, segundo seus domínios catalíticos: as quinases típicas e as quinases atípicas. As quinases atípicas são aquelas que apresentam atividade quinase, mas não possuem similaridade com o domínio proteico quinase típico. Já as quinases típicas são aquelas que compartilham de um domínio quinase característico e estão classificadas em sete famílias: a) a família AGC, que inclui as quinases PKA, PKG e PKC; b) a família CAMK, que inclui as quinases reguladas por Ca^{2+} /calmodulina; c) a família CK1, que inclui a caseína quinase 1; d) a família CMGC, que inclui as quinases dependentes de ciclinas (CdKs), as quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) e a glicogênio sintase quinase 3 (GSK3); e) a família de quinases STE de leveduras; f) a família das tirosina quinases; g) e a família das quinases tipo tirosina quinases (MANNING et al., 2002). Dentre estas, as principais quinases que participam da regulação de inúmeras vias metabólicas na maioria dos organismos são as: PKAs, PKCs, MAPKs, CAMKs e CdKs.

As representantes desta vasta família de proteínas quinases típicas atuam de diferentes maneiras sobre os resíduos de aminoácidos. A quinase PKA altera as

atividades de proteínas-alvo fosforilando grupos específicos de serina e treonina. É ativada por concentrações de AMP cíclico (AMPC) e, por isso, é também conhecida como proteína quinase dependente do AMP cíclico (PKA). A PKA existe em todas as células animais e acredita-se que seja responsável pelos efeitos do AMP cíclico na maioria delas. Os substratos da PKA diferem nos diferentes tipos celulares, o que explica por que os efeitos do AMP cíclico variam tanto dependendo do tipo celular (ALBERTS et al., 2004).

O cálcio (Ca^{2+}) é um importante sinalizador celular e, por isso, sua concentração intracelular livre é estritamente regulada. Nos mamíferos, as células contêm um grande número de proteínas que se complexam ao cálcio com diferentes afinidades e especificidades. Um exemplo que proteína quinase que interage com o íon cálcio é a calmodulina (CaM), uma proteína ativada por cálcio, que atua em conjunto com diversas proteínas, incluindo a família de serina/treonina quinases CaMK (ALBERTS et al., 2004). Outra quinase que interage com o cálcio é a PKC. Esta proteína é uma das três principais Ser/Thr quinases e participa de eventos de transdução de sinal, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. A família PKC inclui 12 isoformas, as quais são produtos de diferentes genes e são distribuídas em vários tecidos, demonstrando diferenças de acordo com sua localização (ALBERTS et al., 2004). Por análise de homologia de sequências foram identificadas 25 proteínas possivelmente envolvidas com as vias de sinalização que utilizam o Ca^{2+} como mediador em *N. crassa*, isto indica que este fungo apresenta uma complexa maquinaria intracelular regulada por este mediador (BORKOVICH et al., 2004).

As MAPK são proteínas que respondem a estímulos extracelulares regulando várias atividades, tais como expressão gênica, mitose, diferenciação celular e apoptose. A partir da ativação advinda de um estímulo, a “cascata das MAPK” é ativada. Cada cascata é composta por três MAPKs, a MAP quinase quinase quinase (MKKK, MEKK ou MAP3K), a MAP quinase quinase (MKK, MEK, ou MAP2K) e a MAP quinase (MAPK), que são ativados em série. Uma MAP3K que é ativada a partir de estímulos extracelulares, fosforila a MAP2K no seu resíduo de serina e treonina, e esta MAP2K activa uma MAPK através da fosforilação em seus resíduos de treonina e tirosina (ALBERTS et al., 2004). A cascata MAPK transmite informações aos efetores, coordena as informações recebidas de outras vias de sinalização, amplifica os sinais, e permitem uma variedade de padrões de resposta. Elas respondem a diferentes estímulos por fosforilar componentes do citoplasma e fatores de transcrição nucleares, dependendo do contexto celular (COOB, 1999). O exemplo bem caracterizado em eucariotos de uma cascata MAPK esta na via de Hog1 de *S. cerevisiae*. Ssk2/22

(MAPKKK) ativa, fosforila Pbs2 (MAPKK) assim se tornando ativa e fosforilando Hog1 (MAPK) levando ao fenótipo de aumento da osmolaridade celular (BORKOVICH et al., 2004).

Dentre as proteínas quinases, as Cdks merecem destaque especial, pois constituem componentes centrais do controle do ciclo celular e são responsáveis por controlar outros mecanismos celulares. As Cdks são especificamente serina/treonina quinases e são ativadas e desativadas dentro das células sucessivamente, na medida em que o ciclo celular progride. Para que seus domínios quinase sejam ativados, é necessário que durante o ciclo celular elas se associem às suas ciclinas parceiras, as quais aparecem e desaparecem ao longo do ciclo celular (HUANG et al., 1998). Porém, a ativação das Cdks não depende apenas da ligação com suas ciclinas parceiras; é necessário também a fosforilação subsequente de um resíduo de treonina e a desfosforilação de um resíduo de tirosina na sua sequência polipeptídica (JOHNSON, 2009). Além da interação com suas parceiras e dos eventos de fosforilação reversível, a atividade das Cdks é regulada negativamente pela interação com subunidades inibitórias conhecidas como inibidores das Cdks ou CkIs (GOLIAS, et al., 2004). Porém as Cdks não estão envolvidas apenas com o ciclo celular, algumas delas são multifuncionais, onde dependendo da sua ciclina parceria ela exerce uma função específica, sendo que uma mesma Cdk pode estar envolvida em vários processos celulares, em *S. cerevisiae* uma das Cdks mais estudadas é a Pho85 (CARROLL e O'SHEA, 2002)

4.2. Regulação da enzima glicogênio sintase por fosforilação reversível

As enzimas glicogênio sintases, além de serem reguladas alostericamente pela G6P, possuem diversos sítios de fosforilação os quais funcionam como alvos para diferentes enzimas quinases. As enzimas melhor caracterizadas em relação aos sítios de fosforilação são as sintases de músculo de coelho e de *S. cerevisiae* (Figura 3). A enzima de músculo de coelho possui nove sítios de fosforilação, sendo dois N-terminais e sete C-terminais, designados de 1a, 1b, 2, 2a, 3a, 3b, 3c, 4 e 5 (ROACH, 1990). Enquanto os sítios 2 e 2a (Ser⁷ e Ser¹⁰) encontram-se na extremidade N-terminal da molécula, a região C-terminal abriga um importante domínio regulatório contendo os sítios de fosforilação restantes 3a, 3b, 3c, 4, 5, 1 e 1a (Ser640, Ser644, Ser648, Ser652, Ser656, Ser697 e Ser710). A fosforilação de alguns sítios ocorre de maneira hierárquica em ambas as extremidades da molécula. O sítio 2a somente é fosforilado pela caseína quinase I (CKI) após a formação do sítio de reconhecimento -

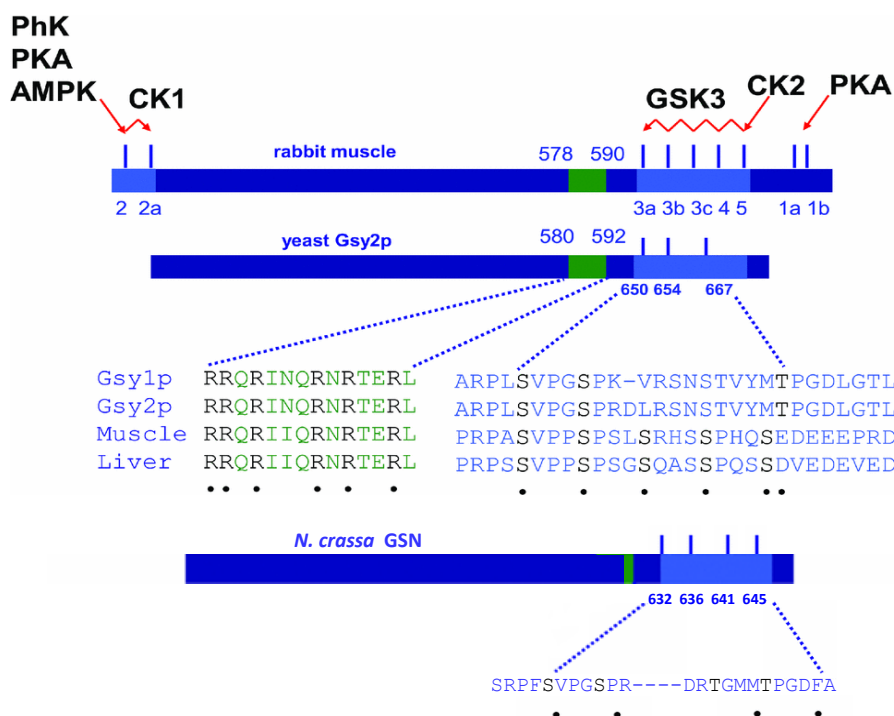


Figura 3. Características dos sítios de regulação da Glicogênio sintase. Acima estão representados a arquitetura geral da GS de mamíferos (*Muscle* e *Liver*) e de levedura (*Gsy1* e *Gsy2*), onde está demonstrado dois pontos de regulação, em verde estão os polos ricos em arginina (sítio de ligação de G6P) e em azul claro estão as serinas e treoninas fosforiladas conservadas entre as diferentes enzimas. (ROACH et al., 2012, com modificações).

S(P)-XX-S- (FLOTOW et al., 1990), o qual é dado pela fosforilação prévia do sítio 2 por diferentes proteínas quinases. Na região C-terminal, a enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) fosforila sequencialmente 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). Os sítios 2, 2a, 3a e 3b são os que mais contribuem para inativação da enzima por mecanismos de fosforilação enquanto que os sítios 3a e 3b podem ser fosforilados por mecanismos independentes da fosforilação prévia do sítio 5, sem a participação da dupla GSK3/CKII (SKURAT et al., 1994).

Comparado à enzima de músculo de coelho, a isoforma predominante de *S. cerevisiae* (*Gsy2*) apresenta apenas os sítios C-terminais 3a, 3b e 4 (Ser⁶⁵⁰, Ser⁶⁵⁴ e Thr⁶⁶⁷), sendo conservados somente os sítios 3a e 3b (HARDY e ROACH, 1993). A proteína Pho85 foi identificada como sendo uma das quinases que controlam diretamente a atividade *Gsy2* em *S. cerevisiae*, tal que mutantes no gene *PHO85* apresentam uma alta atividade glicogênio sintase, acompanhada de um hiperacúmulo do carboidrato. (TIMBLIN et al., 1996). A Pho85 é uma quinase pertencente à família das proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK – Cyclin Dependent Kinase). As proteínas CDKs apresentam múltiplas funções celulares e necessitam estar ligadas a

uma ciclina parceira, que as direcionam aos alvos a serem fosforilados. Em *S. cerevisiae*, as ciclinas Pcl8 e Pcl10 foram mostradas como sendo as proteínas parceiras da Pho85, tornando-a específica para atuar sobre o metabolismo do glicogênio. HUANG et al. (1998) demonstraram que o complexo quinase Pcl10-Pho85 interage e fosforila a proteínas Gsy2. A deleção dos genes *PCL8* e *PCL10*, bem como do gene *PHO85*, levaram a uma hiperativação da enzima Gsy2 na linhagem mutante, a qual foi acompanhada de um hiperacúmulo de glicogênio (HUANG et al., 1998).

Além das ciclinas Pcl8 e Pcl10, também foi mostrado que as ciclinas Pcl6 e Pcl7 estão envolvidas no metabolismo de glicogênio (WILSON et al., 2005). A proteína quinase Psk1 também mostrou exercer uma regulação direta na atividade Gsy2. Em *S. cerevisiae*, a proteína Psk1 é responsável pela regulação da síntese de proteínas durante o processo de tradução e também atua regulando o metabolismo de glicogênio e trealose (RUTTER et al., 2002). O duplo mutante *psk1/psk2* de *S. cerevisiae* acumula 3 a 4 vezes mais glicogênio e trealose comparado à linhagem selvagem. Além disso, esta linhagem mutante ainda apresenta a atividade Gsy2 aumentada e a proteína Psk2 mostrou fosforilar diretamente a enzima Gsy2 *in vitro* (RUTTER et al., 2002).

Além das quinases mencionadas até o momento, existem outras que também demonstraram estar envolvidas no processo fosforilação reversível da glicogênio sintase (GS) em *S. cerevisiae*, mas de uma maneira indireta. Um exemplo é a proteína PKA (HARDY e ROACH, 1993). Quando a via PKA está constitutivamente ativa na levedura, a expressão da enzima Gsy2 se apresenta muito baixa e o acúmulo de glicogênio não ocorre por que a enzima se apresenta altamente fosforilada. Porém, o mecanismo pela qual a PKA regula a fosforilação de Gsy2 não está totalmente elucidado (WILSON et al., 2010). Outra proteínas quinase que atua de maneira indireta na fosforilação da Gsy2 é a Snf1, uma proteína ortóloga à quinase dependente de AMP (AMPK) de mamíferos (CARLING et al., 1994), e que é requerida para a expressão de genes que codificam enzimas necessárias para o metabolismo de fonte de carbono alternativas, tais como glicerol e galactose. Esta quinase mostrou regular de maneira indireta e positiva o metabolismo do glicogênio, provavelmente devido à regulação do estado de fosforilação da isoforma Gsy2 (THOMPSON-JAEGER, 1991), uma vez que células mutantes *snf1*, as quais se caracterizam por não acumular glicogênio, quando complementadas com a forma truncada na extremidade C-terminal da enzima Gsy2 são capazes de restaurar o fenótipo para acúmulo de glicogênio (HARDY et al., 1994). Ainda, linhagens duplo-mutante *snf1 pho85* mostraram-se capazes de suprimir o acúmulo de glicogênio defectivo dos mutantes *snf1*, indicando que Snf1 e Pho85 atuam de maneira antagônica com relação ao acúmulo do

carboidrato na levedura. (WANG et al., 2001). Estudos de epistasia mostraram que estas quinases podem fazer parte de uma mesma via de sinalização, onde a proteína Snf1 estaria regulando negativamente a atividade quinase da proteína Pho85 dentro desta mesma via ou então, em outra via distinta. No entanto, células de levedura triplos mutantes *snf1 pcl8 pcl10* mostraram-se capazes de recuperar a atividade Gsy2 sem, contudo, restaurar o acúmulo de glicogênio, sugerindo outras maneiras de controle da atividade exercida pela quinase Snf1, independentes da Pho85 (HUANG et al., 1998).

O fungo *N. crassa*, possui apenas os sítios C-terminais 3a, 3b, 4 e 5 da enzima de músculo de coelho conservados na GSN, que correspondem aos resíduos Ser⁶³² (3a), Ser⁶³⁶ (3b), Tyr⁶⁴¹ (4) e Tyr⁶⁴⁵ (5) (PAULA et al., 2002). Mutações sítio-dirigidas nestes resíduos de forma única, dupla, tripla ou nos quatro sítios, mostraram que a proteína ainda é capaz de ser fosforilada *in vitro* (BARBOSA, 2007), o que sugeriu que sítios de fosforilação adicionais podem existir. Ensaio de fosforilação utilizando extratos celulares de linhagens de *N. crassa* apresentando atividade adenilato ciclase deficiente (mutantes *cr-1* ou *mcb*) demonstraram que a fosforilação da GSN é dependente em grande parte da presença de AMPc, embora outros mecanismos de fosforilação independentes de AMPc também devam ocorrer (PAULA et al., 2002; FREITAS et al., 2010).

Com a finalização do sequenciamento do genoma de *N. crassa* (GALAGAN et al., 2003), uma coleção de linhagens mutantes contendo genes que codificam proteínas quinases individualmente nocauteados foram construídas e disponibilizadas para a comunidade científica através do *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Esta coleção de linhagens compreende mutantes em proteínas de diferentes famílias de proteínas quinases e foi adquirida pelo nosso laboratório. Um estudo sistemático de *screening* foi realizado em nosso laboratório com o objetivo de identificar proteínas quinases possivelmente envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio. Várias linhagens mutantes apresentaram alterações nos perfis de acúmulo de glicogênio quando analisadas na condição normal de temperatura de crescimento e em uma condição de estresse, tal como choque térmico. A atividade glicogênio sintase foi quantificada nas linhagens mutantes e através da relação -/+G6P algumas proteínas quinases foram identificadas como prováveis proteínas regulatórias quando comparadas à linhagem selvagem (CANDIDO et al., 2014). Dentre as proteínas quinases identificadas algumas são ortólogos funcionais de proteínas funcionalmente caracterizadas em outros organismos, tais como a proteína PHO-1 (codificada pela ORF NCU07580) e a proteína ATG-1 (ORF NCU000188). As demais ainda não foram funcionalmente caracterizadas em outros organismos. Estas

linhagens mutantes se tornaram um material interessante para o início dos estudos acerca dos mecanismos regulatórios de controle pós-traducional em *N. crassa*, ao qual permitiu o desenvolvimento deste trabalho.

5. A quinase Pho85 e suas ciclinas parceiras

Como dito anteriormente, a Pho85 é uma importante proteína quinase devido a sua alta versatilidade, a qual é determinada segundo a sua ciclina parceira, as quais são denominadas Pcls (Pho85 cyclins). A enzima da levedura *S. cerevisiae* é a melhor estudada até o momento. Esta proteína foi inicialmente caracterizada por possuir homologia à Cdk Cdc28 (TOH-E et al., 1988), a qual é uma Cdk de uma família altamente conservada cujos membros estão envolvidos na progressão do ciclo celular em todos os eucariotos (NASMYTH, 1993). A homologia entre as Cdk Cdc28 e Pho85 deve-se principalmente ao fato de ambas possuírem o motif PSTAIRE (aminoácidos EGTPSTAI**R**EISLMKE), o qual é altamente conservado entre as Cdk (MORGAN, 1997) e fica localizado próximo à região N-terminal da proteína (ESPINOZA et al., 1994). O motif PSTAIRE é importante para a função da proteína, especialmente o resíduo de aminoácido **Glu**, o qual se encontra envolvido na interação desta quinase com as suas ciclinas parceiras.

Outros dois domínios importantes estão presentes na Pho85 de *S. cerevisiae*, o domínio rico em glicina (aminoácidos 14-**G**NGTYATVY-22) e o domínio T-loop (aminoácidos 163-NTFSSE-168). Outra observação importante é que a fosforilação da Tyr¹⁸ na proteína da levedura contribui para a atividade da mesma, funcionando como um sinal na discriminação entre as ciclinas parceiras. Em contrapartida, os resíduos de aminoácidos do domínio T-loop, importantes na função de outras Cdk, não são importantes na Pho85 (NISHIZAWA et al., 1999).

As ciclinas parceiras da Pho85 foram inicialmente identificadas por homologia de sequência e ensaios de duplo-híbrido e estão agrupadas em duas subfamílias, com cinco membros em cada: a subfamília Pcl1,2, composta pelas ciclinas Pcl1, Pcl2, Pcl5, Pcl9, Clg1 e a subfamília Pho80, composta pelas ciclinas Pho80, Pcl6, Pcl7, Pcl8, Pcl10 (MEASDAY et al., 1997). As respostas celulares mediadas pela Pho85 da levedura incluem a manutenção da progressão do ciclo celular e a regulação do metabolismo de nutrientes como fosfato, fonte de carbono e nitrogênio. Na Figura 4 estão representadas as divisões das Pcls, segundo suas subfamílias e funções associadas (CARROLL; O'SHEA, 2002).

Devido às interações com suas diversas ciclinas parceiras, a Pho85 apresenta papel pleiotrópico (Figura 4), podendo estar envolvida em diversos eventos

celular, sendo a sua especificidade pelo substrato determinada pela associação com sua ciclina parceira (CARROL e O'SHEA, 2002). Um exemplo desta especificidade dependente da associação da quinase com suas proteínas parceiras é o envolvimento da Pho85 da levedura *S. cerevisiae* no metabolismo de glicogênio, quando associada às ciclinas Pcl8 e Pcl10 (TIMBLIN et al., 1996; HUANG et al., 1998).

Além das ciclinas que direcionam a quinase Pho85 para o controle do metabolismo do glicogênio, existem outras ciclinas que direcionam esta quinase para exercer a regulação de diferentes processos celulares. A ciclina Pho80 direciona para o metabolismo do fosfato e sobrevivência ao estresse com Ca^{2+} , enquanto que as ciclinas Pcl1, Pcl2, Pcl5, Pcl9 e Clg1 direcionam para regulação do processo de morfogênese, e as ciclinas Pho80, Pcl1 e Pcl2 para a regulação do ciclo celular (CARROLL e O'SHEA, 2002; HUANG et al., 2007).

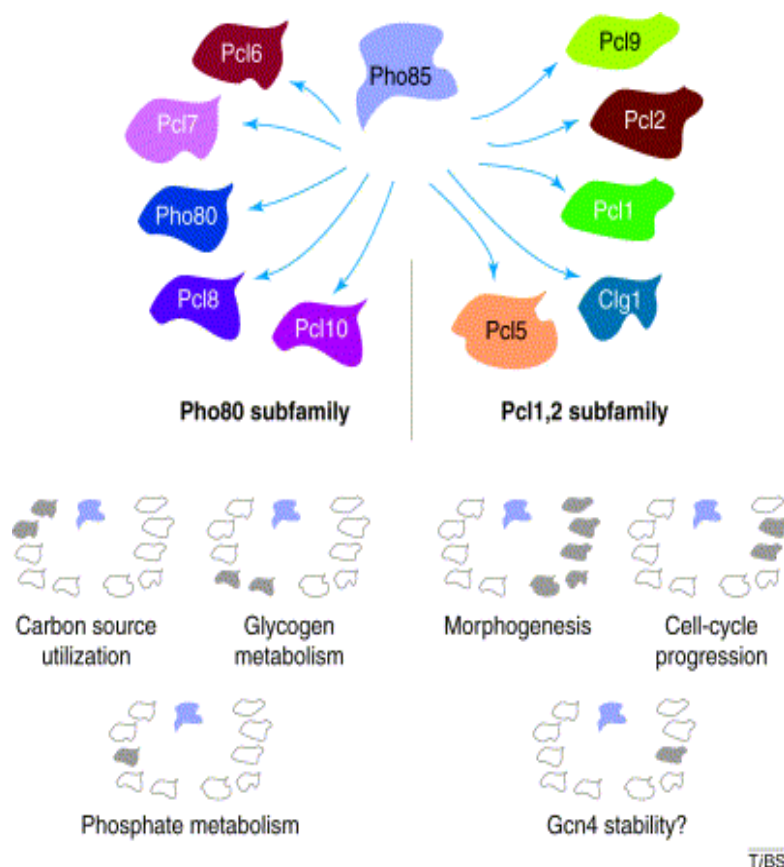


Figura 4. Diagrama de multifuncionalidade da quinase Pho85. A figura apresenta as ciclinas divididas em duas sub famílias, Pho80 e Pcl1,2. Cada pequeno gráfico indica a participação das ciclinas em sua função correlacionada (CARROLL e O'SHEA, 2002).

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo principal caracterizar funcionalmente a quinase dependente de ciclina PHO-1 junto com sua ciclina parceira PCL-1 como proteínas reguladoras do metabolismo de glicogênio no fungo *N. crassa*. Além disso, teve como objetivo atribuir um papel multifuncional à ciclina PCL-1, considerando que há poucas ciclinas no genoma de *N. crassa*, outras funções foram investigadas. De forma mais específica, os objetivos do trabalho foram:

- Tentar demonstrar o envolvimento da ciclina PCL-1 com o metabolismo de glicogênio através da quantificação de acúmulo de glicogênio, atividade glicogênio sintase (GSN), análises de expressão gênica, 2D-PAGE seguido de *Western blot* e fosforilação *in vitro* da GSN pela quinase PHO-1 e a ciclina parceira PCL-1.
- Tentar atribuir outras funções à ciclina PCL-1 demonstrando sua multifuncionalidade no fungo *N. crassa* através de análises em ensaios de germinação, ciclo celular e o envolvimento desta ciclina na resposta ao estresse provocado por altas concentrações de cálcio.

Materiais e Métodos

1. Linhagens de *Neurospora crassa*

Linhagem selvagem:

- FGSC#9718 (a, $\Delta mus-51::hyg^r$).

Linhagens mutantes:

- FGSC#18393 (a, NCU08772::hyg^r) e FGSC#18394 (A, NCU08772::hyg^r). A ORF nocauteada codifica para a proteína PCL-1, a proteína de *N. crassa* homóloga à proteína Pcl10p de *Saccharomyces cerevisiae*.

- FGSC#10178 (A, *his-3+::Pccg-1-hH1+-sgfp+*) nomeada *hH1-sgfp*. A ORF inserida no locus *his-3* codifica a histona H1 fusionada à proteína fluorescente GFP sob controle do promotor constitutivo *Pccg-1*.

- FGSC#18393 (A, NCU06687::hyg^r). A linhagem foi denominada Δgsn , a ORF nocauteada codifica a enzima glicogênio sintase (GSN) do fungo *N. crassa*.

- FGSC#4347 (a, *fluffy*). Linhagem utilizada para confirmação de *Mating type*.

Todas as linhagens foram obtidas junto ao FGSC (Fungal Genetics Stock Center), Manhattan, KS, USA, e tiveram seus nocautes genicos confirmados por PCR.

hH1-sgfp/ $\Delta pcl-1$. Linhagem produzida neste trabalho através do cruzamento das linhagens FGSC#18393 (a, NCU08772::hyg^r) e FGSC#10178 (A, *his-3+::Pccg-1-hH1+-sgfp+*).

Todas as linhagens foram cultivadas em meio mínimo de Vogel (VM, VOGEL, 1956). Este meio é quimicamente definido e foi acrescido de 2% de sacarose. Para a obtenção da linhagem *hH1-sgfp/ $\Delta pcl-1$* foi utilizado o meio de Synthetic Cross (SC) (WESTERGAARD e MITCHELL, 1947) no cruzamento. Este meio também é quimicamente definido e possui uma baixa quantidade de carboidratos propiciando a formação das estruturas de reprodução do fungo para a realização do cruzamento. Para a obtenção de conídios, as diferentes linhagens foram cultivadas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM sólido, acrescido de sacarose 2%, a 30 °C durante 3 dias. Em seguida, as culturas foram incubadas sob condições de luz e temperatura ambiente por mais 7 dias. Após esse período, os conídios das diferentes culturas foram coletados com água destilada estéril gelada, filtrados através de gaze estéril e o número de células/mL das suspensões conidiais foram determinados em câmara de Neubauer.

2. Meio de cultivo

2.1. Meio de cultivo para *N. crassa*

2.1.1. Meio mínimo de Vogel (VM)

O meio de cultivo utilizado para o crescimento, manutenção das linhagens do fungo *N. crassa* e para os experimentos, foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956), acrescido de sacarose 2% e biotina (0,1 mg/mL). Para as culturas realizadas em meio sólido, o meio VM foi acrescido de agar 2%.

O meio VM é um meio quimicamente definido, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 50x concentrada. Esta solução estoque é feita a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 mL de água destilada:

- 510 g de citrato de sódio.H₂O
- 250 g de KH₂PO₄
- 100 g de NH₄NO₃
- 10 g de MgSO₄.7H₂O
- 5 g de CaCl₂.2H₂O (pré-dissolvido em água destilada)
- 5 mL de solução de elementos traços

Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 1 L com água destilada, são adicionados 300 µL de clorofórmio como agente conservante e a solução foi armazenada a 4 °C.

A solução de elementos traços utilizada para o preparo do meio VM é obtida pela dissolução completa dos compostos citados a seguir, em 90 mL de água:

- 5,0 g de MgSO₄.7H₂O
- 5,0 g de ácido cítrico.H₂O
- 5,0 g de ZnSO₄.7H₂O
- 1,0 g de F(NH₄)₂.(SO₄)₂.6H₂O 0,25 g de CuSO₄.5H₂O
- 0,05 g de MnSO₄.H₂O
- 0,05 g de H₃BO₃
- 0,05 g de NaMoO₄.2H₂O

As linhagens foram mantidas em meio VM contendo o antibiótico higromicina, na concentração de 0,2 mg/mL e estocadas a -20 °C.

2.1.2 Meio *Synthetic Cross* (SC)

O meio de cultivo utilizado para o cruzamento das linhagens do fungo *N. crassa* foi o meio *Synthetic Cross* (SC) (WESTERGAARD e MITCHELL, 1947), acrescido de sacarose 0,5%, biotina (0,1 mg/mL) e agar 2%. O meio SC é um meio quimicamente definido, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 2x concentrada. Esta solução estoque é feita a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 3 L de água destilada:

- 6,0 g de KNO₃
- 4,2 g de K₂HPO₄

3,0 g de KH_2PO_4

3,0 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0,6 g de NaCl

0,6 mL de solução de elementos traços (a mesma solução do meio de cultura VM).

Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 3 L com água destilada, são adicionados 2 mL de clorofórmio como agente conservante e a solução foi armazenada a 4 °C.

2.2. *E. coli*

2.2.1. 2YT + 0,2% Glicose

1,6% triptona

1,0% extrato de levedura

0,5% NaCl

0,2% glicose

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

2.2.2. Luria-Bertani (LB)

1,0% Triptona

0,5% Extrato de Levedura

1,0% NaCl

3. Obtenção de amostras miceliais durante o crescimento do fungo

Para os experimentos de crescimento do fungo, uma suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^7 células/mL foi inoculada em 500 mL de meio VM líquido e incubada a 30°C/250 rpm. Amostras de 50 mL foram coletadas a cada 12 h totalizando 72 h de crescimento, os micélios foram coletados por filtração e as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para a realização das análises. Estas amostras foram utilizadas para a quantificação de glicogênio, quantificação da atividade glicogênio sintase e análise da expressão gênica.

Alguns experimentos foram realizados para analisar o crescimento celular do fungo através da quantificação da massa seca. Para isto, uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^7 células/mL) foi inoculada em 100 mL de meio VM líquido a 30°C, sob agitação constante de 250 rpm. Volumes de 20 mL foram removidos nos tempos de 12, 24, 36 e 48 h, as amostras foram filtradas e secas a 98°C por 16 h. Após este

período, as amostras foram pesadas.

4. Preparo do extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio

Para o preparo do extrato celular bruto, uma pequena quantidade de cada uma das amostras congeladas foi totalmente pulverizada em nitrogênio líquido, em gral de porcelana. Em seguida, aproximadamente 200 mg de cada uma das amostras pulverizadas foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, TLCK 2 mM, aprotinina e pepstatina, 1 µg/mL de cada) e homogeneizada em vortex. Os sobrenadantes foram isolados após centrifugação (10.000 x g/10 min/4°C), transferidos em tubos eppendorf limpos e usados para a determinação do conteúdo de glicogênio e de proteínas totais (HARTREE, 1972), utilizando BSA como padrão.

O conteúdo de glicogênio foi determinado nas linhagens selvagem e mutante do fungo, através da digestão do glicogênio com α -amilase e amiloglicosidase, após precipitação com etanol, de acordo com protocolo descrito por Hardy e Roach (1993). Para isto, as proteínas contidas em 100 µL de cada uma das amostras foram precipitadas com 25 µL de uma solução TCA 50% a 10.000 x 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 x g, 15 min, 4°C. Os precipitados contendo glicogênio foram dissolvidos em 400 µL de uma solução tampão (acetato de sódio 50 mM pH 5,2, CaCl₂ 5 mM) contendo 1 µL de cada uma das enzimas amiloglicosidase (30 mg/mL, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2, CaCl₂ 5 mM) e α -amilase (10 mg/mL, no mesmo tampão) e incubados a 37°C durante 12 h. Um volume de 12,5 µL de cada uma das amostras digeridas foi tomada para a determinação do conteúdo de glicose livre, utilizando o kit Glicose PAP Liquiform (Labtest) num comprimento de onda de 550 nm. O conteúdo de glicogênio das amostras foi expresso em µg glicogênio/mg de proteínas totais.

5. Ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase

As amostras para a realização do ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase (GS) foram as mesmas utilizadas para a quantificação de glicogênio diferindo no tampão utilizado. Para o preparo do extrato celular bruto, uma pequena quantidade de

cada um dos micélios congelados foi totalmente pulverizada em nitrogênio líquido, em gral de porcelana. Em seguida, aproximadamente 200 mg de cada uma das amostras foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de um tampão de lise gelado (HEPES 50 mM, pH 7,4, KCl 137 mM, glicerol 10% acrescido de inibidores de proteases PMSF 10 mM) e homogeneizada em vortex. As frações sobrenadantes foram isoladas após centrifugação (7.000 x g/10 min/4°C), recolhidas em tubos eppendorf limpos e usadas para a determinação da atividade GS e de proteínas totais (HARTREE, 1972), utilizando BSA como padrão.

A atividade GS foi dosada através do método de Thomas (1968), com modificações. A atividade foi medida pela incorporação de unidades glicosil a partir da UDP-[U-¹⁴C]-glicose (UDPG) a moléculas de glicogênio. O ensaio foi realizado na ausência e presença de 7,2 mM de glicose-6-fosfato (G6P), o qual constitui o ativador alostérico da enzima glicogênio sintase. Uma alíquota de 15 µL do extrato proteico bruto foi adicionado em um tubo eppendorf contendo 30 µL do “mix” de reação (Tris-HCl 50 mM, pH 7,8, UDPG 4,44 mM, glicogênio 0,67%, EDTA 2 mM, NaF 25 mM, 14C-UDPG, 1 µL 265 mCi/mmol). Quando presente, G6P foi adicionada na concentração final de 7,2 mM por reação. A mistura foi incubada a 30°C por 30 min, ao final do tempo, 35 µL da reação foi depositada em pedaços de papel de Whatman P81 (2 x 2 cm), e imediatamente mergulhados em solução de etanol 66% gelado, sob agitação. Três lavagens sucessivas em etanol 66% foram realizadas para a remoção de UDP-[U-¹⁴C]-glicose livre e os papéis foram secos à temperatura ambiente. Após secagem, a radioatividade incorporada ao glicogênio foi medida por cintilação líquida em um cintilador Beckman LS6500.

6. Identificação de isoformas fosforiladas da enzima GSN

A identificação foi realizada por fracionando as amostras proteicas através de eletroforese bidimensional seguida de *Western blot*.

6.1. Extração de proteínas totais para a eletroforese bidimensional

Para a obtenção das amostras utilizadas nos experimentos de eletroforese bidimensional, uma suspensão de conídios contendo aproximadamente 10⁷ células/mL foi inoculada em 100 mL de meio VM líquido e incubada a 30°C/250 rpm/24 h. Após esse período, os micélios foram coletados por filtração e as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Para o preparo do extrato celular bruto, uma pequena quantidade de cada uma das amostras congeladas foi

totalmente pulverizada em nitrogênio líquido, em gral de porcelana. Em seguida, aproximadamente 200 mg de cada amostra foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de um tampão de lise gelado (HEPES 50 mM pH 7,4; NaCl 137 mM; 10% glicerol) acrescido de inibidores de proteases (PMSF 100 mM; leupeptina 1 mM e pepstatina 1 mM) e dos inibidores de fosfatases (NaF 25 mM; EDTA 1 mM e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM) e homogeneizada em vortex. O rompimento celular foi finalizado com a utilização de *glass beads* (Sigma 1.180 μ) em 8 ciclos de homogeneização em vortex por 30 s e intervalos de 30 s em gelo. As frações sobrenadantes foram isoladas após centrifugação ($10.000 \times g/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$) e recolhidas em tubos eppendorf limpos. Uma amostra do extrato celular da linhagem selvagem foi submetida ao tratamento com *Lambda Protein Phosphatase* (New England Biolabs), seguindo as instruções do fabricante.

As proteínas contidas nas amostras foram precipitadas o kit 2-D *clean-UP* (Amersham Biosciences), segundo as instruções do fabricante, ressuspensas em tampão de amostra e quantificadas utilizando o kit 2-D Quant (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante.

6.2. Separação por eletroforese bidimensional

As amostras de proteínas totais foram separadas por 2D-PAGE usando o sistema de isoeletrofocalização *IPGphorTM* (GE Healthcare) e tiras *Immobiline DryStrip* (13 cm, linear, GE Healthcare) na faixa de pH 4-7, conforme especificações do fabricante. Um volume de solução proteica correspondente a 250 μg foi adicionado a 250 μL de solução contendo tampão de amostra (uréia 7 mM, tioreia 2 mM, CHAPS 4%, Tris-HCl 30 mM, azul de bromofenol 0,001%), 1,25 μL de *IPGbuffer* (GE Healthcare), 50 μL de *DeStreak Rehydration Solution* (GE Healthcare) e DTT 2,8 mg/mL. Para evitar evaporação foi adicionado *IPG Cover Fluid* (GE Healthcare) sobre cada tira. Depois de 24 h de rehidratação, a eletrofocalização foi conduzida com corrente de 50 μA por tira a 20°C por 100 V (10 h), 500 V (500 Vh), 1000 V (750 Vh), 8000 V (11325 Vh), 8000 V (5067 Vh) e 100 V (10 h), totalizando 19642 Vh.

6.3. Western blot

Ensaaios de *Western blot* foram realizados utilizando o anticorpo primário anti-glicogênio sintase de *N. crassa* (anti-GSN) produzido em coelho (disponível no laboratório) e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, conforme protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Para isto, as proteínas fracionadas após a eletroforese bidimensional foram transferidas para membranas de

nitrocelulose, com o auxílio do sistema de transferência TE 62 Transfer Unity (GE Healthcare), em tampão de transferência gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; glicina 150 mM e metanol 200 mL/L), durante 16 h a 100 V. As membranas foram bloqueadas com TBST 1x gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%), contendo 6% de leite em pó desnatado, sob suave agitação, a 4°C durante 4 h. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 5 min, à temperatura ambiente, com TBST 1x e em seguida, incubada com o anticorpo primário anti-GSN (1:1.000) em TBST 1x acrescido de 3% de leite em pó desnatado, durante 16 h a 4°C, sob suave agitação. A membrana foi lavada novamente 3 vezes, durante 5 min, à temperatura ambiente, com TBST 1x e em seguida, incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:10.000; Sigma) em TBST 1x acrescido de 3% de leite em pó desnatado, durante 4 h a 4°C, sob suave agitação. A membrana foi novamente lavada 3 vezes com TBST 1x e as proteínas foram reveladas em 10 mL de tampão de revelação para peroxidase (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; 1,5 µL de ácido p-cumárico; 50 µL de luminol 125 mM e 1,5 µL de peróxido de hidrogênio 100%).

7. Extração de RNA e análise da expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo do glicogênio

As amostras miceliais foram utilizadas para a extração do RNA total, os quais foram utilizados nas análises de expressão gênica por RT-qPCR. Foi analisada a expressão dos genes codificadores das enzimas da síntese do glicogênio (*gsn*, glicogênio sintase e *gbn*, enzima ramificadora) e das enzimas da degradação do glicogênio (*gpn*, glicogênio fosforilase, *gdn*, enzima desramificadora) utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 1).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para os experimentos de RT-qPCR.

Primer	Sequência (5'→3')	ORF
qGSN-F	TACCAAGCATCACCACCAACCTCT	NCU06687
qGSN-R	TGTCTGCGGCTCTTCTGGGTAAAT	NCU06687
qGPN-F	TGCCAATATCGAAATCACCCGCGA	NCU07027
qGPN-R	TCTCGATGGCCTCAAACACCTTGA	NCU07027
qRAMIF-F	TCTGCGATGCCGAGTTGT	NCU05429
qRAMIF-R	ACTCGTTGCCCTCGAAGT	NCU05429
qDESRAM-F	TCGGCGGTAATCAAGCCA	NCU00743
qDESRAM-R	TGAATTTGCCGGCTTCGT	NCU00743

<i>act-F</i>	CCATGTACCCTGGTCTCTCCGAC	NCU04173
<i>act-R</i>	CCACCGATCCAGACGGAGTACTTG	NCU04173

7.1. Extração de RNA total

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

7.2. RT-qPCR

As análises da expressão gênica dos genes anteriormente relacionados foram realizadas pela técnica de PCR em tempo real (RT-qPCR). Inicialmente, as amostras de RNA (10 µg) foram tratadas com DNase RQ1 RNase-Free (Promega®). Após essa primeira etapa, utilizou-se para a síntese do cDNA o kit SuperScript III First Strand (Invitrogen®) e 1 µL de oligo DT (50 µM). As análises foram realizadas no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems®) utilizando como fluoróforo SYBR® Green e como controle endógeno o gene *act* usando o método comparativo $\Delta\Delta CT$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). A eficiência das reações variou de 94 a 100%. Foram realizadas 4 réplicas biológicas para os experimentos e para cada experimento foram analisadas, no mínimo, 3 réplicas experimentais. tamanho da letra Os dados foram analisados com o software StepOne v2.1 (Applied Biosystems®).

8. Clonagem dos cDNAs *gsn* selvagem e mutantes e purificação das proteínas obtidas

8.1. Clonagem dos cDNAs

A proteína GSN recombinante foi produzida em *E. coli* na forma selvagem, não apresentando mutações e nas diferentes formas mutantes em diferentes sítios de fosforilação. Diferentes cDNAs mutados nos sítios de fosforilação da GSN foram previamente construídos no laboratório pelo mestrando Luis C. B. Barbosa. Para a clonagem dos cDNAs *gsn* selvagem e mutados, oligonucleotídeos apresentando os respectivos códons de iniciação e de terminação da tradução foram desenhados (Tabela 2) baseados na sequência nucleotídica do gene depositada no banco de dados de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) e adicionados de sítios para as enzimas de restrição para a posterior subclonagem dos mesmos no vetor de expressão pET-SUMO (gentilmente cedido pela Profa. Dr. Ana Paula U.de Araújo, IF, USP, São Carlos).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem molecular.

Gene	Pares de Oligonucleotídeos	Sítios de Restrição
<i>gsn</i>	GSN-BamHI-F: 5'-GGC GGATCC <u>ATG</u> GCCCACGACAACCG -3' GSN-EcoRI-R: 5'-CGCCG GAATTC <u>TTA</u> CTCGACTCCTGGAAT -3'	<i>EcoRI</i> e <i>BamHI</i>

Os códons de iniciação (AUG) e de término (UUA) da síntese proteica estão representados em negrito e sublinhados na sequência. Os sítios para as enzimas de restrição encontram-se em negrito na tabela.

As construções plasmidiais, utilizadas como fonte de DNA nas reações de PCR, foram pET-*gsn*, pET-*gsn*S632A, pET-*gsn*S636A, pET-*gsn*T641A, pET-*gsn*T645A e pET-*gsn*S632A/S626A/T641A/T645A (BARBOSA, 2007) (Figura 5). A reação de PCR foi realizada com a enzima Phusion Flash High-Fidelity (Thermo Scientific), segundo as recomendações do fabricante. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x (Tris-HCl 400 mM, pH 8,0, ácido acético glacial 200 mM, EDTA 10 mM), contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL. Os fragmentos de DNA foram removidos do gel, purificados utilizando o kit GeneClean (MP Biomedicals) e clonados no vetor pET-SUMO. Para isto, os fragmentos de DNA purificados e o vetor pET-SUMO vazio foram digeridos com as respectivas enzimas de restrição. Posteriormente, foram incubados com a enzima DNA ligase para reação de

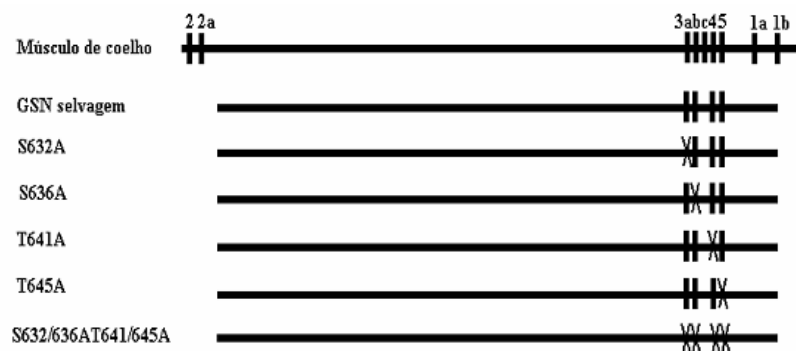


Figura 5. Relação das proteínas obtidas por mutagênese sítio-dirigida. Sítios conservados em relação a GS de músculo de coelho foram trocados para alanina por mutagênese sítio-dirigida no trabalho de Barbosa, 2007. O símbolo (|) indica presença de sítio e o símbolo (X) indica troca de Ser ou Thr para Ala (BARBOSA, 2007, com modificações).

ligação e os produtos das reações foram usados para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* DH10B. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura 2YT, contendo canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. As colônias resultantes foram inoculadas em meio 2YT contendo glicose e os mesmos antibióticos, os DNAs plasmidiais dos transformantes foram extraídos e analisados por digestão com endonucleases de restrição e sequenciados para confirmação da mutação. Culturas permanentes dos clones positivos carregando as construções plasmidiais foram preparadas e armazenadas à -80 °C.

8.2. Ensaios de produção das proteínas GSN selvagem e mutadas em diferentes sítios de fosforilação

As proteínas His-SUMO-GSN, His-SUMO-S632A, His-SUMO-S636A, His-SUMO-T642A, His-SUMO-T645A e His-SUMO-S632A/S636A/T641A/T645A foram produzidas na forma recombinante fusionadas à proteína SUMO e à cauda de poli-His na região N-terminal e purificadas através de cromatografia de afinidade. Para isto, as proteínas recombinantes foram induzidas na presença de IPTG, as produções foram purificadas e confirmadas por *Western blot*. A seguir, encontram-se descritas, de maneira detalhada, todas as etapas realizadas.

Os DNAs plasmidiais das construções pET-SUMO-*gsn*, pET-SUMO-*gsn*S632A, pET-SUMO-*gsn*S636A, pET-SUMO-*gsn*T641A, pET-SUMO-*gsn*T645A e pET-SUMO-*gsn*S632A/S636A/T641A/T645A foram utilizados para transformar células competentes da linhagem produtora *E. coli* BL21(DE3)pLys-S. Para cada construção um pré-inóculo fresco contendo células de *E. coli* foi preparado e inoculado em 1 L de meio LB acrescido

de canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. A cultura foi mantida a 30 °C/250 rpm até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6–0,8. Ao restante das culturas foi adicionado IPTG numa concentração final de 0,1 mM e a expressão das proteínas recombinantes foi induzida a 30 °C, 250 rpm, 4 h. As células foram coletadas e ressuspensas em 100 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 20 mM, glicerol 5%), acrescido de uma mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM, benzamidina 25 mM). As células foram submetidas a tratamento com lisozima (100 µg/mL) por 20 min em banho de gelo. O rompimento celular final foi finalizado em sonicador, após 10 ciclos de 30 s, com intervalos de 1 min em banho de gelo, os restos celulares foram removidos por centrifugação a 23.700 x *g*, 4 °C, 20 min e os sobrenadantes contendo as proteínas recombinantes na forma solúvel foram coletados e submetidos à cromatografia de afinidade conforme procedimento descrito a seguir.

8.3. Análise das proteínas recombinantes por *Western blot*

Com o objetivo de confirmar a produção e purificação das proteínas recombinantes, o ensaio de *Western blot* foi realizado, utilizando o anticorpo anti-His conjugado com fosfatase alcalina, conforme protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Para isto, os extratos proteicos foram fracionados por SDS-PAGE 12% e as proteínas contidas nos mesmos foram transferidas para membranas de nitrocelulose com o auxílio do sistema de transferência *Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (BioRad), em tampão de transferência gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicina 150 mM, de metanol 200 mL/L), durante 4 h, 100 V e 250 mA. As membranas foram bloqueadas com TBST 1 x gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%), contendo 6% de leite em pó desnatado, sob suave agitação, a 4 °C durante 16 h. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 5 min, à temperatura ambiente, com TBST 1 x e, em seguida, incubada com o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (1:10.000, Sigma) em TBST 1 x acrescido de 3% de leite em pó desnatado, durante 2 h em temperatura ambiente, sob suave agitação. As membranas foram novamente lavadas 3 x com TBST 1x e as proteínas foram reveladas em 10 mL de tampão bicarbonato (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,8, MgCl₂ 1 mM), adicionado de 100 µL de NBT (cloreto p-nitrozul de tetrazólio 30 mg/mL em DMF 70%, BioRad) e 100 µL de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina, 15 mg/mL em DMF, BioRad).

8.4. Purificação das proteínas GSN

Após a confirmação da produção das proteínas recombinantes por *Western blot*,

um pré-inóculo fresco contendo células de *E. coli* carregando a construção pET-SUMO-*gsn* selvagem e mutantes nos sítios de fosforilação, foi preparado e inoculado separadamente em 1 L de meio LB acrescido de canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. As culturas foram mantidas a 30 °C/250 rpm até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6–0,8. Em seguida, a produção de cada proteína recombinante foi induzida nas mesmas condições anteriores, as células de cada cultura foram coletadas e ressuspensas em 100 mL de tampão de lise gelado acrescido de uma mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM, DTT 1 mM, benzamidina 25 mM). As células foram submetidas a tratamento com lisozima (100 µg/mL) por 20 min em banho de gelo. O rompimento celular final foi finalizado em sonificador, após 10 ciclos de 30 s, com intervalos de 1 min em banho de gelo, os restos celulares foram removidos por centrifugação a 23.700 x *g*, 4 °C, 20 min e o sobrenadante contendo a proteína recombinante na forma solúvel foi coletado e submetido à cromatografia de afinidade.

Para isto, as proteínas recombinantes contidas no sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel His-Trap (1 mL) (GE Healthcare) no aparelho de purificação Akta Purifier (GE Healthcare). As proteínas fusionadas à proteína SUMO e à cauda de histidina foram eluídas em um gradiente linear de imidazol na concentração de 30 mM a 500 mM, preparado no mesmo tampão de homogeneização sem os detergentes. Os produtos purificados foram analisados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) e a eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 200 V durante 1 h, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

9. Produção e purificação da proteína SUMO

A purificação da proteína His::SUMO foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel His-Trap (GE Healthcare) no cromatógrafo Akta Purifier (GE Healthcare). A proteína foi produzida em grande escala (1 L de cultura partindo do pré-inóculo) e foi induzida com uma concentração final de 0,1 mM de IPTG por 37°C /250 rpm/4 h. Após a lise celular em tampão de lise gelado (Tris-HCl 50mM, pH7,4, NaCl 500 mM, Imidazol 20 mM acrescido de inibidores de proteases PMSF 1 mM, benzamidina 10 mM) a cromatografia de afinidade foi realizada com um gradiente linear de imidazol na concentração de 20 mM a 500 mM. Os produtos purificados foram analisados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12%. Esta proteína foi utilizada como controle dos experimentos de fosforilação *in vitro*.

10. Ensaios de fosforilação *in vitro*

As reações de fosforilação das proteínas foram realizadas em um volume final de reação de 25 μL , contendo 25 μg das proteínas alvo His-SUMO-GSN selvagem e mutantes nos sítios de fosforilação, 10 μg da proteína His-PHO-1 (CANDIDO, 2012) e 10 μg da proteína His-PCL-1 (CANDIDO, 2012) e 5 μL do “mix” ATP/Mg²⁺ (ATP 1 mM, MgCl₂ 25 mM, γ -³²P-dATP 0,5 μL com atividade específica 330 mCi/mmol, ~1.200 com/mmol). A reação foi incubada a 30°C por 30 min. Após este período, 200 μL da resina Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen), equilibrada em tampão de ligação (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 500 mM, imidazol 30mM) foi adicionada. A mistura foi incubada em gelo, sob leve agitação, por 1 h, e a resina foi recuperada por centrifugação a 16.000 x g por 1 min, lavada 3 vezes no mesmo tampão e finalmente ressuspensa em 25 μL de tampão de eluição (Tris 50 mM pH8,0, NaCl 500 mM, imidazol 500mM). Posteriormente, foi adicionado 5 μL de tampão de amostra SDS-PAGE 5x (Tris 375 mM pH 8,0, glicerol 60%, SDS 12%, azul de bromofenol 0,06%, 2-mercaptoetanol 15%) e a mistura foi incubada em banho de água por 5 min. As proteínas foram separadas em géis SDS-PAGE 12%, os géis foram secos a vácuo e expostos ao filme radiográfico T-MAT G/RA (Kodak). Conjuntamente, foi realizado outro gel sob as mesmas condições, mas sem γ -³²P-ATP, o qual foi corado com Coomassie blue Brilliant R-250.

11. Mini-extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de *boilling prep* descrito por Holmes e Quigley (1981). As colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% e incubados a 37 °C durante uma noite. Células das culturas bacterianas foram coletadas em tubos eppendorf de 1,5 mL e suspensas em 350 μL de solução STET (Tris 10 mM, pH 8,0, sacarose 8%, Triton X-100 0,5%, EDTA 50 mM) contendo lisozima 30 mg/mL. As suspensões celulares foram submetidas a choque térmico em banho-maria fervente durante 40 s e imediatamente resfriadas a -20 °C, 10 min. Os restos celulares foram isolados após centrifugação (16.100 x g, 10 min, 4 °C) e os ácidos nucléicos contidos no sobrenadante foram precipitados pela adição de 40 μL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 420 μL de isopropanol, a -20 °C, 15 min e coletados por centrifugação (16.100 x g, 15 min, 4 °C). Os precipitados foram dissolvidos em 100 μL de água estéril e as proteínas contidas na mistura foram extraídas pela adição de fenol saturado em tampão TE a 9.300 x g, 5 min, 4 °C. Os ácidos nucléicos contidos na fase aquosa foram novamente precipitados pela adição de 40 μL de acetato de amônio 7,5 M e 300 μL de etanol absoluto gelado a -20 °C, 15 min, coletados por centrifugação (16.100 x g, 15 min, 4 °C), lavados 2 vezes com 750 μL de uma solução de etanol 70% gelada, secos e dissolvidos em 20 μL de água estéril gelada.

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

Para o preparo das células competentes da linhagem DH10B de *E. coli*, células não competentes foram rejuvenescidas em 5 mL de meio 2YT e incubadas a 37 °C a 250 rpm, durante uma noite. Após a obtenção de células jovens, 500 µL deste crescimento foram inoculados em 100 mL de meio 2YT e a cultura incubada a 37 °C a 250 rpm até uma densidade ótica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) estéreis a 700 x g, 4 °C, 15 min. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de CaCl₂ 100 mM gelada e estéril e dissolvidos em 8 mL de CaCl₂ 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas para as reações de transformação. Para a transformação, aproximadamente 5 µL da reação de ligação de cada uma das construções foram incubados em gelo por 30 minutos com 100 µL de células competentes. Em seguida, as suspensões foram submetidas ao choque térmico pela transferência para um banho a 42 °C por 2 min. Após o choque térmico, as suspensões foram adicionadas de 400 µL de meio 2YT e novamente incubadas a 37 °C, 60 min. Após este período as células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

13. Ensaios de germinação e morfologia nuclear

Para a realização destes ensaios, uma suspensão de conídios (aproximadamente 10⁷ células/mL) foi inoculada em 50 mL de meio VM líquido a 30°C, sob agitação constante de 250 rpm. Uma alíquota das amostras foi removida nos tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h de crescimento e as células observadas a fresco sob lâmina e lamínula no microscópio Axio Imager A2 (Carl Zeiss), no aumento de 40x e, posteriormente, fotografadas utilizando a câmera AxioCamMRm (Carl Zeiss) e o software AxioVision4.8 (Carl Zeiss).

Para os ensaios de morfologia nuclear, a germinação dos conídios foi realizada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo uma lamínula depositada no centro, recoberta com 2 mL de meio VM líquido. Uma suspensão de conídios (10⁷ células/mL) foi adicionada ao meio de cultura e as placas foram incubadas a 30 °C durante 4, 6 e 8 h. Após cada tempo analisado, as lamínulas foram retiradas e lavadas com PBS 1x e tratadas com solução 1 µg/mL de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenil-indol) durante 15 min para a visualização de núcleos. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) acoplado à câmera Axio Cam MRM e as imagens processadas utilizando o software AxioVision.

14. Ensaios de massa seca

Para a realização destes ensaios, uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^7 células/mL) foi inoculada em 50 mL de meio VM líquido a 30 °C, sob agitação constante de 250 rpm. O micélio foi filtrado para a retirada do meio de cultura líquido e secos em estufa à 98°C por 16 h. A massa seca foi pesada em balança analítica na unidade gramas. As medidas de massa seca foram realizadas nos tempos nos tempos 12, 24, 36 e 48 h de crescimento para investigar se o retardo na germinação resulta em alterações no crescimento celular.

15. Cruzamento das linhagens hH1-*sgfp* e $\Delta pcl-1$ e análise da progressão do ciclo celular.

Foi realizado um cruzamento entre as linhagens $\Delta pcl-1$ e hH1-*sgfp*. A linhagem hH1-*sgfp* produz a histona H1 fusionada à GFP o que permite acompanhar a morfologia nuclear e, portanto, as fases do ciclo celular através de fluorescência. Utilizando esta metodologia é possível identificar núcleos em interfase e as diferentes fases do processo mitótico (ROCA et al., 2010). Para a realização do cruzamento foi utilizado o meio de cultura SC, foi inoculado 10^7 conídios da linhagem $\Delta pcl-1$ inicialmente, após incubação à 30 °C, 10^7 conídios da linhagem hH1-*sgfp* foi inoculado sobre o tapete micelial formado pela linhagem $\Delta pcl-1$. Após 15 dias à temperatura ambiente os protoperitécios foram recolhidos com água destilada estéril e selecionados em meio de cultura VM adicionado de 2% de agar contendo higromicina. Após o crescimento, os segregantes resistentes à higromicina foram observados no microscópio de fluorescência, as linhagens que apresentaram resistência à higromicina e núcleos fluorescentes foram selecionadas. A linhagem parental obtida apresentou o genótipo A, *his-3+::Pccg-1-hH1+-sgfp* NCU08772::*hyg^r*, seu *mating type* confirmado após cruzamento com linhagens *fluffy* e foi denominada hH1-*sgfp* $\Delta pcl-1$. Após a obtenção e confirmação da linhagem hH1-*sgfp* $\Delta pcl-1$, 10^7 conídios/mL da linhagem hH1-*sgfp* $\Delta pcl-1$ foram inoculados em 10 ml meio VM líquido a 30 °C e 250 rpm e amostras foram removidas a cada hora ao longo de 8 h. Alíquotas foram coletadas e analisadas por microscopia de fluorescência em um microscópio Axioimager A2 (Zeiss) acoplado a câmara AxioCam MRm. Foi realizada a captura de 6 imagens, totalizando a contagem de aproximada de 280 células em cada tempo. Os núcleos de cada célula foram categorizados em relação às diferentes fases da mitose e contados.

16. Ensaios de estresse com cálcio

Com o objetivo de investigar o papel da ciclina PCL-1 no metabolismo do Ca^{2+} as linhagens selvagem e *$\Delta pcl1$* foram crescidas em meio sólido e líquido contendo CaCl_2 em altas concentrações para a realização da análise do crescimento radial e da expressão gênica de genes envolvidos com o metabolismo do Ca^{2+} , como descrito a seguir.

16.1. Crescimento em meio sólido e líquido contendo CaCl_2

Para analisar o crescimento radial as linhagens foram inoculadas em placas de Petri contendo 30 mL de meio VM sólido acrescido de sacarose 2 %. Para tal, foram inoculados 10 μL de uma suspensão conidial (10^7 células/mL) e, em seguida, as placas foram incubadas a 30 °C por 24 e 30 h, na ausência e na presença de CaCl_2 , nas concentrações de 1, 5, 10, 50, 100, 200 e 300 mM. Após o crescimento, o diâmetro colonial foi medido em centímetros.

Para os experimentos de crescimento do fungo em meio líquido, uma suspensão de conídios das linhagens contendo aproximadamente 10^7 células/mL foi inoculada em 500 mL de meio VM e incubada a 30 °C, a 250 rpm por 24 h, na ausência e na presença de CaCl_2 nas concentrações de 200 e 300 mM. Os micélios foram coletados por filtração e as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para a realização das análises. Estas amostras foram utilizadas para a análise da expressão gênica.

16.2. Análise da expressão de genes relacionados ao metabolismo de cálcio

As amostras miceliais foram utilizadas para a extração do RNA total e foram utilizados nas análises de expressão gênica por RT-qPCR. Foi analisada a expressão dos genes *pmr-1*, *nca-2* e *nca-3*, aos quais, são responsáveis pela codificação de proteínas relacionadas ao metabolismo do Ca^{2+} , utilizando oligonucleotídeos específicos (Tabela 3). As metodologias utilizadas foram as mesmas descritas no item 7.

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para os experimentos de RT-qPCR.

Primer	Sequência (5'→3')	ORF
<i>nca-3-F</i>	AAGAAGAAGGAGGGAGAGG	NCU05154
<i>nca-3-R</i>	CCTTGAACATATGCACTCTCG	NCU05154
<i>nca-2-F</i>	GCCTGTTCCCTCCTAAGT	NCU04736
<i>nca-2-R</i>	TCTCCTGCTCCTCATTGAT	NCU04736
<i>pmr-1-F</i>	GCTCGGACTCCTTGATTTG	NCU03292
<i>pmr-1-R</i>	ACACCCATATGCCTCCTT	NCU03292
<i>tub-2-F</i>	CCATGTACCCTGGTCTCTCCGAC	NCU04054
<i>tub-2-R</i>	CCACCGATCCAGACGGAGTACTTG	NCU04054

Resultados

Parte I

Para facilitar a descrição dos resultados obtidos, a seção Resultados foi dividida em três partes: a que relata o papel da ciclina PCL-1 no metabolismo do glicogênio em *N. crassa* (Parte 1); a que descreve o envolvimento desta ciclina no controle da germinação e do ciclo celular (Parte 2); e os primeiros indícios do envolvimento desta ciclina na regulação do metabolismo do cálcio (Parte 3).

Resultados Parte I

1. Identificação da proteína PCL-1 de *N. crassa*

Para identificar a ciclina PCL-1 de *N. crassa*, inicialmente foi realizada uma busca em banco de dados, através de Blastp, utilizando as proteínas Pcl6, Pcl7, Pcl8 e Pcl10 de *S. cerevisiae* como *query*. Como resultado, apenas a ORF NCU08772 foi identificada com 29% de identidade em relação a Pcl6, 43% em relação a Pcl 7, 42% em relação a Pcl8 e 32% em relação a Pcl10. Um alinhamento de sequências foi realizado e foi observado uma quantidade maior de aminoácidos conservados na região C-terminal das ciclinas, região onde se encontra o domínio característico de ciclina (*cyclins domain*) (Figura 6). Em seguida, a sequência nucleotídica da ORF NCU08772 foi usada como *query* com o objetivo de identificar outras proteínas parálogas e, novamente, somente a ORF NCU08772 foi identificada. O produto da ORF foi, portanto, denominado como PCL-1, uma proteína homóloga às ciclinas de *S. cerevisiae*. Em levedura, estas ciclinas são denominadas Pcl (de *Pho85 cyclins*) devido às suas ações de direcionamento da proteína quinase Pho85 para um alvo específico. Na levedura *S. cerevisiae*, as ciclinas Pcl6, Pcl7, Pcl8 e Pcl10 direcionam a proteína quinase Pho85 para exercer a regulação do metabolismo do glicogênio e outros eventos celulares (CARROLL e O'SHEA, 2002). No genoma de *N. crassa* existem poucas ciclinas e Hong et al. (2013) identificaram apenas três relacionadas com o controle do ciclo celular e o ritmo circadiano. Neste trabalho, foi identificada apenas uma ciclina relacionada à proteína quinase ortóloga de Pho85 (denominada neste trabalho de PHO-1), a qual foi denominada de PCL-1 (de *PHO-1 Cyclin 1*) devido à sua função de associação com a proteína quinase PHO-1 e o número 1 devido ao fato de ser a primeira PCL identificada em *N. crassa*.

A linhagem contendo a ORF NCU08772 nocauteada foi adquirida junto ao banco de linhagens do Fungal Genetics Stock Center (Kansas, KS). O nocaute foi feito através da inserção do gene *hyg* por recombinação homóloga, portanto a linhagem não sintetiza a proteína PCL-1. A mutação foi confirmada por PCR com oligonucleotídeos específicos para a ORF.

```

Pc18      1  --MANDQDPNKS LINDALTRSMSEFYDDDDNDSDMCRANDEGEDVFDI PLKVGVSQSRN
Pc110     1  MDMTKNH-----TTDT-EEFDDGDIR-PVSLGIVDDYNASFEI PLKPKFLQSEN
PCL-1     1  -----
Pc16      1  -----MS-----
Pc17      1  -----ME-----

Pc18      59  FSEVNDVLDPLSSI HGPSKKVRFEQQKQQQQHQQLHNDFNNTDFNLKSPSSKMGVEQLIQ
Pc110     48  FSDLTSEWDQSRSNTPGL-----AEGK-----TEKAQPCGTTDSSKNRIHVEQLLE
PCL-1     1  -----MSPNPEHG-----
Pc16      3  -----IKG-----DSPSSTNA-----
Pc17      3  -----ISPSKKT-----

Pc18      119 SANEINDYLANNI DKVNSFNSELLSGSGKLPGRVKSDTAT-QGTGRLDMSNFALSD--T
Pc110     94  SANEMNNYLANNIENINNFOVGLLNGGKGLYSSMGDDSSACINGTNFSSTSNFELSD--D
PCL-1     9   ASAPTDPAAADAEQKSDSSAP-----ATPPPAPVPSADPKLFRQITQSHTGE
Pc16      14  SSSPKSTYSIQSDK-----ANLGSNGVDIR----TDNSQQ
Pc17      12  ---TSPI-----NIPGG-----

Pc18      176 ELNDNDDNYLIDPIANASSTTP---TVEHHGYSIDKALSTSDKEKIYTNKVNSNSQID
Pc110     152 ELEDTTGCTSS--IFD---KDL---FHQQNGLSIPRR-----RSPLFK-----
PCL-1     56  SDQDVDDIYKSPHAAALKLLSAGIETLVSTGDIPTPTPPRSPTIPHMRG-----
Pc16      46  DSNRRDILVVTRVASEETLESQSST--SSMG--IRP-----ES----SFNY-----
Pc17      21  ---NRDNI-----IGP-----HSH----SFKT-----

Pc18      232 TNNHSHESGNTTNNETDENESSEILDYIKFDS--FPYPP--SSAPNGEPPDLKVLSECE
Pc110     187 SPTASFEIGDADVVEEQDIDDSIFSECSSTIS--FDMGGLHISLPHDEED-----
PCL-1     106 -MDAEKQSIVRSSSEK--NLARLIQKKSATNSPRRPSPAPQRHP-----HPPPS
Pc16      85  -EDASNQARVEMNNRV--H-GSNMNTINKYYPVRFPKNNERQLSDTNN-LNEKVQGTHTV
Pc17      37  -DPFSS-----NN-----SSLSKISTNPSLESPESS--KSLDCS-----PVQAVKKS

Pc18      288 QENEKELRRISSILLDHYES-----IPKIPELSDDEALSKFRENIELLIQLSKKIN-
Pc110     236 QEK-TKSESENPHLHGIPV-----DVEVPHISVDEALANFKETIELLIKLSGNRK-
PCL-1     153 REG---HKQSQSIDGVQLRTPNPTPPPGLS-----SSDAKSA
Pc16      140 QSS---TQEDKILDGD---TSNSQVTPSLNIAAFPTDKLIKMLTALITKIIKSNDRATA
Pc17      78  LES---EAKIHSIDKE---TNEQTDVKILNIAAFPTDELILMISALNRIITANDETDD

Pc18      338 -----DNANTLAISS---EDPQKFVNEVMKNPPSLSFRDFIDRIQNKCMFGAVVYL
Pc110     285 -----CTGF---NIR---VEKKEYSNFYMKSKPTLSSADFLKRIQDKCEYQPTVYL
PCL-1     187 LEPYI---IVGENS--QPLNTQHSAITRKFYSLPPPISTIDYLLRIHQYCPMSTAVYL
Pc16      193 TNPSITQEIENGRCIALSDNEKKYLSPVIGERGKHVPOIGLDQYFORIQKYCPTINDVFL
Pc17      131 VSQQVS-----EETEDELLTPITAFYGNVPEIAVQYLERIQKYCPTINDIFL

Pc18      386 GAIYLLQLVFTTRDE-----
Pc110     330 VAIFLIDTIFTRDG-----
PCL-1     241 AASTYIHRALAI-----
Pc16      253 SLLVYEDRSKRCNSVTTTPKANTAKHESPSNESSLDKANRGADKMSACNSNENNENDDS
Pc17      180 SLLVYEDRSKKNYGHSE-----

```

Pcl18	401	-----MDGPIKLKAKIQEDQAHRTIISTIRIATKLLLEDFVHSYNYICKVFGISKRL
Pcl110	345	-----N-NILQLKLNQEFVHRMIIAAVRISTKLLLEDFVHSHEYFSKVCGISKRL
PCL-1	253	-----ERAIVTKNAHRLIAGIRVAMKALEDLSYPHSKFAKVGGVSETE
Pcl16	313	DDENTGVQRDSRPHQPMFVDSNTHRLIAGITVSTKFLSDEFYSNSRYSRVGGISLQE
Pcl17	198	-----RNGCAKQLFVMDSGNTHRLITGVITCTKFLSDEFYSNSRYAKVGGISLQE

Pcl18	452	LTKLEISFNASVNFGLMITCKLEKTLHLDDTRQALGNT-----
Pcl110	395	LTKLEISLLVCVNTKLMVSNRKAASKLLNELRSFCV-----
PCL-1	299	LARLEISFCFLVGFELRVDEEALRGQWEMLKSGVEAWEGVEHDFYGKREVITLRNPPPG

Figura 6. Alinhamento das sequências das ciclinas de *S. cerevisiae* e a ciclina PCL-1 de *N. crassa*. As sequências obtidas foram alinhadas com uso do programa BioEdit (algoritmo ClustalW) e a identificação dos aminoácidos conservados foi realizada com o programa Boxsahde. Em vermelho está identificada a região C-terminal, correspondente ao domínio ciclina (*cyclins domain*).

A proteína quinase dependente de ciclina PHO-1 foi previamente estudada em nosso laboratório. A ORF que sintetiza esta proteína foi identificada e mostrou-se conservada em relação à quinase Pho85 de *S. cerevisiae*. (Figura 7). Podemos observar no alinhamento de sequências que há um alto grau de conservação entre os aminoácidos das proteínas e, em especial, o domínio rico em glicina e o domínio PSTAIRE são conservados, domínios aos quais são essenciais para que a quinase realiza a fosforilação do seu alvo. Alguns estudos de caracterização funcional foram realizados anteriormente pelo nosso grupo, os quais mostraram que a proteína de *N. crassa* é a homóloga da proteína Pho85 de *S. cerevisiae* (AVACA, 2007).

Pho85	1	---MSSSSQFKQLEKLGNGTYATVYKGLNKTGTVYVALKEVKLDSEEGTPSTAIREISLM
PHO-1	1	MDGRKHPSSFQOLEKLGE GT YATVEFKGRNRQTGELVALKEIHL D SEEGTPSTAIREISLM

Pho85	58	KELKHENIVRLYDVIHTENKLTLVFEFMDNDLKKYMDSRTVANTRPGLELNLVKYFQWQL
PHO-1	61	KELKHENIVALHDVIHTENKLM L LVFEYMDGDLKKFMDINGER---GALKPHVIKSEMHQL

Pho85	118	LQGLAFCHENKILHRDLKPQNLLINKRGQLKLGD F GLARAFGIPVNTFSSEVVTLWYRAP
PHO-1	118	LKGIDFCHKNRVLHRDLKPQNLLINSKGA L KLGD F GLARAFGIPVNTFSNEVVTLWYRAP

Pho85	178	DVLMGSRTYSTSIDIWSCGCIIAEMITGKPLFPGTNDEEQIKLIFDIMGTPNESLWPSVT
PHO-1	178	DVLLGSRTYNTSIDIW S AGCIIAEMFTGRPLFPGT T NEDQIVRIERIMGTPERTWPGIT

Pho85	238	KLPKYNPNIQQRPPRDLRQVLQPH T KEPLDGNLMDFLHGLQLNPDMRLSAKQALHHPWF
PHO-1	238	SFPEYKPNWQMYATQSLSSILPQ-----IDRDGIDLLQRMQLRPEIRISAHDALQH H WF

Figura 7. Alinhamento das sequências das quinases dependentes de ciclina Pho85 de *S. cerevisiae* e PHO-1 de *N. crassa*. As sequências obtidas foram alinhadas com uso do programa BioEdit (algoritmo ClustalW) e a identificação dos aminoácidos conservados foi realizada com o programa Boxsahde. Em vermelho está identificado o domínio rico em glicina e em azul o domínio PSTAIRE.

Os genes *pcl-1* e *pho-1* de *N. crassa* foram subclonados anteriormente no vetor de expressão pET-28a, as proteínas recombinantes His-PCL-1 e His-PHO-1 foram produzidas em *E. coli* e as condições de purificação por cromatografia de afinidade utilizando colunas

carregadas com Ni^{2+} foram anteriormente estabelecidas (CANDIDO, 2012). Estas proteínas recombinantes foram utilizadas nas análises funcionais de fosforilação *in vitro* realizadas neste trabalho.

2. Determinação do conteúdo de glicogênio na linhagem $\Delta pcl-1$

Para investigar o envolvimento da proteína PCL-1 com o metabolismo do glicogênio a linhagem mutante $\Delta pcl-1$ e a linhagem selvagem foram crescidas em meio VM nas condições descritas em Materiais e Métodos. A quantificação de glicogênio presente nos extratos celulares foi feita por meio da determinação da glicose liberada pela digestão prévia com amiloglicosidase e α -amilase após precipitação com etanol (HARDY e ROACH, 1993). Os valores foram expressos em relação à quantidade de proteína (HARTREE, 1972) presente no extrato proteico. Essa relação foi dada em μg de glicogênio/mg de proteínas.

Os resultados obtidos mostraram que a linhagem selvagem apresentou um aumento na quantidade de glicogênio acumulado ao longo do tempo, com valores máximos nos tempos de 24 e 36 h e uma redução no acúmulo de glicogênio ao longo do tempo (Figura 8). Este resultado comprovou resultados anteriores, obtidos no laboratório, em relação à variação no conteúdo de glicogênio ao longo do tempo, com um máximo ao redor de 24 h (PAULA et al., 2002). Comparativamente, a linhagem mutante na ciclina ($\Delta pcl-1$) apresentou valores aumentados no conteúdo de glicogênio durante todos os tempos, alcançando o seu máximo em 36 h e atingindo o dobro do valor apresentado neste mesmo tempo pela linhagem selvagem, como demonstrado na Figura 8.

A deleção do gene que codifica esta ciclina levou a um hiperacúmulo de glicogênio no fungo *N. crassa*. Este resultado foi muito importante em nosso trabalho, pois confirmou que a ciclina, provavelmente, seja a proteína parceira da PHO-1 na regulação do metabolismo de glicogênio, assim como ocorre na levedura *S. cerevisiae* com a deleção dos genes das ciclina homólogas Pcl6, Pcl7, Pcl8 e Pcl10 (HUANG et al., 1998; WILSON et al., 1999; WILSON et al., 2005).

3. Determinação da atividade da enzima glicogênio sintase na linhagem $\Delta pcl-1$

Após verificar o fenótipo de hiperacúmulo de glicogênio na linhagem $\Delta pcl-1$ foi iniciada a investigação da possível diferença no estado de fosforilação da enzima glicogênio sintase de *N. crassa* (GSN). Para isto foram realizados ensaios de atividade enzimática. As amostras para a realização do ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase foram as

mesmas utilizadas para a quantificação de glicogênio. A atividade GSN foi determinada através da incorporação de unidades glicosil a partir da UDP-[U-¹⁴C]-glicose (UDPG)

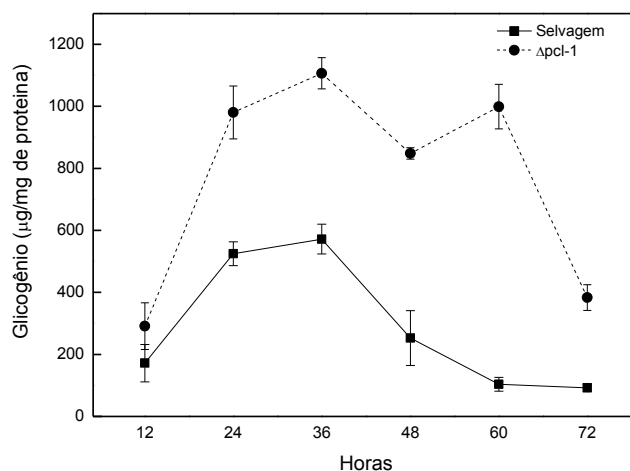


Figura 8. Concentração de glicogênio nas linhagens selvagem e mutante na ciclina ($\Delta pcl-1$). O conteúdo de glicogênio foi quantificado em diferentes tempos, em um total de 72 h com coletas realizadas a cada 12 h. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes.

incorporadas às moléculas de glicogênio (THOMAS, 1968) e posterior precipitação das moléculas de glicogênio com etanol. O ensaio foi realizado na ausência e presença de glicose-6-fosfato (G6P), o qual constitui o ativador alostérico da enzima glicogênio sintase. A razão de atividade na ausência e presença de G6P (taxa -/+) representa um índice cinético do estado de fosforilação da enzima, onde valores próximos a zero são correlacionados à proteína altamente fosforilada e valores próximos a 1 refletem o baixo estado de fosforilação da enzima (THOMAS, 1968). É importante ressaltar que a enzima glicogênio sintase é altamente regulada por fosforilação, sendo que no estado fosforilado a enzima é menos ativa e quando desfosforilada a enzima é ativa. Como vários sítios de fosforilação são descritos serem fosforilados nas enzimas GS, em geral, a enzima alterna em várias formas, variando de um estado com baixo índice de fosforilação (mais ativa) a estados com alto índice de fosforilação (menos ativa).

A Figura 9 mostra a atividade da enzima GSN, expressa como a razão de atividade -/+G6P, a qual representa o índice de fosforilação da enzima. Como pode ser observado na figura, o índice de fosforilação praticamente se manteve constante para a linhagem selvagem, com um valor próximo de 0,5. A linhagem mutante $\Delta pcl-1$ apresentou valores mais altos nos primeiros tempos, em relação à linhagem selvagem, indicando que a enzima GSN pode estar menos fosforilada e, portanto mais ativa. Este resultado sugere que a ciclina influencia o estado de fosforilação da enzima, podendo ser esta a ciclina que direciona a proteína quinase

PHO-1 para fosforilar GSN. Em *S. cerevisiae*, foi descrito que quando uma das ciclinas Pcl10 ou Pcl8 está ausente a levedura apresenta atividade Gsy2 aumentada no tempo de 24 h de crescimento (HUANG et al., 1998). Portanto, os nossos resultados foram semelhantes aos descritos em *S. cerevisiae* para esta proteína e suportam o fato de que a proteína PCL-1 trata-se de uma ciclina envolvida na fosforilação da enzima GSN.

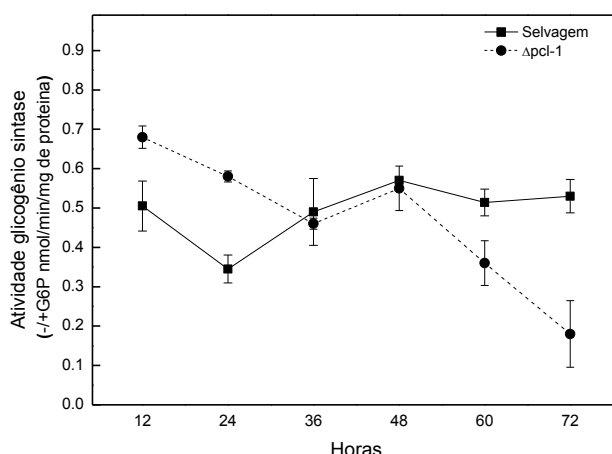


Figura 9. Atividade da enzima glicogênio sintase nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$. A atividade foi quantificada utilizando UDP-[U- 14 C]-glicose durante 72 h com coletas realizadas a cada 12 h. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes.

4. Identificação das isoformas fosforiladas da enzima GSN na linhagem $\Delta pcl-1$

Como mostrado na Figura 9, foram observadas alterações no índice de fosforilação da enzima GSN na linhagem $\Delta pcl-1$ quando comparada com a linhagem selvagem. Sabendo deste fato, foram iniciados os experimentos para demonstrar se a ciclina PCL-1 atua diretamente no controle da fosforilação da enzima GSN. Para isto foi realizada uma análise das isoformas fosforiladas da enzima na linhagem mutante $\Delta pcl-1$. Esta análise foi realizada através de 2D-PAGE seguida de *Western blot*, utilizando anticorpos anti-GSN. Através da combinação destes ensaios foi possível identificar as isoformas fosforiladas da enzima GSN. Resultados prévios em nosso laboratório, mostraram que a enzima GSN apresenta, no mínimo, 4 potenciais sítios de fosforilação, uma vez que quando os resíduos de aminoácidos serina/treonina correspondentes a tais sítios, localizados na região C-terminal da proteína, foram trocados por alanina através de mutagênese sítio-dirigida, o índice de incorporação *in vitro* de fosfato radioativo foi reduzido em relação à proteína selvagem (BARBOSA, 2007). Além disso, foi verificado que a enzima contendo os 4 prováveis sítios mutados e a enzima truncada na região C-terminal, a qual contém todos os prováveis sítios de fosforilação, ainda

mostrou incorporação de fosfato radioativo. Estes resultados sugeriram que a enzima GSN possa apresentar sítio(s) de fosforilação adiciona(is) fora da região C-terminal.

A partir desses resultados prévios foi realizado um ensaio de eletroforese 2D-PAGE separando as proteínas do extrato total das linhagens selvagem e mutante $\Delta pcl-1$ seguido de *Western blot*. Durante a focalização isoelétrica as proteínas migram de acordo com os seus pontos isoelétricos (pI). A adição de fosfato à proteína resulta no aumento de duas cargas negativas, isto faz com que a proteína desloque o seu pI para o lado ácido (+). Como a proteína GSN tem vários sítios de fosforilação foi possível identificar as várias isoformas de acordo com o pI de cada uma delas, já que os eventos de fosforilação são dinâmicos, de acordo com as condições ambientais que a célula se encontra. Como as linhagens selvagem e mutante foram submetidas às mesmas condições (crescimento por 30°C /250 rpm/24 h), foi possível observar se a ausência da ciclina influencia na formação das isoformas fosforiladas da enzima GSN, sob as condições estabelecidas.

Os resultados mostraram que a proteína GSN na linhagem selvagem apresentou 5 isoformas de fosforilação, como pode ser observado na Figura 10. Quando realizamos o tratamento com a enzima fosfatase, foi possível observar que o número de isoformas fosforiladas reduziu substancialmente e, embora não tenha sido possível observar pela figura apresentada, a proteína ficou concentrada na região alcalina, devido à diminuição na quantidade de cargas negativas. O mesmo pode ser observado no extrato celular da linhagem $\Delta pcl-1$, na qual a ausência da ciclina levou a uma redução do número das isoformas fosforiladas da enzima GSN. Este resultado é muito importante, pois mostrou que na ausência da ciclina a enzima GSN foi menos fosforilada, o que reforça a hipótese de que esta ciclina seja a verdadeira parceira da proteína quinase PHO-1 e que juntas fosforilam GSN.

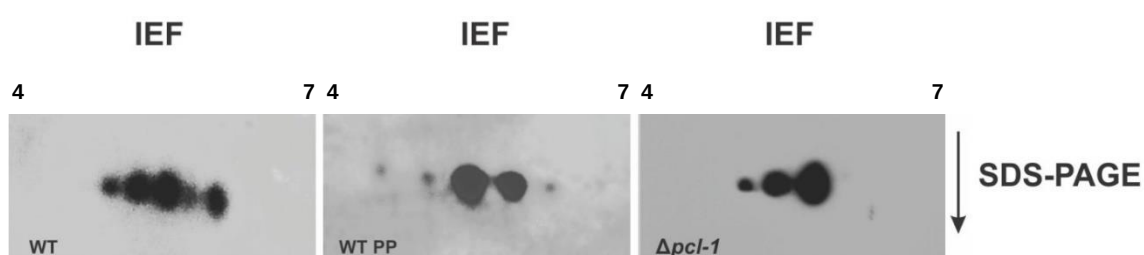


Figura 10. Identificação das isoformas fosforiladas da enzima GSN por *Western blot*. Extratos celulares totais de *N. crassa* da linhagem selvagem (WT) e $\Delta pcl-1$ foram submetidos à eletroforese bidimensional seguida de *Western blot* com anticorpos anti-GSN. As linhagens foram crescidas a 30°C, durante 24 h. Um dos extratos da linhagem selvagem foi tratado com fosfatase (WT PP) e, posteriormente, fracionado por 2D-PAGE. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por *Western blot* utilizando anticorpo anti-GSN de acordo com as condições descritas em acima. IEF, focalização isoelétrica.

5. Análise da expressão dos genes relacionados ao metabolismo de glicogênio na linhagem $\Delta pcl-1$

Como mostrado anteriormente, a linhagem $\Delta pcl-1$ apresentou conteúdo de glicogênio aumentado em relação à selvagem e diminuição da fosforilação da enzima GSN. Dentro deste contexto, uma questão levantada é se a ciclina também regula a expressão dos genes codificadores das enzimas do metabolismo do glicogênio. Para isto, realizamos a análise da expressão dos genes que codificam para as enzimas glicogênio sintase (*gsn*) e enzima ramificadora (*gbn*), atuantes no processo de síntese de glicogênio e glicogênio fosforilase (*gpn*) e a enzima desramificadora (*gdn*) atuantes no processo de degradação do carboidrato.

Resultados anteriores, obtidos pelo nosso laboratório, mostraram que a expressão do gene *gsn*, analisada por *Northern blot*, em uma linhagem selvagem, variou ao longo do crescimento do fungo, apresentando máxima expressão ao redor de 24 h de crescimento. Neste trabalho, a expressão dos genes foi realizada através da técnica de RT-qPCR. Essa análise foi realizada em amostras de RNA extraídas de micélios coletados no tempo de 36 h do crescimento do fungo, pois neste tempo foi apresentado o maior acúmulo de glicogênio (Figura 8). Os micélios foram utilizados para a extração de RNA total, sendo posteriormente obtido o cDNA a partir das amostras. Com os cDNAs preparados e oligonucleotídeos específicos para cada gene a ser analisado (Materiais e Métodos), procedeu-se a análise da expressão dos genes *gsn*, *gpn*, *gdn* e *gbn* por RT-qPCR. Os resultados obtidos na análise de expressão desses genes estão apresentados na Figura 11 e foram expressos em relação ao gene da actina, utilizado como referência nesta análise.

Podemos observar que a ausência da ciclina levou a alterações na expressão dos genes *gpn*, *gdn* e *gbn*. Embora as diferenças na expressão dos genes quando a linhagem mutante foi comparada à selvagem, tenham sido significativas ($p < 0,01$), as alterações não foram acentuadas, levando a concluir que as diferenças na expressão gênica pode não ter um efeito considerável no acúmulo de glicogênio apresentado na linhagem mutante. As maiores alterações na expressão gênica foram observadas para os genes *gpn* e *gdn*, que codificam enzimas que atuam na degradação do glicogênio. Curiosamente, estes resultados não corroboram com o acúmulo de glicogênio apresentado na Figura 8, pois a linhagem mutante apresentou altas concentrações de glicogênio. Com este perfil de acúmulo de glicogênio esperava-se um aumento na expressão dos genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese ou uma inibição na expressão dos genes que codificam enzimas da degradação do carboidrato. Estes resultados mostraram que o papel da PCL-1 em relação à regulação do metabolismo de glicogênio está mais relacionado à fosforilação da enzima GSN do que à expressão dos genes envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio.

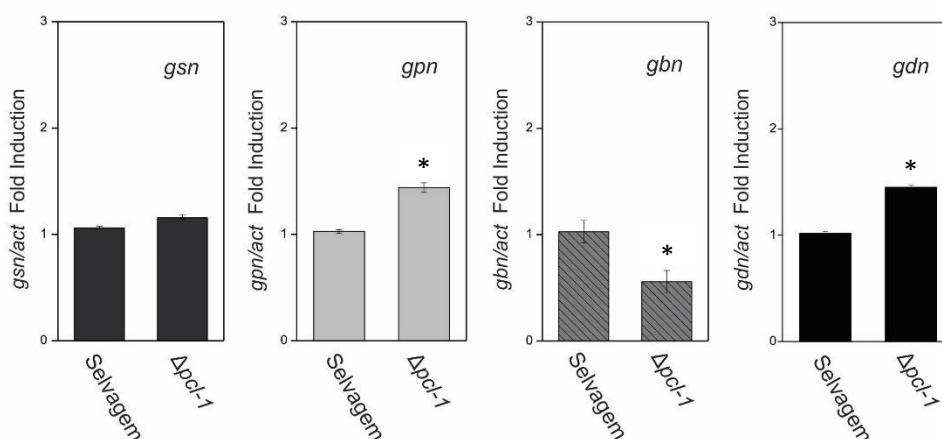


Figura 11. Análise da expressão gênica dos genes relacionados ao metabolismo do glicogênio nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$. Análise da expressão dos genes através da técnica de PCR em tempo real. As linhagens foram crescidas a 30°C durante 36 h, após este período a massa micelial coletada foi utilizada para a extração de RNA total. O cDNA foi sintetizado e utilizado nas reações de RT-qPCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene. Os valores representam a expressão dos genes na linhagem mutante relativa à linhagem selvagem. Os valores foram normalizados em relação à expressão do gene da actina (*act*). Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. (* $p > 0,01$).

6. Fosforilação *in vitro* da enzima GSN pelo complexo PHO-1/PCL-1

Para analisar funcionalmente a ação da proteína PCL-1 no direcionamento da proteína quinase PHO-1 para fosforilar a enzima GSN foi necessário produzir várias proteínas na forma recombinante. Os cDNAs das proteínas recombinantes His-PHO-1 e His-PCL-1 foram clonados no vetor pET28a, as proteínas recombinantes foram produzidas em *E. coli* e as condições de purificação por cromatografia de afinidade foram padronizadas durante o Mestrado. Para a realização destes ensaios foi necessário produzir e purificar, na forma recombinante, as diferentes proteínas GSN utilizadas neste trabalho: a enzima selvagem e as enzimas mutantes nos diferentes sítios de fosforilação.

Em um trabalho previamente realizado no laboratório, realizando um alinhamento de sequências polipeptídicas da enzima glicogênio sintase de diferentes organismos, foi possível identificar 4 sítios de fosforilação para a GSN: Ser632, Ser636, Thr641 e Thr645 (PAULA et al., 2002). Através de mutações sítio-dirigidas, os códons de serina ou treonina foram mutados para códons de alanina, um aminoácido de cadeia lateral simples (grupo metil) que não pode ser fosforilado. Visando verificar se os resíduos S632, S636, T641 e T645 realmente correspondem aos sítios de fosforilação da enzima GSN, Barbosa (2007) construiu uma coleção de cDNAs contendo mutações pontuais e múltiplas nos códons para estes resíduos de aminoácidos. Os diferentes cDNAs foram clonados no vetor pET28a gerando um banco de cDNAs mutados. As proteínas mutadas foram produzidas em *E. coli*, purificadas e através de

análises de fosforilação *in vitro*, utilizando extrato celular da linhagem de *N. crassa* RP-1 (mutante deficiente na atividade GSN, construído no laboratório por RIP) como fonte de proteínas quinases foi demonstrado que as proteínas mutantes foram *in vitro* fosforiladas (Barbosa, 2007, resultados não publicados). Neste trabalho, as construções plasmidiais pET-*gsn*, pET-*gsn*S632A, pET-*gsn*S636A, pET-*gsn*T641A, pET-*gsn*T645A e pET-*gsn*S632A/S626A/T641A/T645A foram utilizadas como fonte de DNA para a investigação de qual(is) sítio(s) de fosforilação seria alvo do complexo PHO1/PCL-1. Estas construções foram utilizadas como DNA molde para a amplificação por PCR dos genes *gsn* selvagem e mutados nos sítios de fosforilação acima mencionados. O inserto correspondente ao cDNA *gsn* selvagem e mutantes foram individualmente subclonados no vetor de expressão pET-SUMO através da digestão com as enzimas *Eco*RI e *Bam*HI e posterior ligação, originando as construções pET-SUMO-*gsn*, pET-SUMO-*gsn*S632A, pET-SUMO-*gsn*S636A, pET-SUMO-*gsn*T641A, pET-SUMO-*gsn*T645A e pET-SUMO-*gsn*S632A/S636A/T641A/T645A. O vetor pET-SUMO foi selecionado para estes experimentos devido ao fato de ser possível a posterior remoção do tag SUMO pela ação da SUMO protease.

A partir das construções obtidas em pET-SUMO, células de *E. coli*, linhagem BL21a, foram transformadas e a produção e purificação das proteínas recombinantes foi realizada. As proteínas recombinantes His-SUMO-GSN, His-SUMO-GSNS632A, His-SUMO-GSNS636A, His-SUMO-GSNT642A, His-SUMO-GSNT645A e His-SUMO-GSNS632A/S636A/T641A/T645A foram induzidas com 0,1 mM de IPTG, a 30°C e 250 rpm, purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel e utilizando um gradiente de imidazol de 20 a 500 mM em um sistema de purificação *Akta Purifier* (GE Healthcare). A produção das diferentes formas da enzima foi confirmada por *Western blot* utilizando anticorpo anti-His. Para a realização dos ensaios de fosforilação *in vitro* foi necessário produzir e purificar a proteína recombinante His-SUMO, utilizada como controle negativo do experimento, com o objetivo de verificar se a fosforilação não seria realizada em nenhum aminoácido presente nesta proteína.

Após a produção e purificação das proteínas GSN selvagem, mutantes em sítios de fosforilação e da proteína His-SUMO, foram realizados ensaios de fosforilação *in vitro*. Neste ensaio, as proteínas recombinantes His-PHO-1, His-PCL-1, His-SUMO e His-SUMO-GSN selvagem e mutantes em sítios de fosforilação foram incubadas com γ -³²P-dATP em uma mistura de reação contendo 1 mM ATP, 25 mM MgCl₂, 0,5 μ L γ -³²P-dATP. Posteriormente, as proteínas foram recuperadas com *beads* de Ni-NTA agarose, adicionadas de tampão de Laemmli e separadas por SDS-PAGE. Após a eletroforese, o gel foi seco e exposto ao filme radiográfico. Paralelamente, foi realizado outro gel, nas mesmas condições, mas sem γ -³²P-ATP, para a visualização do perfil proteico através da coloração com Coomassie-blue Brilliant R250.

A Figura 12A mostra o gel SDS-PAGE e a autorradiografia do ensaio de fosforilação *in vitro*. Nesta primeira etapa, o objetivo foi identificar se a proteína His-PHO-1 fosforila a proteína His-SUMO-GSN e se esta quinase requer a ciclina His-PCL-1 para fosforilar a enzima alvo. Para a realização deste ensaio alguns controles foram necessários. Como controle negativo, foram utilizados a proteína His-SUMO-GSN sem nenhuma fonte de proteínas quinases (canaleta 3) e a proteína BSA (*Bovine Serum Albumin*), uma proteína que não possui sítios de fosforilação (canaleta 1) e como controle positivo, foi utilizada a proteína His-SUMO-GSN. Ambos controles foram ensaiados utilizando extrato celular da linhagem Δgsn (linhagem *knockout* no gene *gsn*) como fonte de proteínas quinases, pois como descrito anteriormente, a proteína GSN foi fosforilada *in vitro* utilizando extrato celular de uma linhagem sem atividade glicogênio sintase. Como esperado, o controle positivo mostrou estar fosforilado (canaleta 2). Na Figura 12A podemos observar também que a proteína His-PHO-1 foi capaz de fosforilar a proteína His-SUMO-GSN apenas quando a ciclina His-PCL-1 estava presente no meio da reação. Em *S. cerevisiae*, a ciclina Pcl10 direciona a proteína quinase Pho85 para fosforilar a enzima Gsy2 diminuindo sua atividade na síntese do glicogênio. Em *N. crassa*, o mesmo processo foi observado, podendo ocorrer a inativação da proteína GSN pelo complexo PHO-1/PCL-1 *in vivo*.

Em um segundo momento, o objetivo foi identificar qual(is) sítio(s) de fosforilação a quinase PHO-1 fosforila ligada à ciclina PCL-1. Para isso a reação de fosforilação *in vitro* foi realizada com as proteínas His-SUMO-GSN mutadas em diversos sítios de fosforilação. Como controle negativo, novamente, foi utilizada a proteína His-SUMO-GSN sem nenhuma fonte de proteínas quinases e a proteína recombinante His-SUMO junto com o complexo PHO-1/PCL-1 para se certificar que não houve fosforilação na proteína de marcação. Em ambos os casos não houve fosforilação. Como controle positivo foram utilizadas a proteína His-SUMO-GSN selvagem junto com o complexo PHO-1/PCL-1 e neste caso houve incorporação de fosfato radioativo (Figura 12B). Na Figura 12B podemos observar que o complexo PHO-1/PCL-1 fosforila mais especificamente o resíduo de aminoácido Ser636, pois somente a proteína mutada no resíduo de aminoácido S636A (canaleta 11) e a proteína contendo todos os sítios mutados (canaleta 14) não apresentaram incorporação de fosfato radioativo. Com estes resultados foi concluído que a ciclina PCL-1 direciona a quinase PHO-1 para fosforilar a enzima GSN especificamente no resíduo Ser636, contribuindo para a sua inativação e consequentemente diminuindo o acúmulo de glicogênio.

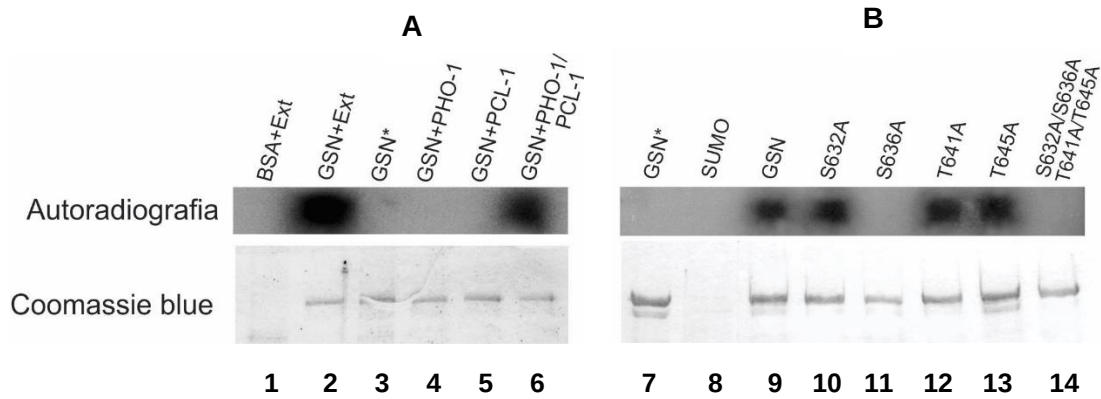


Figura 12. Fosforilação *in vitro* da enzima GSN selvagem e mutantes em sítios de fosforilação pelo complexo PHO-1/PCL-1. As proteínas His-SUMO-GSN selvagem e mutantes foram incubadas com a quinase His-PHO-1 e com sua ciclina parceira His-PCL-1 na presença de γ - 32 P-dATP. Posteriormente as proteínas foram recuperadas com *beads* de Ni^{+2} e analisadas em gel SDS-PAGE seguido de exposição em filme radiográfico. **(A)** BSA+Ext (a reação contém Albumina Bovina Sérica e extrato celular da linhagem Δgsn ; controle negativo) GSN+Ext (a reação contém His-SUMO-GSN selvagem e extrato celular da linhagem Δgsn ; controle positivo) GSN* (His-SUMO-GSN; controle negativo) as demais reações contém a His-SUMO-GSN selvagem e as proteínas recombinantes analisadas His-PHO-1 e His-PCL-1, como descrito na figura. **(B)** GSN* (His-SUMO-GSN; controle negativo), SUMO (a reação contém His-PHO-1, His-PCL-1 e a proteína His-SUMO; controle negativo), GSN e mutantes (a reação contém His-PHO-1, His-PCL-1 e His-SUMO-GSN selvagem e mutantes).

Resultados

Parte II

Resultados Parte II

7. Análise da germinação na linhagem $\Delta pcl-1$

Durante os experimentos de quantificação de glicogênio (Figura 8), observamos que a linhagem nocauteada na ciclina PCL-1 apresentou um crescimento retardado nas primeiras 12 h. Isto foi observado, pois, partindo da mesma concentração celular no inóculo foi possível observar uma quantidade menor de massa micelial na linhagem $\Delta pcl-1$. Em virtude deste fato, foi realizado a análise qualitativa e quantitativa da germinação dos conídios da linhagem $\Delta pcl-1$, pois este retardo pode ser devido ao envolvimento desta ciclina com as fases iniciais da germinação dos conídios. Para isto, conídios das linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$ foram inoculados VM líquido a 30 °C e 250 rpm ao longo de 12 h. Para a análise qualitativa, amostras da cultura foram removidas a cada 2 h, totalizando 12 h e analisadas por microscopia. Para a análise quantitativa, as coletas foram feitas a cada 1 h, totalizando 8 h, os conídios foram contados e a porcentagem de conídios em germinação foi calculada.

Podemos observar na Figura 13A que em todos os tempos analisados a germinação dos conídios da linhagem $\Delta pcl-1$ foi mais retardada quando comparada com a linhagem selvagem, de forma mais acentuada até o tempo de 6 h. Na avaliação quantitativa o mesmo retardo na germinação pode ser observado (Figura 13B). Com estes resultados, podemos concluir que a proteína PCL-1 está envolvida com o controle da germinação em *N. crassa*, pois, quando ausente, o processo de germinação é mais retardado. Normalmente, proteínas envolvidas com o ciclo celular, quando ausentes, causam um atraso no desenvolvimento celular ou mesmo a ausência da separação celular ao término da mitose. Nos fungos filamentosos, o crescimento das hifas acontece devido a uma extensão apical e, neste caso, é possível sugerir a participação desta ciclina neste processo (RIQUELME et al., 2011).

Sabendo que a linhagem nocauteada apresenta um retardo na germinação dos conídios, realizamos experimentos de crescimento celular, através de medidas de massa seca nos tempos 12, 24, 36 e 48 h para investigar se o retardo na germinação resulta em alterações no crescimento celular. Para isto, conídios foram inoculados em meio VM líquido sob as mesmas condições utilizadas na análise do processo germinativo. Os micélios foram coletados em cada tempo, secos e pesados. Na Figura 13C podemos observar um crescimento celular diminuído até o tempo 36 h, entretanto no tempo de 48 h o crescimento da linhagem mutante se equipara à linhagem selvagem. Isto nos leva a concluir que esta ciclina, quando ausente, afeta o processo germinativo dos conídios com consequência na diminuição do crescimento celular apenas nas primeiras horas.

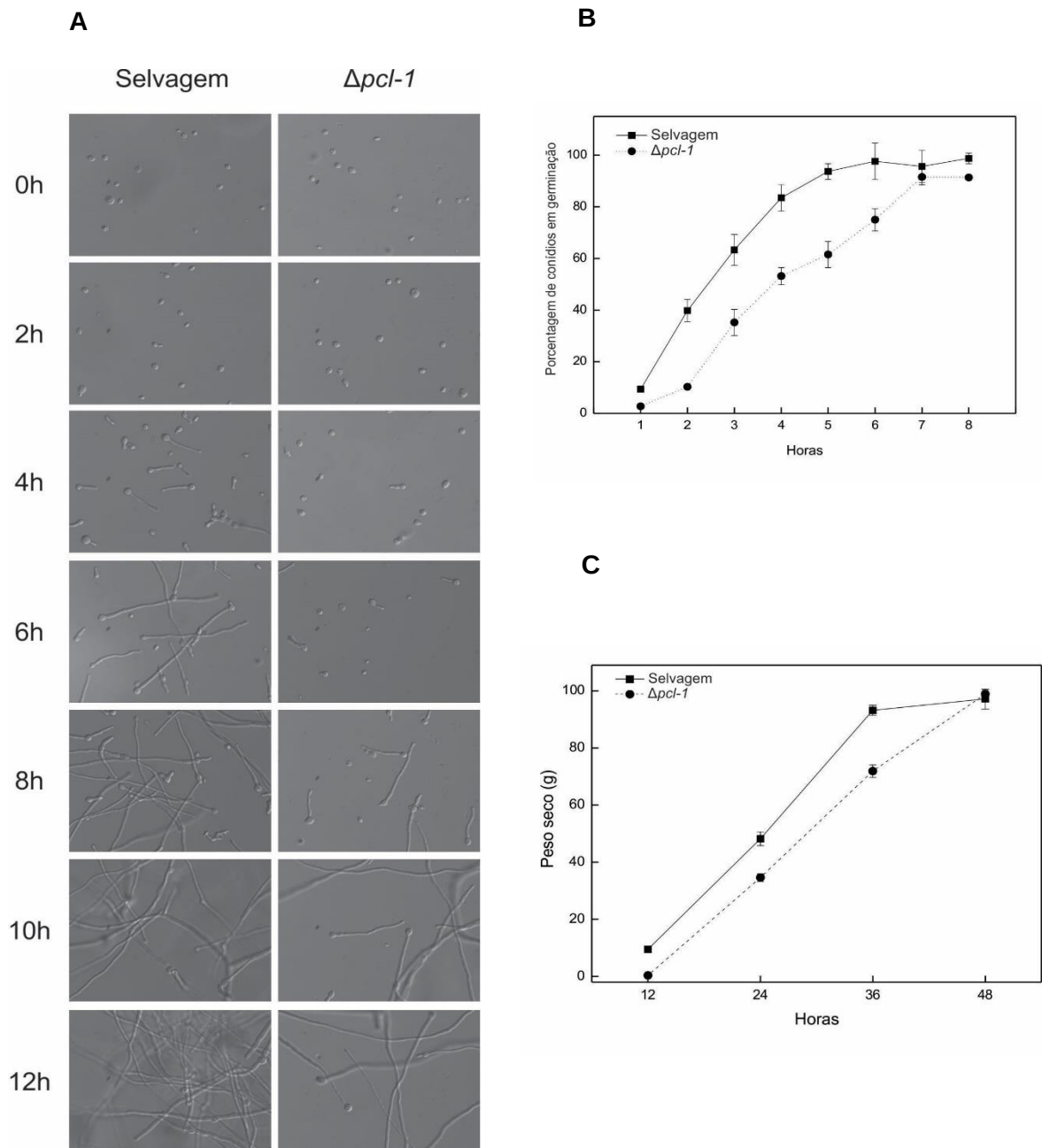


Figura 13. Análise da germinação nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$. (A) Conídios foram inoculados em meio VM líquido e uma alíquota do meio foi coletada a cada 2 h durante 12 h para observação microscópica. Imagens obtidas utilizando o microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 40 x de aumento acoplado a câmara AxioCam ICc 3. (B) Conídios foram inoculados em meio de cultura líquido e uma alíquota do meio foi coletada a cada 1 h durante 8 h para contagem microscópica. A porcentagem de conídios em processo germinativo foi calculada utilizando a linhagem selvagem como controle. Os conídios em germinação foram calculados em relação aos conídios totais. (C) Conídios foram inoculados em meio de cultura líquido e alíquotas foram coletadas por filtração a cada 12 h durante 48 h. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes.

8. Análise da morfologia nuclear na linhagem $\Delta pcl-1$

Após observar alterações no processo germinativo, foi iniciada a investigação do envolvimento desta ciclina na progressão do ciclo celular durante a germinação, pois classicamente, ciclinas regulam o progresso do ciclo celular e levantou-se a suspeita que o retardo na germinação poderia estar relacionado com o atraso deste processo. O ciclo celular é um mecanismo molecular essencial para a manutenção da vida dos organismos vivos. Múltiplas vias interconectadas resultam no desenvolvimento do ciclo celular e na diferenciação morfológica dos organismos (ZÁMBORSZKY et al., 2014). Estudos recentes mostraram que a regulação do ciclo celular realizado por outras ciclinas tem relação direta com o ciclo circadiano em *N. crassa* (HONG et al, 2014).

Para isto, inicialmente, foram realizados estudos da morfologia celular. Conídios foram depositados em pequenas placas de Petri contendo VM líquido adicionados de 2% de sacarose. Após o término do tempo de incubação os núcleos foram corados com o corante DAPI e a morfologia foi observada e fotografada através de microscopia de fluorescência. Na Figura 14 podemos observar alterações na morfologia celular regular na linhagem selvagem e acentuadas alterações na morfologia nuclear na linhagem mutante. Em todos os tempos analisados os núcleos da linhagem mutante se mostraram irregulares, e isto nos levou a crer que possíveis alterações no ciclo celular poderiam levar a estas alterações. As alterações se mostram mais acentuadas no tempo 8 h, nesta fase o fungo já passou pelo processo de adaptação ao meio de cultura e já deu início à germinação, estando em intensa divisão celular para realizar o processo de extensão das hifas.

Com a observação no retardo da germinação somados às alterações da morfologia nuclear, outros experimentos foram planejados para demonstrar, de forma mais precisa a atuação desta ciclina no processo de divisão celular.

9. Análise da progressão do ciclo celular na linhagem $\Delta pcl-1$

Para analisar o ciclo celular durante a germinação foi realizado um cruzamento entre as linhagens $\Delta pcl-1$ e hH1-*sgfp*. A linhagem hH1-*sgfp* produz a histona H1 fusionada à GFP o que permite acompanhar a morfologia nuclear e, portanto, as fases do ciclo celular através de fluorescência. Utilizando esta metodologia é possível identificar núcleos em interfase e as diferentes fases do processo mitótico (ROCA et al., 2010). Após a obtenção e confirmação da linhagem hH1-*sgfp*/ $\Delta pcl-1$, através de cruzamento, conídios da linhagem hH1-*sgfp*/ $\Delta pcl-1$ foram inoculados em meio VM líquido a 30 °C e 250 rpm ao longo de 8 h.

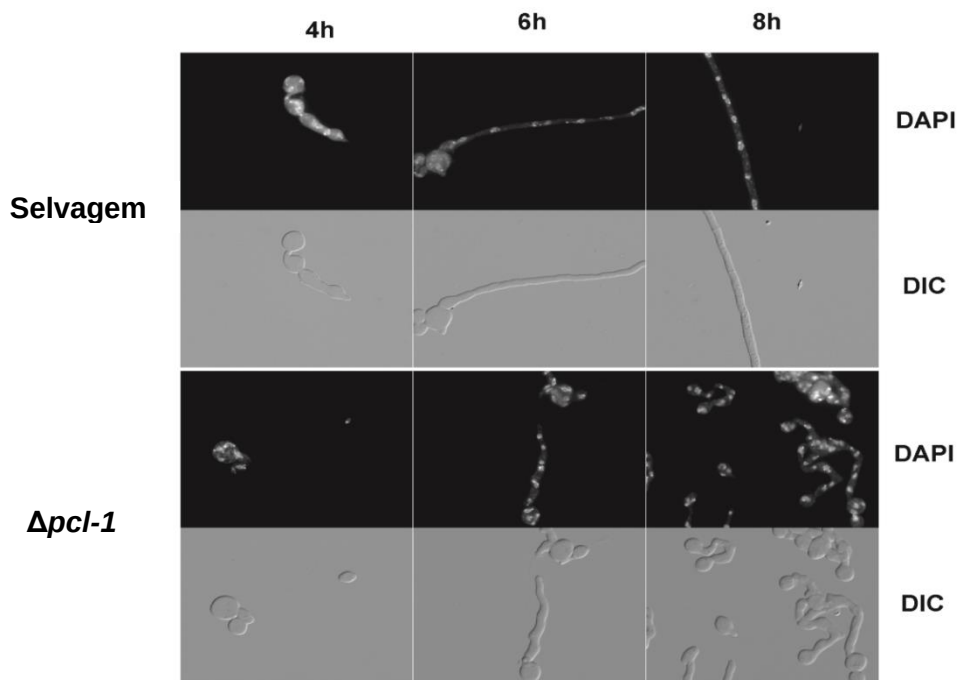


Figura 14. Análise da morfologia nuclear durante a germinação nas linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$. A germinação dos conídios foi realizada em placas de Petri, recoberta com 2 mL de meio VM líquido. A suspensão de conídios foi adicionada ao meio de cultura e as placas foram incubadas a 30 °C durante 4, 6 e 8 h. As células foram coradas com o reagente DAPI (1 µg/mL) durante 15 min e a lamínula montada em lâmina e levada ao microscópio. As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) no aumento de 100X acoplado à câmera Axio Cam MRM e as imagens processadas utilizando o software AxioVision.

Alíquotas foram coletadas a cada hora e analisadas por microscopia de fluorescência em um microscópio Axioimager A2 (Zeiss) acoplado a câmara AxioCam MRm. Foi realizada a captura de 6 imagens de cada tempo e os núcleos de cada imagem foram categorizados e contados. Os resultados foram comparados à linhagem selvagem (*hH1-sgfp*).

Na Figura 15A, podemos observar diferentes estágios do ciclo celular categorizados de acordo com a morfologia nuclear da linhagem selvagem *hH1-sgfp* e na Figura 15B, podemos observar fotos representativas da linhagem selvagem *hH1-sgfp* e da linhagem *hH1-sgfp/Δpcl-1*. Em todos os tempos foi possível observar um número maior de núcleos em interfase na linhagem *hH1-sgfp/Δpcl-1* em relação à selvagem. O mesmo pode ser notado após a quantificação dos núcleos na Figura 15C. Claramente os núcleos em divisão celular ao longo da germinação oscilam ao redor de 60% na linhagem selvagem, enquanto que na linhagem mutante a quantidade de núcleos mostrou-se menor, ao redor de 50%. Este resultado mostrou que a proteína PCL-1 está envolvida no controle do ciclo celular durante o

processo germinativo em *N. crassa* e o retardo na germinação, possivelmente, ocorreu devido ao atraso na progressão do ciclo celular.

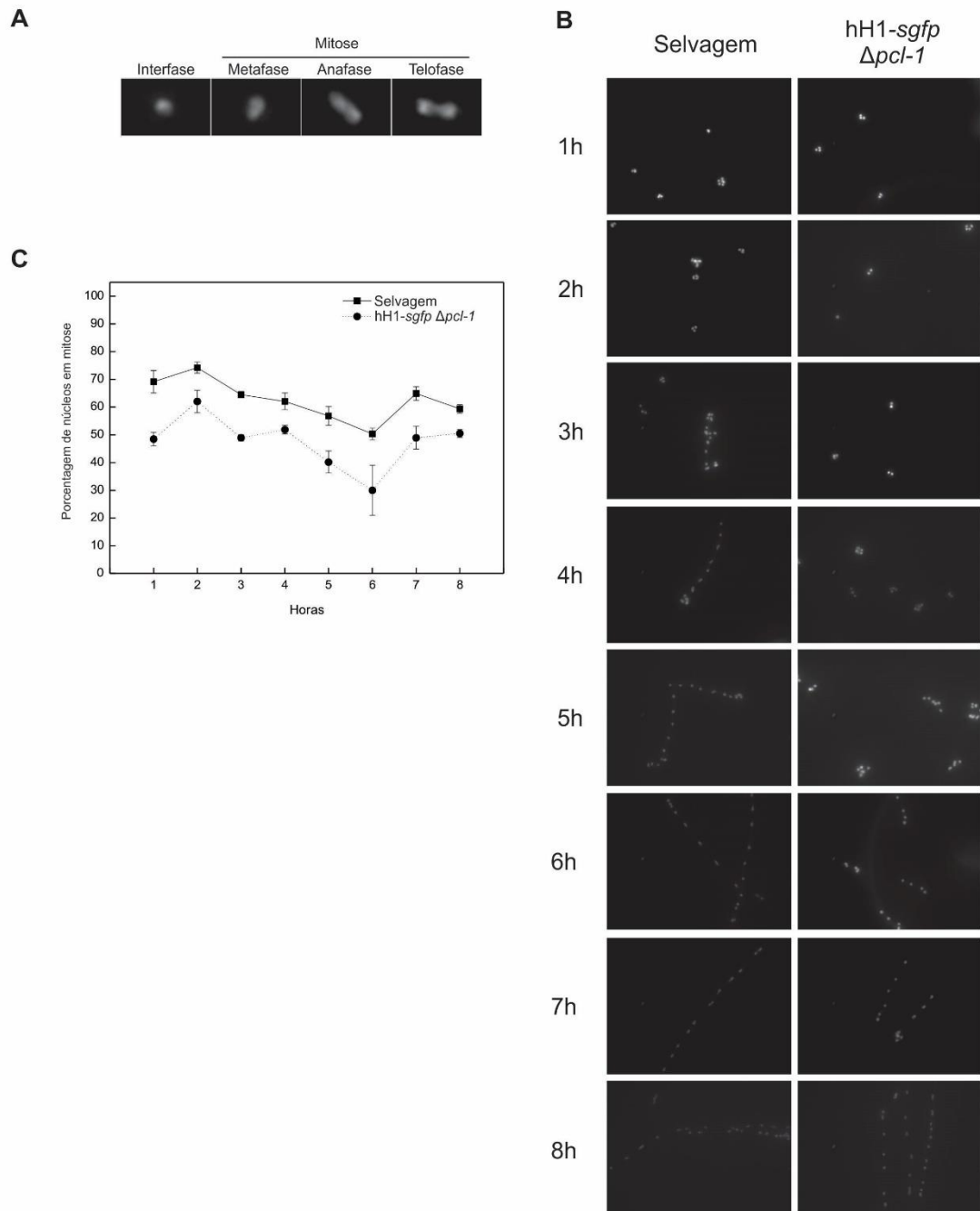


Figura 15. Análise do ciclo celular ao longo da germinação. (A) Diferentes estágios do ciclo celular podem ser visualizados e categorizados observando a morfologia nuclear na linhagem hH1-sgfp. (B) e (C) Conídios foram inoculados em meio de cultura líquido e uma alíquota do meio foi coletada a cada 1 h durante 8 h para observação e contagem microscópica. Imagens obtidas utilizando o microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 100 x de aumento acoplado a câmara AxioCam MRm. (B) Perfil da morfologia nuclear na linhagem selvagem e hH1-sgfp/ $\Delta pcl-1$. (C) A porcentagem de núcleos em divisão celular foi calculada em relação aos núcleos totais utilizando a linhagem selvagem como controle. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes.

Resultados

Parte III

Resultados Parte III

10. Análise da linhagem *Δpcl-1* em condições de estresse com cálcio

A proteína quinase Pho85 apresenta múltiplas funcionalidades em *S. cerevisiae*, dentre elas, está a regulação da sobrevivência da levedura em ambientes com altas concentrações de Ca^{2+} . Nestas condições, a ciclina Pho80 direciona a quinase Pho85 para fosforilar o fator de transcrição Crz1, inativando-o. Como o genoma de *N. crassa* apresenta um baixo número de ciclinas (HONG et al., 2013), iniciou-se a busca por novas funções para a ciclina PCL-1 com base na multifuncionalidade da proteína Pho85 de *S. cerevisiae* quando associada a diferentes ciclinas. A partir destas observações foram iniciados os estudos sob o papel funcional desta ciclina no estresse com Ca^{2+} .

As vias de sinalização do cálcio (Ca^{2+}) tem papel principal em diversas respostas fisiológicas em procariotos e eucariotos. O Ca^{2+} , como mensageiro secundário, participa de muitos processos biológicos vitais, como o ciclo celular, diferenciação e homeostase iônica, mas os altos níveis de Ca^{2+} intracelular podem causar danos levando até a morte celular. (HERNÁNDEZ-ORTIZ e ESPESO, 2013). O principal mediador da sinalização do Ca^{2+} é a proteína Calmodulina (CaM). O Ca^{2+} se liga a CaM ocasionando um rearranjo estrutural na proteína e levando a CaM a interagir com efetores específicos de vias de sinalização. O principal alvo da CaM é a serino-treonina fosfatase do tipo B (PP2B), denominada calcineurina (CHIN e MEANS, 2000). Os principais alvos de interação e desfosforilação da calcineurina são denominados domínio de ancoragem da calcineurina. Duas classes de sítios de ancoragem foram identificadas, as sequências consenso de aminoácidos determinada foi PxlIT e LxVP (LI et al., 2011). A levedura *S. cerevisiae* é o fungo mais bem caracterizado na via de sinalização do Ca^{2+} . Neste organismo, o fator de transcrição Crz1 é desfosforilado, e consequentemente ativo, pela calcineurina e permanece no núcleo. Esta condição, Crz1 ativa a transcrição de 163 genes responsáveis pela manutenção da sobrevivência da levedura durante o estresse com Ca^{2+} (YOSHIMOTO et al, 2002). Quando as concentrações de Ca^{2+} diminuem, Crz1 é fosforilada pela proteína quinase Pho85 ligada à sua ciclina parceira Pho80 e, consequentemente, inativada. Desta maneira, o fator de transcrição sai do núcleo e interrompe sua função de ativador da transcrição de inúmeros genes (HUANG et al., 2007).

Com o objetivo de investigar o envolvimento da ciclina PCL-1 na sobrevivência do fungo *N. crassa* sob estresse com Ca^{2+} , foram realizados experimentos de crescimento em placa de Petri na presença do íon. Inicialmente, conídios das linhagens selvagem e mutante foram inoculados em meio VM sólido contendo CaCl_2 nas concentrações de 1, 5, 10, 50,

100, 200 e 300 mM e o crescimento radial foi medido após 24 h a 30°C. A linhagem mutante apresentou um perfil de resistência maior que a linhagem selvagem ao estresse aplicado em altas concentrações de cálcio (Figura 16A e 16B). Em baixas concentrações, o perfil foi inverso, a linhagem selvagem mostrou um crescimento mais acentuado. Posteriormente, novos experimentos em placa de Petri contendo 50, 100, 200 e 300 mM de CaCl_2 foram realizados por 30 h a 30 °C e, novamente, foi observado maior resistência da linhagem mutante (Figura 17). Em ambos os casos, podemos observar maior resistência da linhagem mutante em altas concentrações de CaCl_2 . Estes resultados mostraram que a ciclina PCL-1 tem envolvimento com a regulação da sobrevivência em ambientes com altas concentrações de Ca^{2+} .

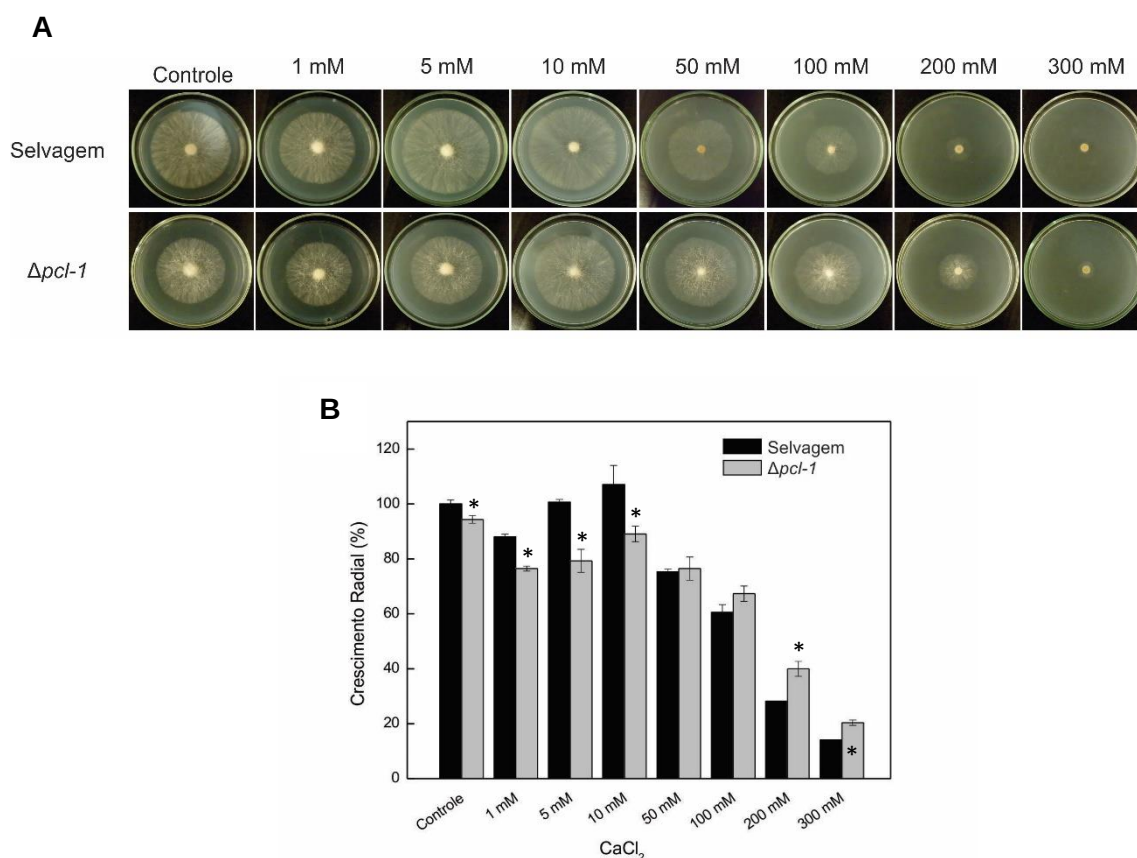


Figura 16. Análise do crescimento das linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$ sob estresse com cálcio em 24 horas. Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM e 2 % sacarose e as placas foram incubadas por 24 horas a 30°C. **(A)** Crescimento morfológico em placas de Petri. **(B)** Diâmetro radial medido em porcentagem considerando a linhagem selvagem na condição controle como 100%. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes. (* $p < 0,05$).

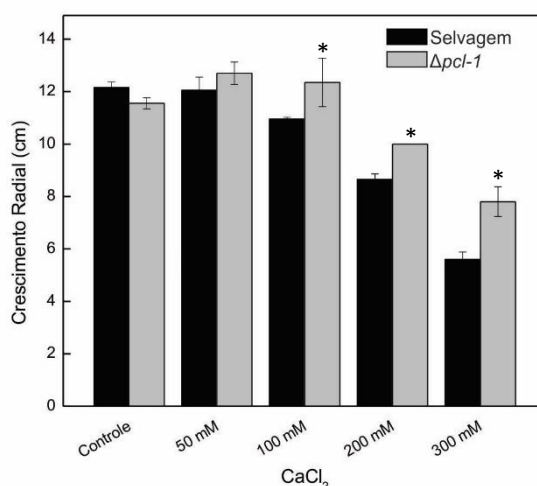


Figura 17. Análise do crescimento das linhagens selvagem e $\Delta pcl-1$ sob estresse com cálcio em 30 h. Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM suplementado com 2 % de sacarose e as placas foram incubadas por 30 h a 30 °C. Diâmetro radial medido em centímetros. Os valores apresentados correspondem à média de quatro experimentos independentes. (* $p < 0,05$).

11. Análise da expressão dos genes *pmr-1*, *nca-2* e *nca-3* em condições de estresse com cálcio na linhagem $\Delta pcl-1$.

A partir dos resultados dos resultados de análises morfológicas apresentadas acima (item 10) mostrando a sobrevivência aumentada da linhagem $\Delta pcl-1$, análises de homologia foram realizadas através de ferramentas de bioinformática para a identificação de genes relacionados ao metabolismo de cálcio e homólogos aos genes ativados pelo fator de transcrição Crz1 em *S. cerevisiae* (YOSHIMOTO et al. 2002) e CrzA em *A. fumigatus* (SORIANI et al. 2010) para análises de RT-qPCR. Os genes selecionados para estas análises foram: *nca-2*, *nca-3* e *pmr-1*, todos eles apresentam estreita relação com o metabolismo de Ca^{2+} , os dois primeiros estão anotados como *calcium P-type ATPase-2* e *3* e o último como *calcium transporting ATPase type 2C member 1*. Além da sua transcrição ser ativada pelo fator de transcrição Crz1, as proteínas Nca2 e Nca3 estão envolvidas com a organização mitocondrial, elas controlam a expressão das subunidades 6 e 8 da enzima ATP sintase em *S. cerevisiae*. Esta enzima fica localizada na mitocôndria e é responsável pelo armazenamento de energia intracelular em forma de ATP. (CAMOUGRAND et al. 1995; PÉLISSIER et al. 1995). A proteína Pmr-1 está diretamente envolvida com o metabolismo do íon Ca^{2+} . Ela é responsável pelo transporte de cálcio e magnésio no complexo de Golgi, ambos são necessários para o tráfego e processamento de polipeptídeos na via secretória em *S. cerevisiae*. (SORIN et al. 1997). Em organismos mais

complexos, tais como, *C. elegans*, *D. melanogaster* e mamíferos a proteína Pmr-1 é classificada como SPCA (*Secretory Pathway Ca²⁺-ATPases*) e apresenta a função semelhantes exercida nos fungos. (CULLOTA et al. 2005).

Análises de expressão gênica utilizando a linhagem selvagem e $\Delta pcl-1$ sob condições de estresse de cálcio foram realizadas por RT-qPCR com o objetivo de investigar o envolvimento desta ciclina na regulação da transcrição dos genes deste metabolismo. As linhagens selvagem e mutante foram inoculadas em meio de cultura líquido contendo diferentes concentrações do agente estressante. Podemos observar na Figura 18 que a expressão do gene *pmr-1* está reduzida na linhagem selvagem e aumentada na linhagem mutante em todas as concentrações testadas em relação ao controle. Nos genes *nca-2* e *nca-3* em altas concentrações (200 mM de CaCl_2) observamos uma expressão acentuada na linhagem mutante em relação à selvagem. Todos os genes foram expressos em relação ao gene da tubulina (*tub-2*), utilizado como referência nesta análise, este gene foi como controle por que demonstrou uma expressão constante mesmo em situações de altas concentrações de CaCl_2 . Em outros organismos a transcrição destes genes é ativada pelo fator de transcrição CRZ (YOSHIMOTO et al., 2002; HUANG et al., 2007; DE CASTRO et al., 2014). Em *S. cerevisiae*, este fator de transcrição é inativado por fosforilação pela quinase Pho85 direcionada pela ciclina Pho-1 (HUANG et al., 2007). Em *N. crassa*, quando a ciclina PCL-1 está ausente, os genes ativados por CRZ se encontram altamente expressos em altas concentrações de CaCl_2 . Podemos concluir que esta ciclina pode estar envolvida na inativação por fosforilação do fator de transcrição CRZ, demonstrando assim mais uma função para esta ciclina multifuncional.

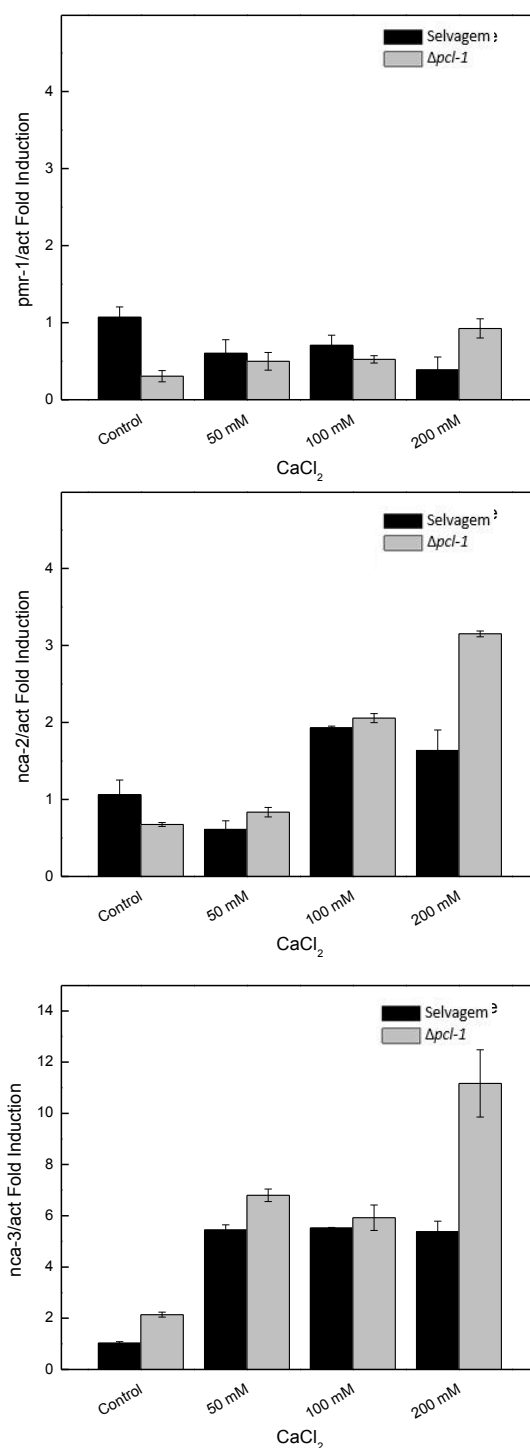


Figura 18. Análise de expressão gênica dos genes *pmr-1*, *nca-2* e *nca-3* por RT-qPCR em condições de estresse de cálcio nas linhagens $\Delta pcl-1$ e selvagem. As linhagens foram crescidas a 30 °C durante 24 h na ausência e presença de diferentes concentrações de CaCl_2 , após este período a massa micelial coletada e foi utilizada para a extração de RNA total. O cDNA foi sintetizado e utilizado nas reações de RT-qPCR utilizando oligonucleotídeos específicos para cada gene. Os valores representam a expressão dos genes na linhagem mutante relativa à linhagem selvagem. Os valores foram normalizados em relação à expressão do gene da tubulina (*tub-2*). Os valores representam a média de 4 réplicas biológicas. ($p < 0,05$).

Discussão

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização funcional da ciclina PCL-1 em *N. crassa*. Em um estudo anterior, foi realizado um *screening* sistemático de 84 linhagens mutantes em genes codificadores para proteínas quinases, das quais quinze linhagens mostraram perfis diferentes da linhagem selvagem em relação ao conteúdo de glicogênio acumulado durante o crescimento vegetativo e após estresse térmico. Uma discussão mais aprofundada sobre as proteínas quinases selecionadas encontra-se no artigo publicado por Candido et al. (2014) (Anexo 1).

A linhagem mutante na proteína quinase PHO-1 foi uma das linhagens selecionadas no estudo. Esta quinase é classificada como pertencente à família das quinases dependentes de ciclina, onde sua função é determinada pela ciclina ligada à ela (CARROLL e O'SHEA, 2002). Após análises de alinhamento de sequências utilizando as ciclinas de *S. cerevisiae* como *query*, apenas uma proteína ortóloga em *N. crassa* foi encontrada. A ORF identificada (NCU08772) codifica a ciclina denominada neste trabalho de PCL-1 e caracterizada funcionalmente neste estudo.

Em *S. cerevisiae* a expressão dos genes *PHO* por fosfato inorgânico (Pi) é regulada por proteínas atuando em um mecanismo regulatório global, em cascata, constituído por eventos positivos e negativos (OSHIMA, 1982). Neste sistema de regulação atuam as proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdk), as quais são enzimas hetero-diméricas que contém uma subunidade catalítica com propriedade quinase associada a uma ciclina parceira regulatória (MORGAN, 1997). Uma Cdk importante é a Pho85, uma proteína versátil que possui múltiplas funções conforme sua interação com as diversas ciclinas parceiras, chamadas de *Pho85 cyclins* (*Pcls*) (MEASDAY et al., 1997). As respostas celulares mediadas pela Pho85 incluem a manutenção da progressão do ciclo celular e a regulação do metabolismo de nutrientes como fosfato, fonte de carbono e nitrogênio. A proteína quinase Pho85 de *S. cerevisiae*, a proteína mais bem estudada até o momento, possui 302 resíduos de aminoácidos e não é essencial para o crescimento celular (UESONO et al., 1987).

As ciclinas Pcl6, Pcl7, Pcl8 e Pcl10 foram anteriormente mostradas interagir com Pho85 e torná-la específica para agir no metabolismo do glicogênio em *S. cerevisiae*, caracterizando o envolvimento da proteína quinase no metabolismo deste carboidrato de reserva. Foi observado que quando havia a deleção do gene *PHO85* nesta levedura havia também um hiperacúmulo de glicogênio (TIMBLIN et al., 1996 e WILSON et al. 2005). Mais tarde foi demonstrado que o complexo quinase Pcl10-Pho85 interage e fosforila a enzima glicogênio sintase 2 (Gsy2).

Com a obtenção da linhagem mutante na ORF codificadora da proteína PCL-1 em *N. crassa*, ortóloga à ciclina Pcl10 de *S. cerevisiae*, foi possível investigar o

envolvimento desta ciclina no metabolismo do glicogênio. Foi demonstrado que a linhagem mutante apresenta hiperacúmulo de glicogênio, com picos nos tempos de 24 e 36 h. Após verificar esta alteração no metabolismo do glicogênio, foi realizado ensaios de atividade GS. A atividade GS foi determinada através da incorporação de unidades glicosil a partir da UDP-[U-14C]-glicose (UDPG) incorporadas à molécula de glicogênio como descrito por Thomas (1968). O ensaio foi realizado de duas formas: na presença e na ausência do modulador alostérico glicose-6-fosfato (G6P). A razão da atividade na ausência e na presença de G6P (taxa -/+) representa um índice cinético do estado de fosforilação da enzima, onde valores próximos à zero são correlacionados com a proteína altamente fosforilada e valores próximos à 1 refletem o baixo estado de fosforilação da enzima. A linhagem mutante apresentou valores acima dos apresentados pela linhagem selvagem nas primeiras 24 h, sugerindo assim que a ciclina influencia no estado de fosforilação da enzima GSN.

Para investigar se a ciclina PCL-1 age diretamente no controle da fosforilação da enzima GSN, foram realizados ensaios de 2D-PAGE seguido por *Western blot*, utilizando anti-GSN. Esta análise permite observar a migração das proteínas de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). A proteína GSN apresentou 5 isoformas de fosforilação na linhagem selvagem, já na linhagem tratada com fosfatase e na linhagem mutante as isoformas foram reduzidas substancialmente e a proteína ficou altamente concentrada na região alcalina. Este resultado demonstrou que na ausência da ciclina PCL-1 a enzima GSN foi menos fosforilada, o que abriu caminho para reforçar a hipótese que esta ciclina direcione a proteína PHO-1 para fosforilar a enzima GSN.

A ciclina PCL-1 e a proteína quinase PHO-1 foram produzidas na forma recombinante e parcialmente purificadas e, juntamente com a enzima GSN selvagem e mutantes em sítios de fosforilação, foram utilizadas em ensaios de fosforilação *in vitro* pela incorporação de ATP radioativo. Através destes ensaios foi demonstrado que a ciclina PCL-1, juntamente com a quinase PHO-1 fosforila a enzima GSN no aminoácido Ser⁶³⁶, regulando negativamente sua atividade, como descrito na levedura *S. Cerevisiae*. Este resultado mostrou que o mecanismo de regulação da enzima GSN por fosforilação pode ser conservado quando se compara fungos filamentosos e leveduras.

Como uma única ciclina homóloga às Pcls de *S. cerevisiae* foi encontrada em *N. crassa* foram realizados também estudos adicionais relacionados a outras funções descritas em levedura. Inicialmente, foram realizadas análises de germinação de

conídios. foi observado que a germinação dos conídios da linhagem mutante foi retardada em relação à linhagem selvagem, nos levando a concluir que a ciclina PCL-1 está envolvida com o controle da germinação em *N. crassa*. Dependendo de fatores nutricionais e ambientais, algumas proteínas que regulam a germinação desencadeiam este processo, principalmente as proteínas contidas na partícula Spitzenkörper (Spk), localizada na extremidade da hifa (ARAUJO-PALOMARES et al., 2007). Normalmente, proteínas envolvidas com o ciclo celular, como as ciclinas, quando ausentes, causam um atraso no desenvolvimento celular ou mesmo a ausência da separação celular ao término da mitose. Nos fungos filamentosos, o crescimento das hifas acontece devido a uma extensão apical (RIQUELME et al., 2011) e, neste caso, é possível sugerir a participação desta ciclina neste processo.

Em virtude do envolvimento desta ciclina com o processo germinativo e a presença do domínio conservado de ciclina em sua estrutura, foi realizado um estudo do envolvimento desta ciclina com o ciclo celular. Foram realizadas inicialmente análises da morfologia nuclear, observando núcleos alterados na linhagem mutante durante o processo germinativo. Posteriormente, foram analisadas as fases do ciclo celular, e para isto a linhagem mutante na referida ciclina foi cruzada com uma linhagem contendo a proteína histona hH1 fusionada à *sgfp*, a qual permite acompanhar as fases do ciclo celular através da morfologia nuclear (HONG et al., 2014). Foi possível observar claramente que os núcleos em divisão celular ao longo da germinação oscilam ao redor de 60% na linhagem selvagem, enquanto que na linhagem mutante a quantidade de núcleos em divisão mostrou-se menor, ao redor de 50%. Este resultado mostrou que a proteína PCL-1 pode estar envolvida no controle do ciclo celular durante o processo germinativo em *N. crassa*.

Como o fungo *N. crassa* apresenta poucos genes que codificam ciclinas em seu genoma, mais uma função foi investigada para esta proteína, a manutenção da sobrevivência em altas concentrações de cálcio. A levedura *S. cerevisiae* é um fungo muito bem caracterizado na via de sinalização do Ca^{2+} , a qual é mediada pelo fator de transcrição Crz1. Quando esta proteína é desfosforilada ela se torna ativa, e permanece no núcleo. Nesta condição, Crz1 ativa a transcrição de numerosos genes responsáveis pela sobrevivência da levedura durante o estresse com Ca^{2+} (YOSHIMOTO et al., 2002). Quando as concentrações de Ca^{2+} diminuem, Crz1 é fosforilada pela proteína quinase Pho85 ligada à sua ciclina parceira Pho80 e, consequentemente, inativada. (HUANG et al., 2007). Como *N. crassa* apresenta poucas ciclinas foi levantada a hipótese da PCL-1, juntamente com a quinase PHO-1, atuar também na regulação de genes do metabolismo de cálcio através da fosforilação do fator de transcrição homólogo a Crz1. Para investigar a sobrevivência do fungo *N.*

crassa sob estresse com Ca^{2+} foram realizados experimentos de crescimento em meio contendo altas concentrações do íon. Em condições de estresse (200 e 300 mM de CaCl_2) a linhagem mutante apresentou uma resistência maior que a linhagem selvagem e o inverso foi observado em baixas concentrações (10 mM de CaCl_2). Os resultados sugeriram um provável envolvimento da ciclina PCL-1 com o metabolismo de cálcio em *N. crassa*. Para elucidar melhor a questão, a expressão de alguns genes relacionados com o metabolismo do cálcio foi analisada sob as mesmas condições de estresse.

Os genes selecionados para estas análises foram: *nca-2*, *nca-3* e *pmr-1*. Em *S. cerevisiae* eles são ativados pelo fator de transcrição Crz1 em altas concentrações de cálcio. Em *N. crassa* os três genes foram analisados por RT-qPCR em diferentes concentrações de CaCl_2 e apresentaram a expressão gênica aumentada em altas concentrações (200 mM de CaCl_2) quando a ciclina PCL-1 está ausente. Podemos concluir que esta ciclina pode estar envolvida na inativação por fosforilação do fator de transcrição CRZ. A proteína CRZ ainda não foi caracterizada funcionalmente em *N. crassa*, para dar continuidade ao estudo deste processo seria interessante elucidar o papel deste fator de transcrição em ambientes de estresse de cálcio.

Os resultados obtidos neste trabalho constituem um conjunto de informações valioso em relação à participação da proteína PCL-1 como uma ciclina no controle do metabolismo de um carboidrato de reserva, na progressão do ciclo celular, na germinação e na sobrevivência em altas concentrações de Ca^{2+} no fungo *N. crassa*. O papel desta ciclina foi detalhadamente investigado no controle do metabolismo do glicogênio e alguns resultados forneceram evidências de que esta ciclina possa estar envolvida em múltiplas funções. Existem poucos relatos na literatura atual sobre ciclinas que exercem múltiplas funções. Normalmente a multifuncionalidade está atribuída às Cdks, onde, pontualmente, ciclinas direcionam essas quinases para determinados processos. Outras abordagens experimentais estão sendo realizadas para entender as vias de sinalizações envolvendo esta ciclina, porém, este trabalho trouxe claras evidências de sua multifuncionalidade, fato este inédito em *N. crassa*.

Referências

- ARAUJO-PALOMARES, C.; CASTRO-LONGORIA, E.; RIQUELME, M. Ontogeny of the Spitzenkörper in germlings of *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.** v. 44, n. 6, p. 492-503, June 2007.
- AVACA, J. S. **A proteína quinase dependente de ciclina NcPHO85 de *Neurospora crassa*. Estudos de caracterização molecular e bioquímica.** 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.
- BARBOSA, L. C. B. **Caracterização parcial dos sítios de fosforilação da enzima glicogênio sintase de *Neurospora crassa*.** 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- BASKARAN, S.; ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; HURLEY, T. D. Structural basis for glucose-6-phosphate activation of glycogen synthase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 41, p. 17563-17568, Oct. 2010.
- BERTOLINI, M. C.; FREITAS, F. Z.; PAULA, R. M. de; CUPERTINO, F. B.; GONÇALVES, R. D. Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa*. In: WITZANY, G. (Ed.). **Biocommunication of fungi**. Dordrecht: Springer Science, 2012. p. 39-55.
- CAMOUGRAND, N.; PÉLISSER, P.; VELOURS, G.; GUÉRIN, M. NCA2, a second nuclear gene required for the control of mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Mol. Biol.**, v. 7, n. 247, p. 588-596, Apr. 1995.
- CANDIDO, T. S. **Proteínas de *Neurospora crassa* envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio. Identificação das prováveis quinases que fosforilam a enzima glicogênio sintase.** 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.
- CANDIDO, T. S.; GONÇALVES, R. D.; FELÍCIO, A. P.; FREITAS, F. Z.; CUPERTINO, F. B.; CARVALHO, A. C. de; BERTOLINI, M. C. A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation. **Biochem. J.**, v. 15, n. 464, p. 232-334, Dec. 2014.
- CARROLL, A. S.; O'SHEA, E. K. Pho85 and signaling environmental conditions. **TIBS.**, v. 2, n. 27, p. 87-93, Feb. 2002.
- CHIN, D.; MEANS, A. R. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends Cell. Biol.**, v. 8, n. 10, p. 322-328, Aug. 2000.
- CULLOTTA, V. C.; YANG, M.; HALL, M. D. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot. Cell.**, v. 4, n. 7, p. 1159-1195, July 2005.
- CYERT, M. S. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 4, n. 311, p. 1143-1150, Nov. 2003.

DUNLAP, J. C.; BORKOVICH, K. A.; HENN, M. R.; TURNER, G. E.; SACHS, M.; GLASS, L.; McCLUSKEY, K.; PLAMANN, M.; GALAGAN, J. E.; BIRREN, B.; WEISS, R. L.; TOWNSEND, J. P.; LOROS, J. J.; NELSON, M. A.; LAMBREGHTS, R.; COLOT, H. V.; PARK, G.; COLLOPY, P.; RINGELBERG, C.; CREW, C.; LITVINKOVA, L.; DECAPRIO, D.; HOOD, H. M.; CURILLA, S.; SHI, M.; CRAWFORD, M.; KOERHSEN, M.; MONTGOMERY, P.; LARSON, L.; PEARSON, M.; KASUGA, T.; TIAN, C.; BASTURKMEN, M.; ALTAMIRANO, L.; XU, J. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Adv. Genet.**, v. 57, p. 49-96, Mar. 2007.

ESPINOZA, F. H.; OGAS, J.; HERSKOWITZ, I.; MORGAN, D. O. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. **Science**, v. 266, p. 1388-1391, 1994.

FRIEDMAN, D. L.; LARNER, J. Studies on UDPG- α -glucan trans-glucosylase III. Interconversion of two forms of muscle UDPG- α -glucan transglucosylase by a phosphorylation dephosphorylation reaction sequence. **Biochemistry**, v. 2, n. 4, p. 669-675, 1963.

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.; SOUZA, C. P. de; 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**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GIANAZZA, E.; GIACON, P.; SAHLIN, B.; RIGHETTI, P. G. Non-linear pH courses with immobilized pH gradients. **Electrophoresis**, v. 6, p. 53-56, 1985.

GYONGYOSI, N.; KALDI, K. Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa*. **Antioxid. Redox Signaling**, v. 20, n. 18, p. 3007-3023, June 2014.

HARDY, T. A.; ROACH, P. J. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 32, p. 23799-23805, Nov. 1993.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.

- HERNÁNDEZ-ORTIZ, P.; ESPESO, E. A. Phospho-regulation and nucleocytoplasmic trafficking of CrzA in response to calcium and alkaline-pH stress in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 89, n. 3, p. 532-551, Aug. 2013.
- HONG, C. I.; ZÁMBORSZKY, J.; BAEK, M.; LABISCSAK, L.; JU, K.; LEE, L.; LARRONDO, L. F.; GOITY, A.; CHONG, H. S.; BELDEN, W. J.; CSIKÁSZ-NAGY, A. Circadian rhythms synchronize mitosis in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 111, n. 4, p. 1397-1402, Jan. 2014.
- HUANG, D.; FRIESEN, H.; ANDREWS, B. Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 2, p. 303-314, Oct. 2007.
- 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.**, v. 18, n. 6, p. 3289-3299, June 1998.
- JIMÉNEZ, J.; RICCO, N.; GRIJOTA-MARTINÉZ, C.; FADÓ, R.; CLOTET, J. Redundancy or specificity? The role of the CDK Pho85 in cell cycle control. **Int. Biochem. Mol. Biol.**, v. 4, n. 3, p. 140-149, Sept. 2013.
- KARABABA, M.; VALENTINO, E.; PARDINI, G.; COSTE, A. T.; BILLE, J.; SANGLARD, D. CRZ1, a target of the calcineurin pathway in *Candida albicans*. **Mol. Microbiol.**, v. 59, n. 5, p. 1429-1951, Mar. 2006.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LI, H.; RAO, A.; HOGAN, P. G. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. **Trends Cell. Biol.**, v. 21, n. 2, p. 91-103, Feb. 2011.
- MEASDAY, V.; MOORE, L.; RETNAKARAN, R.; LEE, J.; DONOVIEL, M.; NEIMAN, A. M.; ANDREWS, B. A family of cyclin-like proteins that interact with Pho85 cyclin-dependent kinase. **Mol. Cell. Biol.**, v. 17, n. 3, p. 1212-1223, 1997.
- MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 261-291, 1997.
- NASMYTH, K. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 5, n. 2, p. 166-179, 1993.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.
- NISHIZAWA, M.; SUZUKI, K.; FUJINO, M.; OGUCHI, T.; TOH-E, A. The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (Cdk) family, has a regulation mechanism different from Cdks functioning throughout the cell cycle. **Genes Cells**, v. 4, p. 627-642, 1999.
- OSHIMA, Y. Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and phosphate. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Ed.). **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces***: metabolism and gene expression. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. p. 159-180.

PAULA, R. M. de; PINHO, C. A. de; BERTOLINI, M. C. Molecular and biochemical characterization of glycogen synthase *Neurospora crassa* encoded by *gsn* cDNA. **Mol. Genet. Genom.**, v. 267, n. 2, p. 241-253, Apr. 2002.

PAULA, R. M. de; WILSON, W. A.; TERENCE, H. F.; ROACH, P. J.; BERTOLINI, M. C. GNN, a self-glucosylating protein is involved in the initiation step of *Neurospora crassa* glycogen metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 435, n. 1, p. 112-124, Mar. 2005a.

PAULA, R. M. de; WILSON, W. A.; TERENCE, H. F.; ROACH, P. J.; BERTOLINI, M. C. Biochemical characterization of the GNN, the protein involved in the initiation of glycogen synthesis in *Neurospora crassa*. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 10, p. 2208-2214, Apr. 2005b.

PÉLISSIER, P.; CAMOUGRAND, N.; VELOURS, G.; GUÉRIN, M. NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of *S. cerevisiae*. **Curr. Genet.**, v. 27, n. 5, p. 409-416, Apr. 1995.

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.**, v. 124, n. 1, p. 37-45, May 1980.

POLLACK, J. K.; HARRIS, S. D.; MARTEN, M. R. Autophagy in filamentous fungi. **Fungal Genet. Biol.**, v. 46, n. 1, p. 1-8, Jan. 2009.

RIQUELME, M.; YARDEN, O.; BARTNICKI-GARCIA, S.; BOWMAN, B.; CASTRO-LONGORIA, E.; FREE, S. J.; FLEIBNER, A.; FREITAG, M.; LEW, R. R.; MOURINO-PEREZ, R.; PLAMAN, M.; RASMUSSEN, C.; RICHTHAMMER, C.; ROBERSON, R. W.; SANCHEZ-LEON, E.; SEILER, S.; WATTERS, M. K. Architecture and development of the *Neurospora crassa* – a model cell for polarized growth. **Fungal Biol.**, v. 115, n. 6, p. 446-474, June 2011.

ROACH, P. J. Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. **FASEB J.**, Bethesda, v. 4, n. 12, p. 2961-2968, Sept. 1990.

ROACH, P. J.; SKURAT, A. V.; HARRIS, R. A. Regulation of glycogen metabolism. In: JEFFERSON, L. S.; CHENINGTON, A. D. (Ed.). **Handbook of physiology: the system endocrine: the endocrine pancreas and regulation of metabolism**. Oxford: Oxford University Press, 2001. Chap. 19, p. 609-647.

ROCA, M. G.; KUO, H. C.; LICHIOUS, A.; FREITAG, M.; READ, N. D. Nuclear dynamics, mitosis, and the cytoskeleton during the early stages of colony initiation in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 8, p. 1171-1183, Aug. 2010.

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

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

SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41-43, Feb. 1990.

SORIANI, F. M.; MALAVAZI, I.; SAVOLDI, M.; ESPESO, E.; DINAMARCO, T. M.; BERNARDES, L. A. S.; FERREIRA, M. E. S.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H.

- Identification of possible targets of the *Aspergillus fumigatus* CRZ1 homologue, CrzA. **BMC Microbiol.**, v. 10, n. 12, Jan. 2010. doi: 10.1186/1471-2180-10-12.
- SORIN, A.; ROSAS, G.; RAO, R. PMR1, a Ca²⁺-ATPase in yeast Golgi, has properties distinct from sarco/endoplasmic reticulum and plasma membrane calcium pumps. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 15, p. 9895-9901, Apr. 1997.
- THOMAS, J. A.; SHLENDER, K. K.; LARNER, J. A rapid filter paper assay for UDP glucoseglycogen glycosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glycose. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 486-499, Feb. 1968.
- TIMBLIN, B. K.; TATCHELL, K.; BERGMAN, L. W. Deletion of the gene encoding the cyclin-dependent protein kinase Pho85 alters glycogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 143, n. 1, p. 57-66, 1996.
- TOH-E, A.; TANAKA, K.; UESONO, Y.; WICKNER, R. B. PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 214, n. 1, p. 162-164, 1988.
- UESONO, Y.; TANAKA, K.; TOH-E, A. Negative regulators of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and structural characterization of PHO85. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 24, p. 10299-10309, 1987.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microb. Genet. Bull.**, v. 13, n. 20, p. 42-43, 1956.
- 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.**, v. 21, n. 17, p. 5742-5752, Sept. 2001.
- WARD, M. P.; GIMENO, C. J.; FINK, G. R.; GARRETT, S. SOK2 may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 12, p. 6854- 6863, Dec. 1995.
- WESTERGAARD, M.; MITCHEL, H. K. A synthetic medium favoring sexual reproduction. **Am. J. Bot.**, v. 34, p: 573-577, Sept. 1947.
- WILSON, W. A.; MAHRENHLOZ, A. M.; ROACH, P. J. Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p. **Mol. Cell. Biol.**, v. 19, n. 10, p. 7020-7030, Oct. 1999.
- WILSON, W. A.; WANG, Z.; ROACH, P. J. Regulation of yeast glycogen phosphorylase by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 329, n. 20 p. 161-167, 2005.
- YOSHIMOTO, H.; SALTSMAN, K.; GASCH, A. P.; LI, H. X.; OGAWA, D. B.; BROWN, P. O.; CYERT, M. S. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 34, p. 31079-31088, Aug. 2002.
- ZÁMBORSKY, J.; CSIKÁSZ-NAGY, A.; HONG, C. I. *Neurospora crassa* as a model organism to explore the interconnected network of the cell cycle and the circadian clock. **Fungal Genet. Biol.**, v. 71, n. 52, p. 52-57, Oct. 2014.

Anexo I

A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation

Thiago De Souza Candido*, Rodrigo Duarte Gonçalves*, Ana Paula Felício*, Fernanda Zanolli Freitas*,
Fernanda Barbosa Cupertino*, Ana Carolina Gomes Vieira De Carvalho* and Maria Célia Bertolini*¹

*Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP), 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

Glycogen functions as a carbohydrate reserve in a variety of organisms and its metabolism is highly regulated. The activities of glycogen synthase and glycogen phosphorylase, the rate-limiting enzymes of the synthesis and degradation processes, respectively, are regulated by allosteric modulation and reversible phosphorylation. To identify the protein kinases affecting glycogen metabolism in *Neurospora crassa*, we performed a screen of 84 serine/threonine kinase knockout strains. We identified multiple kinases that have already been described as controlling glycogen metabolism in different organisms, such as NcSNF1, NcPHO85, NcGSK3, NcPKA, PSK2 homologue and NcATG1. In addition, many hypothetical kinases have been implicated in the control of glycogen metabolism. Two kinases, NcIME-2 and NcNIMA, already functionally characterized but with no functions related to glycogen metabolism regulation, were also identified. Among the kinases identified, it is important to mention the role of NcSNF1. We showed in the present study that this kinase was implicated in glycogen synthase

phosphorylation, as demonstrated by the higher levels of glycogen accumulated during growth, along with a higher glycogen synthase (GSN) $\pm$ glucose 6-phosphate activity ratio and a lesser set of phosphorylated GSN isoforms in strain *Ncsnf1*^{KO}, when compared with the wild-type strain. The results led us to conclude that, in *N. crassa*, this kinase promotes phosphorylation of glycogen synthase either directly or indirectly, which is the opposite of what is described for *Saccharomyces cerevisiae*. The kinases also play a role in gene expression regulation, in that *gdn*, the gene encoding the debranching enzyme, was down-regulated by the proteins identified in the screen. Some kinases affected growth and development, suggesting a connection linking glycogen metabolism with cell growth and development.

Key words: glycogen synthase, *Neurospora crassa*, phosphorylase, phosphorylation, protein kinase.

INTRODUCTION

Glycogen is a polysaccharide widely distributed in micro-organisms and animal cells, and its main role is that of a carbohydrate reserve. Its metabolism is under an intricate regulation that senses nutrient availability and other environmental conditions. The mechanisms of glycogen synthesis and degradation have been well characterized in many organisms, including bacteria, yeast and mammals, and both processes are carried out by the concerted action of a set of enzymes, the main control being the activities of glycogen synthase (EC 2.4.1.11) and glycogen phosphorylase (EC 2.4.1.1), respectively [1–3]. Both enzymes are regulated by allosteric modulation and reversible phosphorylation, existing as dephosphorylated forms, in which the synthase enzyme is active, and phosphorylated forms, with an active phosphorylase enzyme [4,5]. Multiple phosphorylation sites were identified in different glycogen synthases, phosphorylated by different protein kinases, depending on the organism, whereas glycogen phosphorylase is phosphorylated in a single residue, Ser¹⁴, which is modified by the phosphorylase kinase protein [1]. Rabbit muscle glycogen synthase, the best characterized enzyme so far, has at least nine phosphorylation sites, located at both the N- and C-termini of the polypeptide chain, and different protein kinases were linked to the *in vitro* phosphorylation of this enzyme [6]. Studies with this enzyme led to the concept of hierarchal phosphorylation,

in which the phosphorylation in one site is necessary for a subsequent site [7]. Glycogen synthases of micro-organisms lack the N-terminal phosphorylation sites and only the protein kinases that phosphorylate the *Saccharomyces cerevisiae* Gsy2p glycogen synthase have been identified so far. The Psk2p and cyclin-dependent Pho85p protein kinases phosphorylate *in vitro* two of the three phosphorylation sites in the yeast enzyme [8,9].

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for fundamental aspects of eukaryotic biology. Knowledge of its genome sequence [10] and the construction of a set of deletion strains, each carrying a deletion in a specific ORF, have allowed screening for proteins linked to a particular phenotype. We have previously used a collection of knockout strains in genes encoding transcription factors to identify regulatory proteins that either directly or indirectly regulate glycogen metabolism in *N. crassa* [11]. In the present study we used a set of mutant strains in protein kinases in an attempt to identify kinases affecting glycogen accumulation. Protein phosphorylation is considered a key event in many signal transduction pathways of biological systems [12,13]. In *N. crassa*, the number of genes encoding serine/threonine kinases is estimated to be 107 [14], according to the most recent annotation, and many remain uncharacterized with respect to their biological function. Among the *N. crassa* protein kinases functionally characterized, it is important to mention the NDR kinase DBF-2, demonstrated as being involved in cell cycle

Abbreviations: AMPK, AMP-activated protein kinase; CaMK, Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase; G6P, glucose 6-phosphate; GBD, glycogen-binding domain; GSN, glycogen synthase; IEF, isoelectric focusing; MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKA, protein kinase A; TLCK, tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; VM, Vogel's minimal.

¹ To whom correspondence should be addressed (email mcbertol@iq.unesp.br).

regulation, conidiation and acting as a negative regulator of glycogen metabolism in *N. crassa* [15]. DBF-2 NDR protein kinase is an orthologue of human LATS1 kinase, implicated in cell proliferation and/or tumour progression and a component of the Hippo signalling transduction pathway [16]. More recently, the whole set of the *N. crassa* serine/threonine kinase mutant strains was analysed for their morphology, growth phenotypes and chemical sensitivity, showing that a large number of kinases is either essential or necessary for normal growth [14]. The importance of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in the *N. crassa* protoperithecial development was demonstrated in nine MAPK mutant strains belonging to three cascades; all mutant strains were defective in sexual development [17].

This work focuses on the identification of which *N. crassa* protein kinases affect glycogen accumulation by using the knockout strain collection. Our results demonstrated that protein kinases already identified in glycogen metabolism regulation were identified in this work and revealed that additional proteins could be implicated in this process. In addition, the protein kinases probably influencing glycogen synthase phosphorylation status were investigated using biochemical approaches.

EXPERIMENTAL

N. crassa strains and growth conditions

The *N. crassa* strain FGSC 9718 (*mus-51::bar mat a*), used in this work as the wild-type reference, and a set of 147 mutant strains (including mating types A and a) individually knocked out in genes encoding protein kinases were purchased from the Fungal Genetics Stock Center [18]. The deletion strains comprise a set of mutants in which each ORF had been disrupted from start to stop codon by the insertion of the *hph* gene (hygromycin B phosphotransferase) as a marker [19]. The strains were cultivated in Vogel's minimal (VM) medium [20] supplemented with 2% sucrose. Hygromycin B (200 µg/ml final concentration) was added to the medium when using the heterokaryotic mutant strains. After 10 days of culture, conidia were suspended in sterile water and counted. For vegetative growth, conidia (10⁷/ml) were inoculated into 250 ml of VM medium and cultured at 30°C and 250 rev./min. Mycelia samples were harvested at specific times of growth, filtered, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Samples were used for glycogen quantification, gene expression assays and glycogen synthase activity. For cell growth quantification, conidia (10⁷/ml) were inoculated into 50 ml of VM medium and cultured at 30°C at 250 rev./min, and samples were harvested after 24 h. Growth was quantified by weighing the biomass after drying at 98°C for 16 h. For the heat-shock experiments, conidia (10⁷/ml) were first germinated in 100 ml of VM medium containing 2% sucrose, at 30°C and 250 rev./min for 24 h. After this time, an aliquot was removed, filtered, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use (before heat shock). The remaining cultures were filtered and transferred into fresh VM pre-heated at 45°C. After 30 min, the mycelia were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (after heat shock). The frozen mycelial pads were further used to prepare crude cellular extracts for different analyses.

GSN phosphorylation analysis

Glycogen synthase phosphorylation was analysed by two-dimensional electrophoresis. For this analysis, 24-h mycelial pads from the wild-type and mutant strains were ground to a fine powder in liquid nitrogen and extracted in lysis buffer (50 mM

HEPES, pH 7.4, 137 mM NaCl, 10% glycerol, 25 mM NaF, 1 mM EDTA and 10 mM Na₄P₂O₇). Total protein was precipitated using the 2D Clean-Up kit (GE Healthcare), suspended in sample buffer (30 mM Tris/HCl, pH 8.0, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS and 20 mM DTT), and quantified using the 2D-Quant kit (GE Healthcare). Approximately 250 µg of total protein was fractionated by isoelectric focusing (IEF), using the pH 3–10 gradient Immobiline™ DryStrip (13-cm, linear, GE Healthcare) in an Ettan IPGphor 3 system (GE Healthcare), according to the manufacturer's instructions. After rehydration, IEF was carried out at 50 µA per strip at 20°C, using the following steps: 100 V (10 h), 500 V (500 V·h), 1000 V (750 V·h), 8000 V (11325 V·h), and 8000 V (5067 V·h). After electrofocusing, the strips were twice equilibrated in 3 ml of equilibration buffer [50 mM Tris/HCl, pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS and 0.005% Bromophenol Blue, adding 10 mg/ml DTT for the first time and 25 mg/ml iodoacetamide the second time]. Equilibrated strips were subjected to SDS/PAGE (9.0% gel), using a Hoefer™ SE600 system (GE Healthcare) and the proteins were developed with Coomassie Brilliant Blue R-250. To analyse the GSN phosphorylation status in the mutant strains, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane after 2D electrophoresis and blotted with anti-GSN raised in rabbits. Blots were subsequently probed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies (Sigma) and developed with a luminol reagent. As a control of phosphorylation, total protein from the wild-type strain was treated with lambda phosphatase (NEB).

Glycogen and trehalose quantification

Mycelial pad samples submitted and not submitted to heat shock were used. The mycelia were ground to a fine powder in a pre-chilled mortar in liquid nitrogen and extracted into a lysis buffer [50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK), 1 mM benzamidine and 1 µg/ml each of pepstatin and aprotinin]. Cell extracts were clarified by centrifuging at 3000 g for 10 min at 4°C, and the supernatants were used for glycogen and protein quantifications. Glycogen content was measured following the protocol described by Hardy and Roach [21] with slight modifications. Briefly, 100 µl of the crude extract was precipitated with 20% trichloroacetic acid (TCA) (final concentration). The supernatant was separated after centrifuging (5000 g for 10 min at 4°C); the glycogen was precipitated with 500 µl of 95% cold ethanol and collected by centrifugation. After that, it was washed twice with 66% ethanol, dried and digested with α-amylase (10 mg/ml) and amyloglucosidase (30 mg/ml). Free glucose was measured with a glucose oxidase kit, and the glycogen content was normalized to the total protein concentration. Total protein was quantified according to the method of Hartree [22] using BSA as a standard.

For quantification of trehalose, mycelial pads were ground to a fine powder in a pre-chilled mortar in liquid nitrogen, and extracted into a lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.6, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM TLCK, 1 mM benzamidine and 1 µg/ml each of pepstatin and aprotinin). Cellular extracts were clarified by centrifuging at 5000 g for 10 min at 4°C, and the supernatants were used for trehalose and protein quantifications. Trehalose content was determined according to [23] with slight modifications. Briefly, the assays were carried out in a total volume of 0.4 ml in 300 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 30 mM CaCl₂. Partially purified trehalase (2.3 units) from *Humicola grisea* [24] was added and

Table 1 Oligonucleotides used for qPCR

Primers are positioned according to the ATG start codon.

Primer	Sequence (5'→3')	ORF	Gene	Position
qGSN-F	TACCAAGCATCACCACCACTCT	NCU06687	<i>gsn</i>	+ 1541 to + 1564
qGSN-R	TGTCTGCGGCTCTTCTGGGTAAT	NCU06687	<i>gsn</i>	+ 1689 to + 1712
qGPN-F	TGCCAATATCGAAATCACC CGCA	NCU07027	<i>gpn</i>	+ 2247 to + 2061
qGPN-R	TCTCGATGGCCTCAAACACCTTGA	NCU07027	<i>gpn</i>	+ 2375 to + 2398
qRAMIF-F	TCTCGATGCCGAGTTGT	NCU05429	<i>gpn</i>	+ 1487 to + 1504
qRAMIF-R	ACTCGTTGCCCTCGAAGT	NCU05429	<i>gpn</i>	+ 1616 to + 1633
qDESRAM-F	TCGGCGGTAATCAAGCCA	NCU00743	<i>gdn</i>	+ 3779 to + 3796
qDESRAM-R	TGAATTGCGGCTTCGT	NCU00743	<i>gdn</i>	+ 3935 to + 3952
4054Tub-F	CCTCCACCTTCGTCGGTAATCC	NCU04054	<i>tub</i>	+ 1091 to + 1113
4054Tub-R	GGTACTGCTGGTACTCGGAGACG	NCU04054	<i>tub</i>	+ 1254 to + 1276

the samples were incubated at 50°C overnight. The reaction was stopped by incubating the samples at 100°C for 10 min. The glucose released was quantified with a glucose oxidase kit, and the trehalose content was normalized to the total protein concentration. Total protein was quantified according to the method of Hartree [22] using BSA as a standard.

Glycogen synthase activity quantification

The activity of the glycogen synthase was determined by [¹⁴C]glucose incorporation as described by Thomas et al. [25]. Briefly, mycelia pads were ground to a fine powder in liquid nitrogen in a pre-chilled mortar and 200 mg of each sample was extracted in 1 ml of lysis buffer (50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 mM 2-mercaptoethanol, and 1 µg/ml each of aprotinin, pepstatin and TLCK). Cellular extracts were clarified (1000 g for 20 min at 4°C) and total proteins were quantified [22] using BSA as a standard. To assay glycogen synthase activity, 15–30 µl of the supernatant was added to 60 µl of the reaction buffer [50 mM Tris/HCl, pH 7.8, 20 mM EDTA, 25 mM NaF, 0.67% glycogen, 3 mM UDP-[¹⁴C]glucose (1.8 mCi/mmol), with or without 7.2 mM glucose 6-phosphate] and incubated at 30°C for 15 min. After incubation, 75 µl were withdrawn, placed on Whatmann 3MM paper and washed with cold ethanol (70%) under agitation for 15 min. An additional two washes in ethanol (70%) were done, the first for 60 min and the second for 15 min. After the washes, papers containing the reactions were dried and quantified in an LS 6500 Scintillation Counter (Beckman Coulter™). One unit of glycogen synthase activity is defined as the amount of enzyme that transfers 1 µmol of glucose to the glycogen per minute.

RNA isolation and gene expression analysis

Total RNA was prepared from mycelial samples not submitted to heat shock as described in [26]. Briefly, 36-h mycelial pads were disrupted by grinding in a mortar with liquid nitrogen and extracted with 750 µl of NTES buffer (0.6 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA and 4% SDS) and 750 µl of phenol (saturated with 0.1 M Tris/HCl, pH 8.0). The aqueous phase was re-extracted twice with phenol and the RNA precipitated with 0.75 vol. of 8 M LiCl for 2 h at 4°C. Nucleic acids were collected by centrifuging (9300 g for 10 min at 4°C), suspended in 0.3 ml of double-distilled water and subjected to another round of precipitation with 30 µl of 3 M sodium acetate (pH 5.2) and 0.75 ml of 95% ethanol. After this, total RNAs were collected by centrifuging and washed twice with 70% ethanol;

the pellets were suspended in RNase-free water and stored at –80°C. RNA (10 µg) from each sample was fractionated on a 2.2 M formaldehyde 1.2% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide, and visualized under UV light to assess the 25S and 18S rRNA integrity.

Gene expression analysis was performed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR). DNase treatment and cDNA synthesis were performed according to the manufacturer's instructions. RNA samples (20 µg) were treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and subjected to cDNA synthesis using a SuperScript III First Strand Synthesis kit (Invitrogen) and an oligo(dT) primer. Reactions were performed on a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using the Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), and specific primers for glycogen synthase (*gsn*), glycogen phosphorylase (*gpn*) and tubulin (*tub-2*) mRNA amplicons. The sequences are shown in Table 1. Five replicates were performed per experiment and the data were analysed using StepOne™ Software version 2.1 (Applied Biosystems) in the standard comparative curve method. The fluorescent dye ROX™ was used as the passive reference to normalize the SYBR green reporter dye fluorescent signal. All PCR products exhibited melting curves indicating the presence of a single amplicon. Expression of the tubulin β chain (*tub-2* gene, NCU04054) was used as the endogenous control for all experiments.

Microscopic analysis

To determine conidial germination, conidia (10⁷/ml) were inoculated into 50 ml of VM medium containing 2% sucrose, at 30°C and 250 rev./min; samples were harvested every 2 h and examined by light microscopy. Conidia were also inoculated on to a coverslip and incubated in VM medium plus 2% sucrose at 30°C for different times. For analysis of the nuclei, mycelia were fixed (3.7% formaldehyde, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, and 0.2% Tween 80), washed twice with PBS and stained with 100 µl of DAPI (0.5 mg/ml) for 5 min. The mycelia were washed again in PBS and examined in an Axio Imager.A2 microscope (Zeiss). Images were captured with an AxioCam MRm camera and processed using the AxioVision software, version 4.8.2. Further processing was performed using Adobe Photoshop 7.0.

RESULTS

Serine/threonine protein kinase mutant strains

We screened a collection of 84 *N. crassa* mutant strains, corresponding to a single mating type (A or a), each carrying

a deletion in a single gene encoding a serine/threonine protein kinase. The protein kinases were classified into the following groups: AGC [PKA (protein kinase A), PKG (protein kinase G) and PKC (protein kinase C)], CaMK (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase), CK1 (casein kinase 1), CMGC [CDK (cyclin-dependent kinase), MAPK, GSK3 (glycogen synthase kinase 3) and CLK (CDC2-like kinase)], STE (homologue of yeast sterile proteins), and 'other group', which does not include the histidine kinases [14]. The additional 18 mutant strains, more recently available ('atypical' group) [14], were not analysed in the present study and 19 strains were heterokaryotic mutant strains, according to the fungus genome database (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>). When working on such strains, Hygromycin B was added to the medium to enrich knockout conidia. All strains and the gene product names missing in each strain, together with the kinase families, are listed in Supplementary Table S1. All selected mutant strains had their gene knockout confirmed by PCR using the oligonucleotides described in Supplementary Table S2.

Protein kinases affecting glycogen and trehalose storage and glycogen synthase activity

To search for protein kinases regulating glycogen metabolism in *N. crassa*, the mutant strain set was analysed to search for strains presenting glycogen accumulation profiles different from those found in the wild-type strain. The mutant strains were analysed under normal growth temperature (30°C) and heat-shock stress (45°C) and the amount of glycogen accumulated under both conditions for all strains is shown in Supplementary Table S3. For comparison, we decided to quantify trehalose, another storage carbohydrate, accumulated by the selected mutant strains. It is known, from previous work, that *N. crassa* decreases glycogen and increases trehalose when the mycelium is exposed to heat shock (45°C) [27,28]. Of the 84 mutant strains analysed, 15 showed patterns of glycogen accumulation different from those observed in the wild-type strain (Figure 1A). The strains were selected because they showed either higher or lower glycogen levels than the wild-type strain at the two temperatures analysed. For comparison, the selected strains had their trehalose content quantified. Some mutant strains were of particular interest, because they exhibited remarkable differences when compared with the wild-type strain. Although the mutant strains NCU05638^{ko}, NCU05658^{ko}, NCU06626^{ko}, NCU07880^{ko} and NCU08177^{ko} accumulated very low levels of glycogen, the amount of glycogen accumulated by the strains NCU09212^{ko}, NCU06249^{ko}, NCU03187^{ko}, NCU04566^{ko} and NCU06240^{ko} was highly increased at both temperatures. Finally, we noted the high glycogen levels observed in the strains NCU09212^{ko} and NCU04566^{ko} after heat shock. As the selected strains showed impaired control of glycogen accumulation, compared with the wild-type strain, we concluded that the protein kinases missing in the mutant strains might be involved in the regulation of glycogen accumulation. Most of the selected mutant strains also presented impaired trehalose accumulation either before or after heat shock (Figure 1B), showing that the protein kinases identified as regulators of glycogen metabolism may regulate carbohydrate metabolism in general.

Many selected proteins are kinases already functionally characterized in other organisms, although some of them have not yet been characterized at the protein level, and are annotated either as conserved hypothetical proteins or only as protein kinase due to the presence of a kinase domain (Table 2). Most of the selected protein kinases were described as being involved with growth and

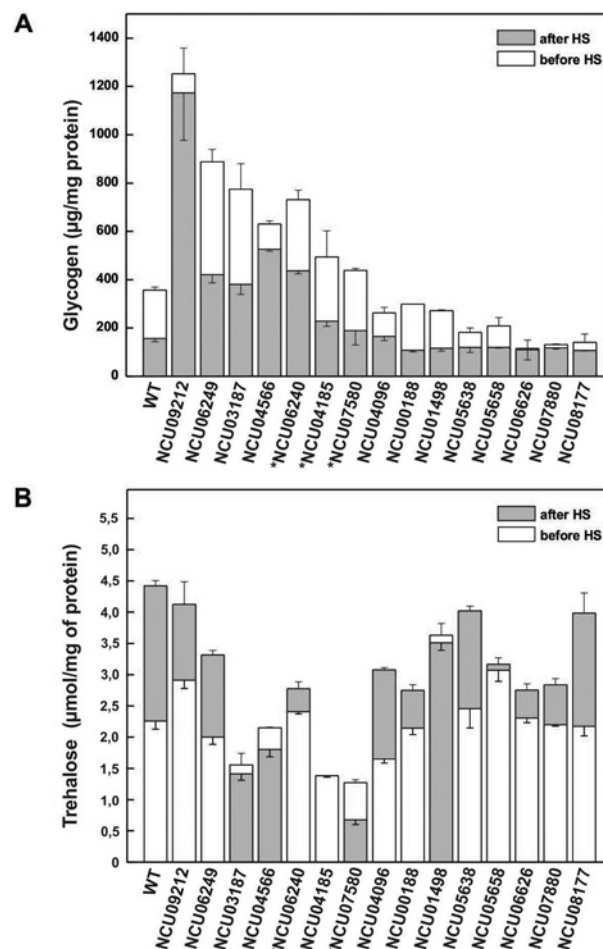


Figure 1 Glycogen and trehalose accumulation before and after heat shock in the selected mutant strains

Conidia (10⁷/ml) were first germinated in 100 ml of VM medium containing 2% sucrose, at 30°C and 250 rev./min over 24 h. After this time, an aliquot was removed, filtered, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use (before heat shock, HS). The remaining cultures were filtered and transferred into fresh VM pre-heated to 45°C. After 30 min, the mycelia were harvested by filtration, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C (after HS). (A) Glycogen was extracted from mycelia, both submitted and not submitted to HS, digested with α-amylase and amyloglucosidase, and the free glucose was enzymatically determined with a glucose oxidase kit. (B) Trehalose in mycelia, both submitted and not submitted to heat shock, were digested with a partially purified trehalase and the free glucose was enzymatically determined with a glucose oxidase kit. Results represent the average of at least three independent experiments. The asterisk shows the heterokaryotic strains. WT, wild-type.

development in the fungus [14] and many proteins were previously implicated as involved in the control of glycogen metabolism. Three strains are heterokaryotic, which means that they carry a nucleus with a non-functional allele (by gene knockout) and one with the wild-type gene. They were included in our results because they are mutant in protein kinases previously described as proteins regulating glycogen metabolism in different organisms. One is the NcPHO85 cyclin-dependent protein kinase encoded by the ORF NCU07580. In *S. cerevisiae*, this kinase, together with the cyclin Pcl10p (Pcl10p-Pho85p complex), phosphorylates the glycogen synthase Gsy2p and inhibits glycogen biosynthesis [29]. The ORF NCU04185 product is the glycogen synthase kinase 3 (NcGSK3) orthologous protein, one of the most important kinases that regulates mammalian glycogen metabolism by

Table 2 Glycogen synthase (GSN) activity in the selected mutant strains

Fungal Genetics Stock Center	NCU #	Gene product names†	GSN activity (nmol/min per mg of protein)			
			Total		±G6P	
			30 °C	45 °C	30 °C	45 °C
9718		Wild-type	1.35 ± 0.81	1.58 ± 0.49	0.25 ± 0.01	0.69 ± 0.01
11313	04096	Serine/threonine protein kinase 3	1.92 ± 0.08	0.86 ± 0.03	0.80 ± 0.06	0.61 ± 0.03
11500	04185*	Protein kinase GSK3	0.46 ± 0.01	0.41 ± 0.05	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.00
11513	06240*	PKA catalytic subunit-1	0.41 ± 0.18	0.2 ± 0.17	0.31 ± 0.00	0.58 ± 0.00
11545	09212	Serine/threonine protein kinase	1.12 ± 0.10	0.69 ± 0.10	0.40 ± 0.05	0.47 ± 0.01
12420	04566	Protein kinase SNF1	2.15 ± 0.15	1.15 ± 0.12	0.91 ± 0.08	0.94 ± 0.04
14539	07580*	Cyclin-dependent protein kinase	0.63 ± 0.28	0.29 ± 0.03	0.52 ± 0.04	0.40 ± 0.07
16738	06249	Serine/threonine protein kinase	0.35 ± 0.02	0.45 ± 0.20	0.35 ± 0.06	0.86 ± 0.06
17400	00188	ATG1 protein	0.72 ± 0.25	0.56 ± 1.26	0.46 ± 0.04	0.68 ± 0.04
17937	01498	Serine/threonine protein kinase MAK	0.91 ± 0.00	0.42 ± 0.07	0.57 ± 0.05	0.61 ± 0.03
17948	05638	Serine/threonine protein kinase 34	1.37 ± 0.21	1.00 ± 1.03	0.33 ± 0.02	0.62 ± 0.05
17951	05658	Serine/threonine protein kinase 36	0.90 ± 0.35	0.51 ± 0.02	0.44 ± 0.05	0.60 ± 0.06
17959	06626	Phosphoinositide 3-kinase subunit 4	0.98 ± 0.02	1.70 ± 0.51	0.39 ± 0.02	0.60 ± 0.01
17965	07880	Protein kinase	3.88 ± 1.07	2.14 ± 1.23	0.36 ± 0.02	0.74 ± 0.06
17966	08177	Protein kinase	1.44 ± 0.28	2.12 ± 0.48	0.22 ± 0.05	0.91 ± 0.02
21730	03187	G ₂ -specific protein kinase nimA	1.00 ± 0.12	0.41 ± 0.08	0.35 ± 0.50	0.70 ± 0.02

*Heterokaryotic mutant strains.

†See <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora>.

phosphorylating glycogen synthase [30]. The ORF NCU06240 product is the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and was described as regulating glycogen metabolism in *N. crassa* by influencing the GSN phosphorylation [31]. Additional protein kinases previously described as regulators of glycogen metabolism were also identified. The NCU04566^{KO} strain, which showed high glycogen levels at both temperatures, is a mutant lacking the *S. cerevisiae* Snf1p protein kinase orthologue, a homologue of the mammalian AMP-activated protein kinase. In yeast, this kinase regulates glycogen metabolism by controlling the phosphorylation of glycogen synthase [32] and autophagy, a process that preserves glycogen stores [33]. The NCU00188 gene product is the *S. cerevisiae* Atg1p serine/threonine protein kinase orthologous protein, first identified as required for the autophagic process [34]. Atg1p was further demonstrated to be required for the maintenance of cell viability under conditions of starvation and to maintain glycogen storage during the stationary phase [33]. The *S. cerevisiae* atg1 mutant cells were able to synthesize glycogen, but were unable to maintain the glycogen stores during the stationary phase. Surprisingly, the *N. crassa* NCU00188^{KO} strain accumulated low levels of glycogen at the exponential phase.

We have not identified the NDR kinase DBF-2 encoded by the ORF NCU09071 in our screen. This protein kinase was functionally characterized in *N. crassa* as involved in three fundamental processes: cell cycle regulation, conidiation and glycogen biosynthesis [15]. Mutant cells lacking this protein kinase accumulated glycogen in cytoplasmic leakage droplets at the end of growing hypha tips, as identified by NMR. Among the hypothetical proteins, we should mention the ORF NCU06249 product, annotated as a hypothetical protein, and homologue to the *S. cerevisiae* PAS kinase Psk2p described as a kinase that phosphorylates Gsy2p [8].

We further quantified glycogen synthase (GSN) phosphorylation status, the enzyme that catalyses the regulatory step in glycogen synthesis, in an attempt to correlate enzyme phosphorylation with the glycogen stored by the mutant strains. Enzymatic activity was quantified in the presence and absence of glucose 6-phosphate (G6P), the GSN allosteric

modulator. The ±G6P activity ratio is considered as an index of phosphorylation, higher levels correlating with lower phosphorylation and therefore higher activity. The activity was quantified in all selected mutant strains (see Table 2). The protein kinases missing in the mutant strains, which presented a high activity ratio at 30 °C, could be directly implicated in GSN phosphorylation. Among the mutant strains analysed, we observed the high ±G6P ratio (and thus lower GSN phosphorylation) at 30 °C in the strains NCU04185^{KO} (NcGSK3), NCU04566^{KO} (NcSNF1) and NCU07580^{KO} (NcPHO85), which are mutants of protein kinases described as regulating GSN phosphorylation, as previously mentioned. These results indicate that these proteins are probably also implicated in *N. crassa* GSN phosphorylation. The mutant strain NCU00188^{KO} (NcATG1) also showed a high ±G6P ratio indicating that this protein may be implicated in *N. crassa* GSN phosphorylation. In addition, and most importantly, this analysis revealed new protein kinases that may regulate glycogen storage through GSN phosphorylation. Among them, are the NCU04096, NCU09212, NCU01498, and NCU05658 gene products, most of which are annotated as hypothetical protein kinases. The only functionally characterized kinase is the NCU01498 gene product, the *S. cerevisiae* Ime2 homologue, involved in the induction of meiosis and sporulation in yeast [35], and in non-self recognition and programmed cell death in *N. crassa* [36]. From these results, we therefore conclude that protein kinases not yet described could be directly implicated in *N. crassa* GSN phosphorylation. Finally, the high ±G6P ratio observed for some mutant strains (NCU04096^{KO} and NCU01498^{KO}) did not correlate with the high levels of glycogen accumulated, as would be expected for a kinase phosphorylating the enzyme GSN.

Mutant strains with impaired glycogen levels during growth

To know whether the glycogen accumulated by the selected mutant strains correlated with either higher synthesis or degradation of glycogen, we quantified the glycogen accumulated in mycelia harvested at different growth times. We selected strains

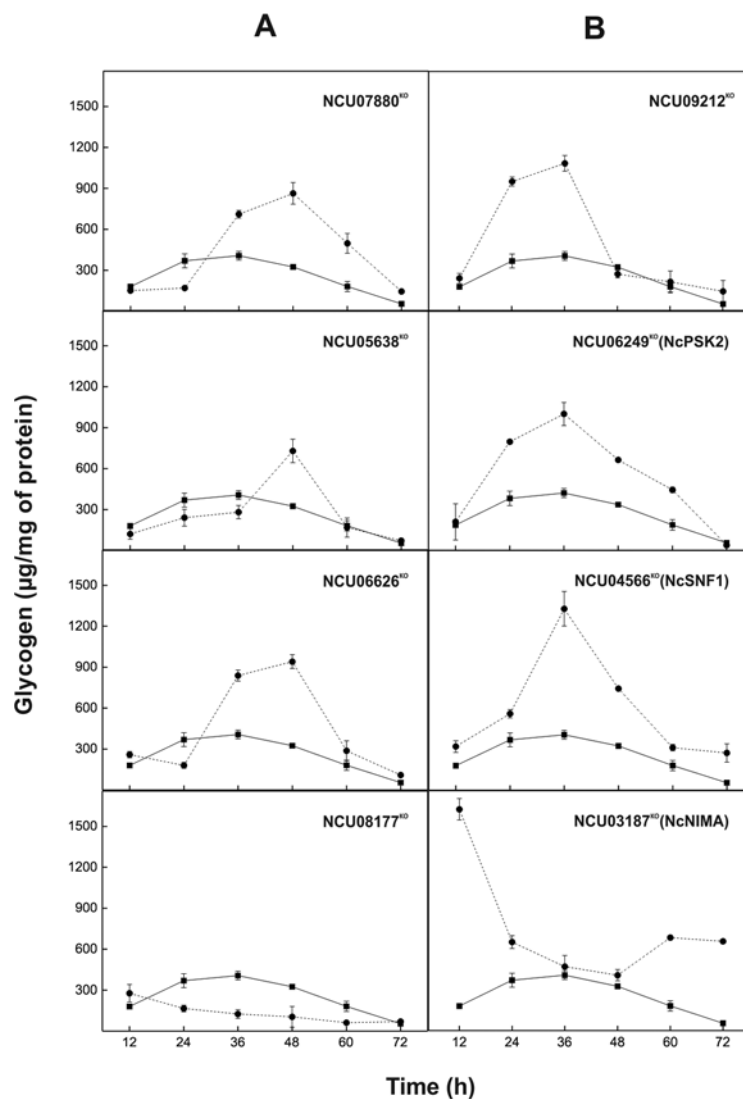


Figure 2 Analysis of glycogen content along the vegetative growth in some selected mutant strains

Conidia (10^7 /ml) were grown in liquid VM medium plus 2% sucrose, and mycelia were harvested at the indicated times of growth up to 72 h. The glycogen was extracted and digested with α -amylase and amyloglucosidase enzymes. The free glucose was enzymatically determined with a glucose oxidase kit. Results are the average of three independent experiments. The square symbol represents the glycogen accumulated by the wild-type strain during vegetative growth.

presenting (see Figure 1) lower and higher glycogen storage than the wild-type at 24 h. We have previously demonstrated that, in the *N. crassa* wild-type strain, glycogen peaks at 24–36 h of the vegetative growth [27]. Some mutant strains presenting lower glycogen storage at 24 h showed a delay in the peak of glycogen accumulated during growth, compared with the wild-type strain (Figure 2A, strains NCU07880^{KO}, NCU05638^{KO} and NCU06626^{KO}), accumulating higher levels at 48 h of growth. However, one strain (NCU08177^{KO}) was unable to accumulate glycogen even though the total GSN activity at 30 °C was similar to that in the wild-type strain (see Table 2). All proteins are annotated as hypothetical protein kinases in the fungus database.

The strains presenting higher levels of glycogen at 24 h also showed higher levels during growth with the exception of the strain NCU03187^{KO} (Figure 2B). This strain lacks NcNIMA, a cell cycle-regulated protein kinase functionally characterized in *N. crassa* by Pu et al. [37]. This strain presented the highest levels

of glycogen at the start of growth (12 h) but was unable to retain the glycogen accumulated. Among the strains showing higher levels during growth, it is important to emphasize the mutant strain in the NcSNF1 protein (NCU04566^{KO}), which seems to play an opposite role to that described in *S. cerevisiae* with regard to GSN phosphorylation. The *snf1* yeast strain is unable to accumulate glycogen, most probably by retaining the hyperphosphorylated state of Gsy2 [32]. The *N. crassa* *Ncsnf1*^{KO} strain accumulated more glycogen than the wild-type strain and this result could be explained by the higher $\pm$ G6P activity ratio (see Table 2), which means less phosphorylated isoforms of GSN.

As the levels of glycogen accumulated also correlate with physiological conditions, which result from transcriptional regulation of the genes encoding regulatory enzymes, we decided to verify whether the lack of protein kinases could affect the expression of genes encoding glycogenic enzymes. We analysed the expression of the *gsn* and *gbn* genes (which encode GSN and

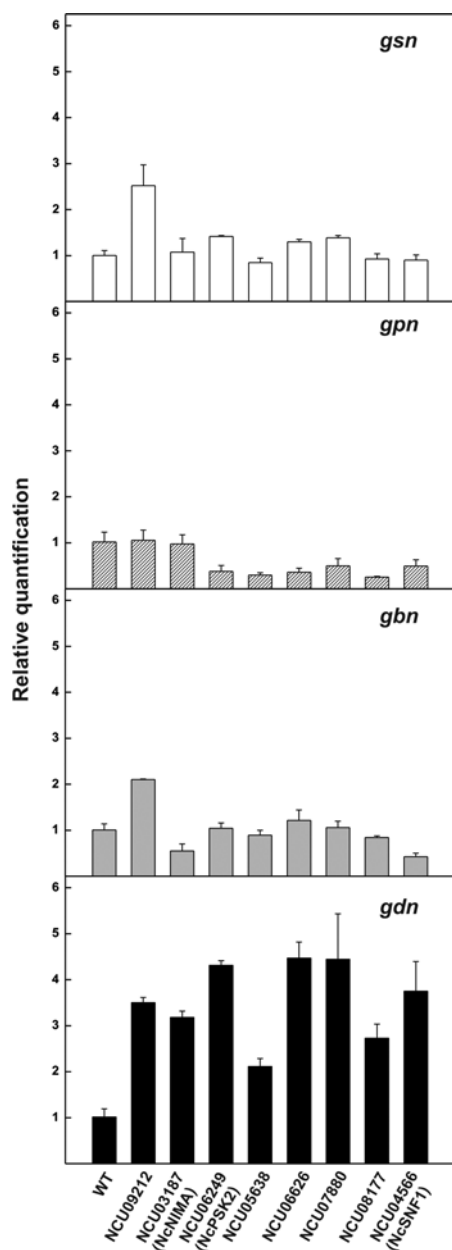


Figure 3 Quantitative PCR analysis of *gsn*, *gpn*, *gbn* and *gdn* genes in some selected mutant strains

Conidia (10^7 /ml) were inoculated into liquid VM medium plus 2% sucrose, and grown over 36 h. After this, mycelia were collected by filtration, the total RNA was extracted and reverse-transcribed, and gene expression analysed. The *tub-2* gene (NCU04054) was used as the endogenous control for all experiments. The results are the average of three independent experiments. WT, wild-type.

the debranching enzyme, respectively, both involved in glycogen synthesis) and *gpn* and *gdn* genes (which encode glycogen phosphorylase and debranching enzyme, respectively, involved in glycogen degradation) in the selected mutant strains. Gene expression was analysed by qPCR in the same samples previously selected, and the results are shown in Figure 3. Only the *gdn* gene appeared to be regulated by the protein kinases, being overexpressed in all mutant strains, which indicates *gpn* down-regulation by the protein kinases. The gene expression regulation could contribute to the lower levels of glycogen accumulated by some mutant strains.

Different phosphorylated isoforms of GSN were identified in some selected mutant strains

As previously mentioned, the $\pm$ G6P activity ratio is considered as an index of GSN phosphorylation. To analyse whether the higher activity ratio could be correlated with different isoforms of phosphorylated GSN, we performed 2D gels followed by Western blot using anti-GSN antibody. Total protein was extracted from mycelia harvested at 24 h of growth of mutant strains, exhibiting at $30^\circ\text{C} \pm$ G6P an activity ratio higher than that of the wild-type strain. Only one strain (NCU08177^{KO}) had the same ratio as the wild-type strain. The results are shown in Figure 4. Five isoforms of GSN differently phosphorylated were observed in the wild-type strain, which were reduced to two isoforms after treating with protein phosphatase. Most of the mutant strains exhibited the same pattern of phosphorylation, i.e. five isoforms of GSN, some of them being more intense than others. Although the phosphorylation sites of GSN have not been mapped to date, this result suggests that, under the growth conditions analysed in the present study, some phosphorylated isoforms may predominate. Two mutant strains exhibited an altered phosphorylation pattern for GSN: one is the NCU07880^{KO} mutant strain (lacking a hypothetical serine/threonine protein kinase), which showed an additional phosphorylated isoform and apparently similar intensities of all isoforms. The other is the NcSNF1 mutant strain (NCU04566^{KO}), which showed three predominant isoforms, indicating that GSN is less phosphorylated in this mutant strain. This result reinforces the results previously presented, which suggested that the NcSNF1 may be implicated in GSN phosphorylation. The higher $\pm$ G6P activity ratio in this mutant strain, presented in Table 2, could be explained by less phosphorylated, and therefore more active, enzyme, resulting in hyperaccumulation of glycogen, the opposite to what is described for *S. cerevisiae*.

NcSNF1 may be implicated in GSN phosphorylation

For better analysis of GSN phosphorylation by the NcSNF1 protein kinase, GSN activity was quantified in the presence and absence of G6P in mycelial samples from wild-type and *Ncsnf1*^{KO} mutant strains, harvested at different times of growth. The results showed that GSN was less phosphorylated in the mutant strain samples from 24 h to 60 h of growth compared with the wild-type strain, indicating that NcSNF1 positively affects GSN phosphorylation (Figure 5A).

The SNF1/AMPK (AMP-activated protein kinase) proteins are activated by phosphorylation by upstream kinases (Sak1, Elm1 and Tos3 in yeast) and dephosphorylated by protein phosphatases [38]. We decided to investigate the activation of NcSNF1 by kinases in *N. crassa*. A blast search using the yeast protein kinases homologues as a query in the *N. crassa* genome database retrieved the ORF products NCU06177 and NCU03523 (varying from 30 % to 42 % identity), which are annotated as a CaMK and a hypothetical protein, respectively. It is important to mention that in Park et al. [14] the NCU03523 product is described as the Yos3/Sak1 homologue. The glycogen accumulated during growth was quantified in both knockout strains and compared with those accumulated by the wild-type and *Ncsnf1*^{KO} strains. The levels of glycogen accumulated by the NCU06177^{KO} strain during growth were slightly decreased when compared with those in the wild-type strain (Figure 5B), suggesting that in *N. crassa* this protein kinase may not be implicated in NcSNF1 activation. However, the glycogen levels in the NCU03523^{KO} strain were very close to those in the *Ncsnf1*^{KO} strain, suggesting that this kinase might be implicated in the regulation of NcSNF1 by

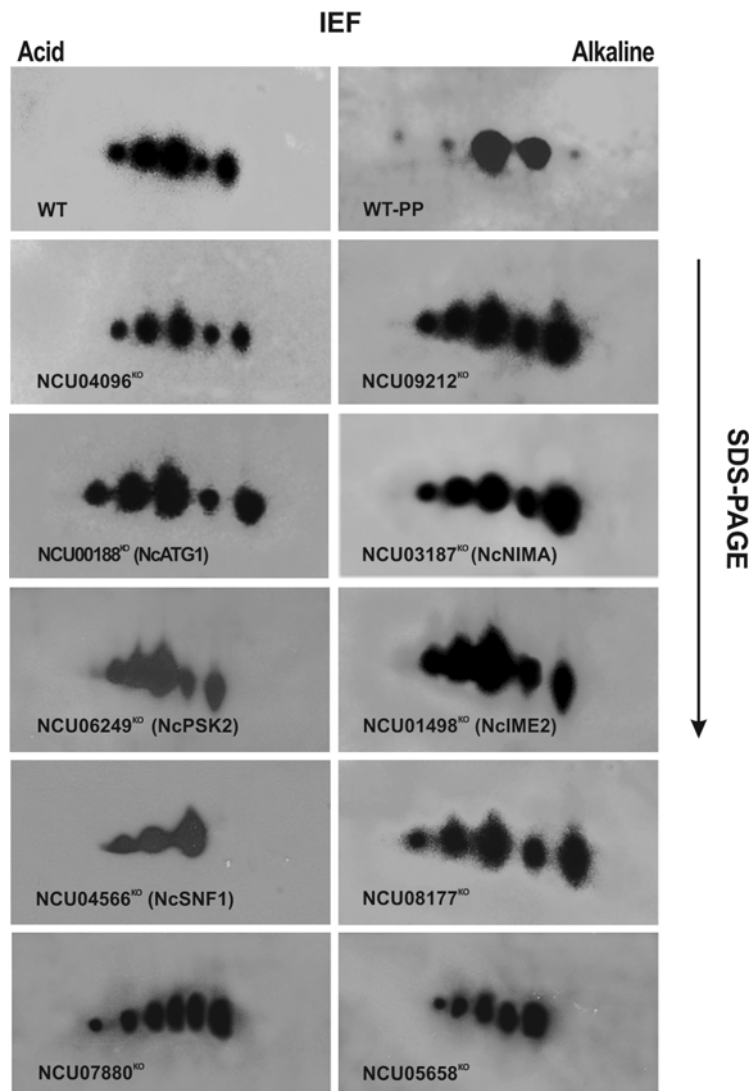


Figure 4 A zoom-in view of GSN in the 2D gel images

The mutant strains were grown for 24 h in liquid VM medium plus 2% sucrose, and mycelia were harvested by filtration. Total protein was extracted and 250 μ g of total protein was fractionated by IEF followed by SDS/PAGE (2D-PAGE). After this, the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane and analysed by Western blot using a polyclonal anti-GSN antibody raised in rabbits.

phosphorylation. The *Ncsnf1*^{KO} strain again showed the highest levels of glycogen. We decided to analyse the GSN $\pm$ G6P activity ratio in the NCU03523^{KO} strain and, although their glycogen levels were closer to those in the *Ncsnf1*^{KO}, the GSN activity was comparable with that in the wild-type strain. We suggest that the activation of glycogen metabolism in the NCU03523^{KO} strain is not mediated via GSN activation by dephosphorylation.

Some protein kinases affected growth and development

To verify whether the protein kinases also influenced growth and development, the growth of the mutant strains was quantified by dry weight and the development analysed in samples collected at early times of growth in liquid cultures. Growth results are shown in Supplementary Figure S1 and the results showed that some mutants had a reduced ability to grow, such as the strains *Ncsnf1*^{KO} and *NcnimA*^{KO}, and only NCU08177^{KO} showed a delay in conidia

germination at early times (Figure 6A). However, conidia of this strain showed complete germination at 8 h, indicating that the low germination in the early stages of growth was not due to impaired conidial viability. Nuclei from this strain were analysed during conidia germination and the results showed changes in nuclear morphology and the dynamics of nuclear divisions (Figure 6B), suggesting that this kinase influences the cell cycle regulation.

DISCUSSION

The sequencing of the *N. crassa* genome allowed the construction of a collection of mutant strains, with each strain deleted in a gene encoding a protein kinase. In the present study, this collection was used to perform an investigation aimed at identifying the protein kinases that regulate glycogen metabolism. To pursue this goal, we quantified the carbohydrate levels during vegetative growth and also under a stress condition such as

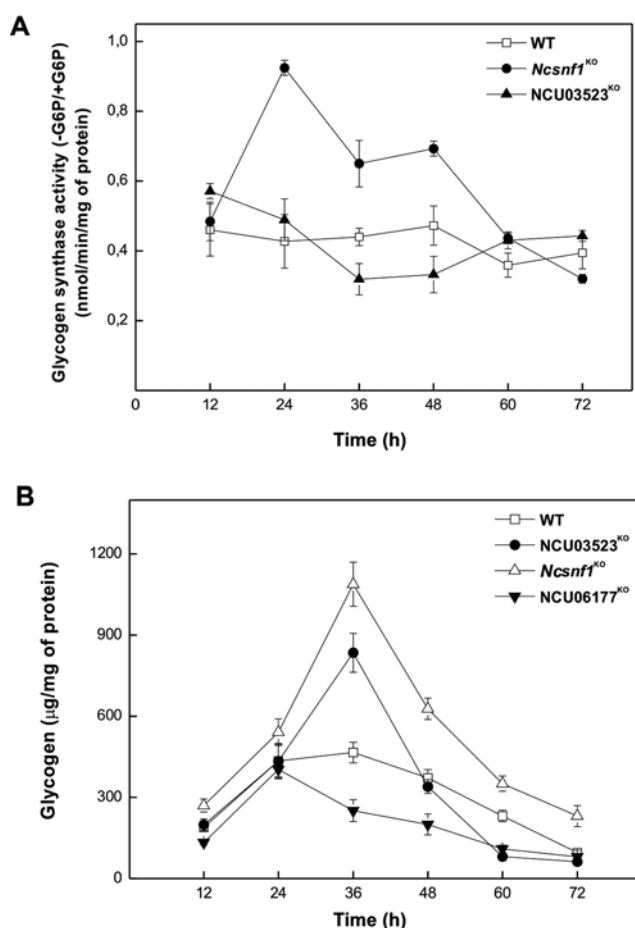


Figure 5 GSN activity and glycogen accumulation during growth

(A) GSN activity ($\pm$ G6P ratio) during vegetative growth. The *Ncsnf1*^{KO}, NCU03523^{KO} and wild-type strains (WT) were grown in liquid VM medium plus 2% sucrose up to 72 h. Mycelia from both strains were harvested at the indicated times and the crude cellular extracts were used to quantify the GSN activity in the presence and absence of G6P. Results are the average of three independent experiments. (B) Glycogen accumulation in the *Ncsnf1*^{KO}, NCU06177^{KO}, NCU03523^{KO} and wild-type strains over 72 h of growth. Mycelia were harvested at different times during growth and glycogen was extracted and digested with α -amylase and amyloglucosidase enzymes. The free glucose was enzymatically determined with a glucose oxidase kit. Results are the average of three independent experiments.

heat shock. The amount of glycogen found in a particular situation results from a balance between the activities of GSN and those of glycogen phosphorylase. These enzymes regulate glycogen synthesis and degradation, respectively, and they are both regulated by phosphorylation and allosterism, in which phosphorylation activates glycogen phosphorylase and inhibits GSN [4]. There are multiple phosphorylation sites in GSN, which is supposed to be the main control point, whereas glycogen phosphorylase is phosphorylated in a single residue. A number of protein kinases were identified in the present study as regulators of glycogen metabolism, which also control trehalose accumulation, another reserve carbohydrate. Some mutant strains accumulated low levels of glycogen, and one mutant strain (NCU08177^{KO}) was unable to accumulate glycogen during growth. This strain also showed impaired cell cycle regulation, suggesting that glycogen levels might be connected to cell cycle progression. We identified protein kinases that may regulate glycogen metabolism either through *gdn* gene expression or by GSN post-translational modification via phosphorylation.

However, additional regulatory pathways may be linked to glycogen metabolism regulation.

A number of proteins identified in our screen were previously described in the control of glycogen accumulation in different organisms, which validated our screen. These include NcSNF1, NcPHO85, NcGSK3, NcPKA, the PSK2 homologue and NcATG1 proteins. However, we did not identify some other protein kinases already described as regulators of glycogen metabolism, such as the NDR kinase DBF-2 in *N. crassa* [15] and *S. cerevisiae* [39]. Another protein not identified in our screen is Rim15p, a kinase that acts downstream of PKA, the yeast mutant of which exhibits defects in glycogen and trehalose accumulation [40]. A series of protein kinases identified by Wilson et al. [39], in a screening of a strain deletion set implicated in glycogen metabolism regulation in yeast, was not identified either. We may speculate that the strategy used in this work, quantification of glycogen accumulated at a specific time (24 h of growth), impaired the identification of such kinases in our screen. On the other hand, we identified two protein kinases functionally characterized but with no known functions related to glycogen metabolism regulation. One is the protein NcIME-2, the knockout strain of which showed lower glycogen levels and higher glycogen synthase $\pm$ G6P activity ratio than the wild-type strain. This protein kinase was first identified in *S. cerevisiae* as required in the meiotic cell cycle, but more recent studies revealed that this kinase displays multiple cellular functions beyond meiosis [41]. In *N. crassa*, NcIME-2 was demonstrated to be involved in the inhibition of protoperithecia formation under low availability of nitrogen. Microarray analysis revealed that this kinase regulates, under nitrogen starvation conditions, genes involved in a variety of cellular functions, including metabolism [36]. In present study, we demonstrated that the *ime-2*^{KO} strain exhibited a GSN $\pm$ G6P activity ratio higher than that of the wild-type strain, although this enzyme was not predicted to be an NcIME-2 phosphorylation target, as described by Hutchison et al. [36]. The other one is the NcNIMA (never-in-mitosis A) protein kinase, first identified in *Aspergillus nidulans* as required for the mitotic entry causing G₂ arrest [42]. More recently, this kinase was demonstrated to regulate interphase microtubules, indicating that it could integrate cell growth and development with mitotic regulation in *A. nidulans* [43]. In *N. crassa*, NIMA was demonstrated in the present study to regulate glycogen metabolism; the *nima*^{KO} strain accumulated higher levels of glycogen at the early phase of vegetative growth when the cells are actively engaged in mitotic division and degrade glycogen at later times of growth. Together with NcPHO85, a kinase involved in cell cycle progression, the identification of NcNIMA led us to speculate that the energy provided by glycogen metabolism could be connected to cell growth and development in *N. crassa*.

NcSNF1 as a kinase that promotes GSN phosphorylation

We demonstrated in the present study that the *Ncsnf1*^{KO} strain accumulated higher levels of glycogen compared with the wild-type strain. The result was corroborated by a combination of assays including the higher GSN $\pm$ G6P activity ratio, which means less phosphorylated GSN and therefore more active enzyme, and less phosphorylated GSN isoforms. Altogether, this led us to conclude that, in the wild-type strain, the NcSNF1 kinase promotes phosphorylation of glycogen synthase either directly or indirectly by inactivating a phosphatase or activating another kinase, or both. This protein kinase was identified in *S. cerevisiae* as a protein required for growth on a less preferred carbon source, such as sucrose [44]. Together with AMPK,

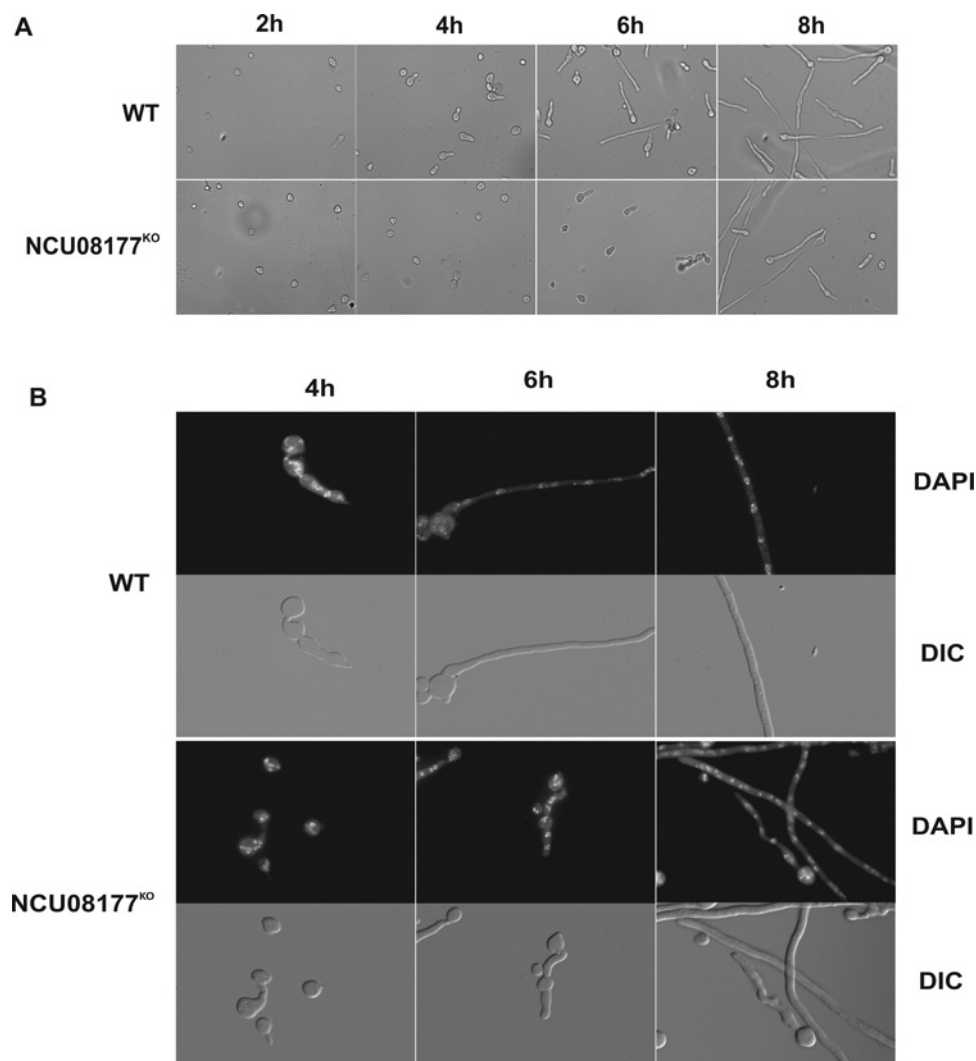


Figure 6 Conidia germination in the mutant strain NCU08177^{KO}

(A) Conidia (10^7 /ml) from wild-type and mutant strains were inoculated into liquid VM medium plus 2% sucrose and aliquots were collected at the indicated times. Images were obtained using the microscope Axio Imager.A2 (Zeiss) with $\times 40$ magnification. (B) Conidia were inoculated on to a coverslip, grown in liquid VM medium plus 2% sucrose for different times, and stained with DAPI. Images were obtained using the microscope Axio Imager.A2 with $\times 100$ magnification.

the mammalian homologue, this kinase has been extensively characterized in different organisms and, besides its role in carbon repression, it is described as regulating the expression of a large set of genes by phosphorylation of either transcription factors or metabolic enzymes, or regulation of transcription by a chromatin-based mechanism [45,46]. The role of the *S. cerevisiae* Snf1p in the regulation of glycogen metabolism was reported for the first time by Hardy et al. [32]. Yeast *snf1* mutants are not able to accumulate glycogen, which correlated with hyperphosphorylation of Gsy2p, as shown by the low $\pm$ G6P activity ratio. *Snf1* is also required to maintain glycogen stores [33]. What could explain the opposite results between yeast and *N. crassa* with regard to glycogen metabolism regulation by NcSNF1? Members of the SNF1/AMPK family are heterotrimers composed of a catalytic α (Snf1 in yeast), and regulatory β (Gal83, Sip1 or Sip2 in yeast) and γ (Snf4 in yeast) subunits [38]. In *N. crassa*, the products of the ORFs NCU03837, annotated as the Snf1 kinase complex β -subunit Gal83, and NCU01471, annotated as nuclear protein SNF4, are the β - and γ -subunit orthologous proteins, respectively. The β subunits control the

subcellular localization of Snf1 [47] and probably control access of the kinase to different substrates. Gal83 and Sip2 contain a conserved glycogen-binding domain (GBD) and bind glycogen *in vivo* [48]. The ORF NCU03837 product is a protein with a GBD [48]. Although its ability to bind glycogen has not been demonstrated yet, the domain has several conserved amino acid residues at key positions, which led us to suppose that the protein is able to bind glycogen. The SNF1/AMPK proteins are described as being activated via phosphorylation by upstream kinases and dephosphorylated by protein phosphatases [38]. A blast search using the yeast protein kinases homologues as a query in the *N. crassa* genome database retrieved the ORF NCU06177 and NCU03523 products. The glycogen accumulated by the NCU06177^{KO} strain during growth was similar to the wild-type strain whereas the levels in the NCU03523^{KO} strain were closer to those in the *Ncsnf1*^{KO} strain. These results led us to conclude that NcSNF1 may be phosphorylated by the NCU03523 product. We therefore identified a putative kinase that activates NcSNF1 by phosphorylation; however, the NcSNF1 activation may not correlate with GSN phosphorylation.

In addition to phosphorylation control on Gsy2p, the *S. cerevisiae* Snf1 also controls glycogen accumulation by regulating the expression of the GSN gene (*GSY2*); gene expression in a *snf1* strain was approximately 50 % of the wild-type level [32]. In *N. crassa*, we demonstrated in the present study that GSN expression was not regulated by NcSNF1, although it did regulate the gene encoding the debranching enzyme (*gdn*). The findings described in the present study support a role for NcSNF1 in regulating glycogen accumulation in *N. crassa* through GSN phosphorylation, but the molecular mechanisms are unexpectedly different from those described in yeast. More work will be necessary to elucidate how the regulatory pathway involving NcSNF1 functions in the regulation of glycogen metabolism in *N. crassa*.

AUTHOR CONTRIBUTION

Thiago de Souza Candido and Ana Paula Felício performed the screening of the mutant strains. Thiago de Souza Candido quantified the glycogen synthase activity under the supervision of Fernanda Zanolli Freitas and performed the 2D-PAGE experiments together with Ana Paula Felício. Rodrigo Duarte Gonçalves performed the experiments for trehalose and glycogen accumulation during growth and Fernanda Barbosa Cupertino carried out the gene expression analysis. Thiago de Souza Candido and Ana Carolina Gomes Vieira de Carvalho carried out the microscopic experiments. Maria Célia Bertolini co-ordinated the study and wrote the paper.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Peter J. Roach, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, U.S.A. for reviewing the manuscript and Dr Rubens Monti, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara for help in trehalose quantification.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) by grants to M.C.B. T.S.C. is a graduate fellow from FAPESP, F.B.C. and F.Z.F. are postdoctoral fellows from FAPESP, R.D.G. is a postdoctoral fellow from CNPq, A.P.F. was a postdoctoral fellow from CNPq, A.C.G.V.C. was an undergraduate fellow from FAPESP and M.C.B. is a CNPq fellow.

REFERENCES

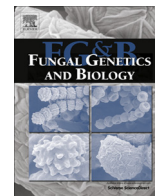
- Roach, P. J., Depaoli-Roach, A. A., Hurley, T. D. and Tagliabacci, V. S. (2012) Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. *Biochem. J.* **441**, 763–787 [CrossRef PubMed](#)
- Bertolini, M. C., Freitas, F. Z., de Paula, R. M., Cupertino, F. B. and Gonçalves, R. D. (2012) Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa*. In *Biocommunication of Fungi* (Witzany, G., ed.), pp. 39–55. Springer, Berlin [CrossRef](#)
- Wilson, W. A., Roach, P. J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F. J., Eydallin, G., Viale, A. M. and Pozueta-Romero, J. (2010) Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 952–985 [PubMed](#)
- Téllez-Iñón, M. T., Terenzi, H. and Torres, H. N. (1969) Interconvertible forms of glycogen synthetase in *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* **191**, 765–768 [CrossRef PubMed](#)
- Rothman-Denes, L. B. and Cabib, E. (1971) Glucose-6-phosphate dependent and independent forms of yeast glycogen synthetase: their properties and interconversions. *Biochemistry* **10**, 1236–1242 [CrossRef PubMed](#)
- Roach, P. J., Skurat, A. V. and Harris, R. A. (2001) Regulation of glycogen metabolism. In *Handbook of Physiology: the Endocrine Pancreas and Regulation of Metabolism* (Jefferson, L. S. and Cherrington, A. D., eds), vol. II, pp. 609–647. Oxford University Press, Oxford
- Roach, P. J. (1990) Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *FASEB J.* **4**, 2961–2968 [PubMed](#)
- Rutter, J., Probst, B. L. and McKnight, S. L. (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* **111**, 17–28 [CrossRef PubMed](#)
- Huang, D., Moffat, J., Wilson, W. A., Moore, L., Cheng, C., Roach, P. J. and Andrews, B. (1998) Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity *in vitro* and *in vivo*: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3289–3299 [PubMed](#)
- 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. et al. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**, 859–868 [CrossRef PubMed](#)
- Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Freitas, F. Z., Luchessi, A. D. and Bertolini, M. C. (2011) A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, M111.007963 [PubMed](#)
- Blom, N., Sicheritz-Pontén, T., Gupta, R., Gammeltoft, S. and Brunak, S. (2004) Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics* **4**, 1633–1649 [CrossRef PubMed](#)
- Dickman, M. B. and Yarden, O. (1999) Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol.* **26**, 99–117 [CrossRef PubMed](#)
- Park, G., Servin, J. A., Turner, G. E., Altamirano, L., Colot, H. V., Collopy, P., Litvinkova, L., Li, L., Jones, C. A., Diala, F. G. et al. (2011) Global analysis of serine-threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **10**, 1553–1564 [CrossRef PubMed](#)
- Dvash, E., Kra-Oz, G., Ziv, C., Carmeli, S. and Yarden, O. (2010) The NDR kinase DBF-2 is involved in regulation of mitosis, conidial development, and glycogen metabolism in *Neurospora crassa*. *Eukaryot. Cell* **9**, 502–513 [CrossRef PubMed](#)
- Harvey, K. and Tapon, N. (2007) The Salvador–Warts–Hippo pathway: an emerging tumour-suppressor network. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 182–191 [CrossRef PubMed](#)
- Lichius, A., Lord, K. M., Jeffree, C. E., Oborny, R., Boonyarungsrit, P. and Read, N. D. (2012) Importance of MAP kinases during protoperithelial morphogenesis in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE* **7**, e42565 [CrossRef PubMed](#)
- McCluskey, K. (2003) The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv. Appl. Microbiol.* **52**, 245–262 [CrossRef PubMed](#)
- Colot, H. V., Park, G., Turner, G. E., Ringelberg, C., Crew, C. M., Litvinkova, L., Weiss, R. L., Borkovich, K. A. and Dunlap, J. C. (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 10352–10357 [CrossRef PubMed](#)
- Vogel, H. J. (1956) A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* **13**, 42–43
- Hardy, T. A. and Roach, P. J. (1993) Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **268**, 23799–23805 [PubMed](#)
- Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**, 422–427 [CrossRef PubMed](#)
- Neves, M. J., Jorge, J. A., François, J. M. and Terenzi, H. F. (1991) Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and on the induction of thermotolerance in *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.* **183**, 19–22 [CrossRef](#)
- Zimmermann, N. A., Terenzi, H. F. and Jorge, J. A. (1990) Purification and properties of an extracellular conidial trehalase from *Humicola grisea* var. *thermoidea*. *Biochim. Biophys. Acta* **1036**, 41–46 [CrossRef PubMed](#)
- Thomas, J. A., Schlender, K. K. and Lerner, J. (1968) A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including as improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. *Anal. Biochem.* **25**, 486–499 [CrossRef PubMed](#)
- Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M. and Russo, V. E. A. (1990) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newslett.* **37**, 41–43
- de Paula, R., de Pinho, C. A., Terenzi, H. F. and Bertolini, M. C. (2002) Cloning and molecular characterization of the *gsn* cDNA encoding glycogen synthase in *Neurospora crassa*. *Mol. Genet. Genomics* **267**, 241–253 [CrossRef PubMed](#)
- Noventa-Jordão, M. A., Polizeli, M. L. T. M., Bonini, B. M., Jorge, J. A. and Terenzi, H. F. (1996) Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. *FEBS Lett.* **378**, 32–36 [CrossRef PubMed](#)
- Wilson, W. A., Mahrenholz, A. M. and Roach, P. J. (1999) Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7020–7030 [PubMed](#)
- Zhang, W., DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1993) Mechanisms of multisite phosphorylation and inactivation of rabbit muscle glycogen synthase. *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 219–225 [CrossRef PubMed](#)
- Freitas, F. Z., de Paula, R. M., Barbosa, L. C., Terenzi, H. F. and Bertolini, M. C. (2010) cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. *Fungal Genet. Biol.* **47**, 43–52 [CrossRef PubMed](#)
- Hardy, T. A., Huang, D. and Roach, P. J. (1994) Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **269**, 27907–27913 [PubMed](#)
- Wang, Z., Wilson, W. A., Fujino, M. A. and Roach, P. J. (2001) 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.* **21**, 5742–5752 [CrossRef PubMed](#)

- 34 Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y. and Ohsumi, Y. (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **192**, 245–250 [CrossRef PubMed](#)
- 35 Smith, H. E. and Mitchell, A. P. (1989) A transcriptional cascade governs entry into meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 2142–2152 [PubMed](#)
- 36 Hutchison, E. A., Bueche, J. A. and Glass, N. L. (2012) Diversification of a protein kinase cascade: IME-2 is involved in nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Genetics* **192**, 467–482 [CrossRef PubMed](#)
- 37 Pu, R. T., Xu, G., Wu, L., Vierula, J., O'Donnell, K., Ye, X. S. and Osmani, S. A. (1995) Isolation of a functional homolog of the cell cycle-specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. *J. Biol. Chem.* **270**, 18110–18116 [CrossRef PubMed](#)
- 38 Gillebert, R., Swinnen, E., Wen, J., Vandesteene, L., Ramon, M., Norga, K., Rolland, F. and Winderickx, J. (2011) The AMPK/SNF1/SnRK1 fuel gauge and energy regulator: structure, function and regulation. *FEBS J.* **278**, 3978–3990 [CrossRef PubMed](#)
- 39 Wilson, W. A., Wang, Z. and Roach, P. J. (2002) Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: implication of the vacuole as a determinant of glycogen level. *Mol. Cell. Proteomics* **1**, 232–242 [CrossRef PubMed](#)
- 40 Reinders, A., Bürckert, N., Boller, T., Wiemken, A. and De Virgilio, C. (1998) *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes Dev.* **12**, 2943–2955 [CrossRef PubMed](#)
- 41 Irrniger, S. (2011) The Ime2 protein kinase family in fungi: more duties than just meiosis. *Mol. Microbiol.* **80**, 1–13 [CrossRef PubMed](#)
- 42 Oakley, B. R. and Morris, N. R. (1983) A mutation in *Aspergillus nidulans* that blocks the transition from interphase to prophase. *J. Cell Biol.* **96**, 1155–1158 [CrossRef PubMed](#)
- 43 Govindaraghavan, M., McGuire Anglin, S. L., Shen, K. F., Shukla, N., De Souza, C. P. and Osmani, S. A. (2014) Identification of interphase functions for the NIMA kinase involving microtubules and the ESCRT pathway. *PLoS Genet.* **10**, e1004248 [CrossRef PubMed](#)
- 44 Carlson, M., Osmond, B. C. and Botstein, D. (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* **98**, 25–40 [PubMed](#)
- 45 Hedbacker, K. and Carlson, M. (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci.* **13**, 2408–2420 [CrossRef PubMed](#)
- 46 Zhang, M., Galdieri, L. and Vancura, A. (2013) The Yeast AMPK homolog SNF1 regulates acetyl coenzyme A homeostasis and histone acetylation. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 4701–4717 [CrossRef PubMed](#)
- 47 Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S. and Carlson, M. (2001) Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* **15**, 1104–1114 [CrossRef PubMed](#)
- 48 Wiatrowski, H. A., Van Denderen, B. J., Berkey, C. D., Kemp, B. E., Stapleton, D. and Carlson, M. (2004) Mutations in the gal83 glycogen-binding domain activate the snf1/gal83 kinase pathway by a glycogen-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 352–361 [CrossRef PubMed](#)

Received 24 July 2014/22 September 2014; accepted 25 September 2014

Published as BJ Immediate Publication 25 September 2014, doi:10.1042/BJ20140942

Anexo II



Regular Articles

Regulation of glycogen metabolism by the CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins in *Neurospora crassa*. The role of CRE-1 as the central transcriptional regulator



Fernanda Barbosa Cupertino¹, Stela Virgilio¹, Fernanda Zanolli Freitas, Thiago de Souza Candido, Maria Célia Bertolini*

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, 14800-060 Araraquara, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 January 2015

Revised 30 March 2015

Accepted 31 March 2015

Available online 16 April 2015

Keywords:

Neurospora crassa

Glycogen

Gene expression

CRE-1

ChIP-qPCR

ABSTRACT

The transcription factor CreA/Mig1/CRE-1 is a repressor protein that regulates the use of alternative carbon sources via a mechanism known as Carbon Catabolite Repression (CCR). In *Saccharomyces cerevisiae*, Mig1 recruits the complex Ssn6-Tup1, the *Neurospora crassa* RCM-1 and RCO-1 orthologous proteins, respectively, to bind to promoters of glucose-repressible genes. We have been studying the regulation of glycogen metabolism in *N. crassa* and the identification of the RCO-1 corepressor as a regulator led us to investigate the regulatory role of CRE-1 in this process. Glycogen content is misregulated in the *rco-1*^{KO}, *rcm-1*^{RIP} and *cre-1*^{KO} strains, and the glycogen synthase phosphorylation is decreased in all strains, showing that CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins are involved in glycogen accumulation and in the regulation of GSN activity by phosphorylation. We also confirmed the regulatory role of CRE-1 in CCR and its nuclear localization under repressing condition in *N. crassa*. The expression of all glycogenic genes is misregulated in the *cre-1*^{KO} strain, suggesting that CRE-1 also controls glycogen metabolism by regulating gene expression. The existence of a high number of the *Aspergillus nidulans* CreA motif (5'-SYGGRG-3') in the glycogenic gene promoters led us to analyze the binding of CRE-1 to some DNA motifs both *in vitro* by DNA gel shift and *in vivo* by ChIP-qPCR analysis. CRE-1 bound *in vivo* to all motifs analyzed demonstrating that it down-regulates glycogen metabolism by controlling gene expression and GSN phosphorylation.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Microorganisms can grow in a variety of environmental conditions due to their wide range of adaptative responses that ensure survival and their use of energy-saving mechanisms. Nutrient responses can influence different regulatory mechanisms, including those related to the use of carbon sources. In general, filamentous fungi use glucose as their preferred carbon source while the alternative sugar metabolizing enzymes are repressed in a mechanism known as Carbon Catabolite Repression (CCR) (Ruijter and Visser, 1997; Vinuselvi et al., 2012). In recent years, numerous studies have demonstrated the importance of CCR mechanism, especially in the secretory control of hydrolytic enzymes by

industrial microorganisms such as *Trichoderma reesei* (*Hypocrea jecorina*) and *Aspergillus* species (reviewed in Aro et al., 2005). The production of cellulolytic and xylanolytic enzymes is regulated by glucose through the action of the transcription factor CreA (*Aspergillus nidulans*), CRE-1 (*Neurospora crassa*) or CRE1 (*T. reesei*). This transcription factor is a repressor protein that regulates the transcription of genes related to the use of alternative carbon sources when glucose is present (de Vries et al., 1999; Mach-Aigner et al., 2008; Sun and Glass, 2011).

The action of the C₂H₂-zinc finger protein CreA/CRE-1/Mig1 is well conserved among different fungi. CreA/CRE-1 binds to the 5'-SYGGRG-3' motif (Sun and Glass, 2011; Kulmburg et al., 1993) that displays strong identity to the motif recognized by Mig1 (5'-SYGGGG-3') (Lundin et al., 1994). However, the regulation of Cre-mediated repression is complex and apparently varies among fungi. Transcriptional and post-transcriptional events regulate *A. nidulans* CreA function (Strauss et al., 1999) and phosphorylation regulates *H. jecorina* CRE1 activity (Cziferszky et al., 2002). Although protein kinases that phosphorylate this transcription

* Corresponding author at: Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Rua Professor Francisco Degni 55, 14800-060 Araraquara, SP, Brazil. Tel.: +55 16 3301 9675; fax: +55 16 3322 2308.

E-mail address: mcbertol@iq.unesp.br (M.C. Bertolini).

¹ Both authors contributed equally to this work.

factor are unknown, the involvement of the AMPK/Snf1 kinase in the regulation by phosphorylation has been demonstrated (Vautard-Mey and Fèvre, 2000; Ostling and Ronne, 1998). This kinase phosphorylates *in vitro* the yeast Mig1, however the own *H. jecorina* CRE1 was not phosphorylated by the same kinase (Cziferszky et al., 2003). The cellular compartmentalization of CreA/CRE-1/Mig1 also differs among fungi. Mig1 location was initially reported to be glucose-dependent, being nuclear in conditions of CCR and translocating to the cytoplasm under glucose-limiting conditions (De Vit et al., 1997). The *A. nidulans* GFP-tagged CreA location was demonstrated to be nuclear in the presence of high glucose (Vautard-Mey et al., 1999; Roy et al., 2008; Brown et al., 2013), however the cytoplasmic localization was strongly influenced by the nature of the derepressing carbon source (Brown et al., 2013). Similar results have been described for the *Fusarium oxysporum* GFP-Cre1 fusion protein, which showed nuclear localization during growth on ethanol, a derepressing condition (Jonkers and Rep, 2009). More recently, the *T. reesei* CRE1 was described to recycle between nucleus and cytoplasm depending on the carbon source (Lichius et al., 2014).

This transcription factor plays a direct role controlling the expression of a large number of genes encoding cell wall degrading enzymes. In *T. reesei* and *Aspergillus* species, CRE1/CreA, respectively, regulates the gene expression of cellulases, hemicellulases and xylanases (Ilmén et al., 1997; Orejas et al., 1999; reviewed in Ruijter and Visser, 1997), while in *N. crassa*, deletion of the *cre-1* gene led to an increase in the production of hydrolytic enzymes involved in cellulose degradation (Sun and Glass, 2011). We have been investigating the regulatory mechanisms involved in *N. crassa* glycogen metabolism and in a screening of a mutant strains set in transcription factors we identified the corepressor RCO-1 protein (Gonçalves et al., 2011). RCO-1 was first identified in *N. crassa* by Yamashiro et al. (1996) as a protein that mediates the repression of conidiation and it is orthologous to the *Saccharomyces cerevisiae* Tup1, a protein component of the Ssn6-Tup1 complex (Keleher et al., 1992). This complex mediates the repression of genes related to different cellular processes, depending on the DNA-binding protein that recruits it to DNA. In yeast, such complex regulates glucose-repressible genes in a Mig1-dependent way, a process involving chromatin remodeling and nucleosome compaction (Treitel and Carlson, 1995; reviewed in Smith and Johnson, 2000).

In *N. crassa*, RCM-1 is the *S. cerevisiae* Ssn6 orthologous protein and, together with RCO-1, may have a role in regulating glucose-repressible genes. Lee and Ebbole (1998) demonstrated the regulation of the *N. crassa con-10* gene by RCO-1 in a medium without glucose. More recently, the RCO-1-RCM-1 complex was described to have a role in photoadaptation (Olmedo et al., 2010) and was identified as a partner of the transcription factor CSP1, a clock-controlled repressor (Sancar et al., 2011). The identification of RCO-1 as likely regulating the glycogen metabolism in *N. crassa* and the high number of CreA motifs (5'-SYGGRG-3') in the promoter region of genes codifying for glycogen metabolism enzymes prompted us to start investigating the regulatory role of CRE-1, RCO-1 and RCM-1 in the regulation of glycogen metabolism in *N. crassa*.

In this report, we demonstrate that CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins regulate glycogen metabolism by a process in which CRE-1 may play a central role since the gene expression of all glycogen enzymes was misregulated in the *cre-1^{KO}* mutant strain. Gel mobility assays showed that the recombinant GST::CRE-1 recognized and bound specifically to the *gsn* and *gpn* promoters *in vitro* and ChIP-qPCR analysis confirmed CRE-1 binding to all glycogenic gene promoters. In addition, CRE-1::GFP bound *in vivo* to its own promoter but was not able to bind to a DNA fragment lacking a CRE-1 motif.

2. Materials and methods

2.1. *Neurospora crassa* strains and growth conditions

The *N. crassa* FGSC#9718 (*mat a*, *mus-51::bar*), *cre-1^{KO}* (FGSC#10372), *rco-1^{KO}* (FGSC#11371) and *rcm-1^{RIP}* (FGSC#10215) strains were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC) (McCluskey, 2003). The *his-3::Pn-cre-1-gfp* strain was a gift from N. L. Glass, University of California, Berkeley, CA, USA (Sun and Glass, 2011). All strains were maintained on solid Vogel's minimal (VM) medium, pH 5.8 (Vogel, 1956) containing 2% sucrose. Conidia from 10-day culture were collected, suspended in sterile water and counted. For vegetative growth, 10⁷ conidia/mL or hyphae homogenates (for *rco-1^{KO}* and *rcm-1^{RIP}* strains) were first germinated in 60 mL of VM medium +2% sucrose at 30 °C, 250 rpm, for 24 h. After this period, cultures were harvested and the mycelia were frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C. For growth in different carbon sources, 10⁹ conidia/mL were first germinated in 1 L of VM medium +2% fructose (non-repressing carbon source) (Ziv et al., 2008) at 30 °C, 250 rpm, for 24 h. After this period, cultures were harvested and the mycelia were divided in four samples: one was frozen in liquid nitrogen and stored at –80 °C for further processing (control sample) and the remaining were transferred into 400 mL of fresh VM medium containing 2% of glucose, or xylose or glycerol. Samples (125 mL) were harvested after incubation for 2, 4, and 8 h and processed as before. To analyze the effect of 2-deoxy-D-glucose (2-DG) in catabolic repression, conidia (10⁷/mL) from wild-type and *cre-1^{KO}* strains were inoculated into 20 mL of VM medium containing 1% sucrose, or glucose or xylose with or without 1 mM 2-DG and incubated at 30 °C, 250 rpm, for 24 h. The mycelia were harvested, filtered and dried at 98 °C for 16 h. The biomass weight was expressed as a percentage relative to samples grown without 2-DG.

2.2. Glycogen and protein quantification

Mycelia pads were ground to a fine powder in a pre-chilled mortar in liquid nitrogen and extracted in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM TCLK, 1 mM benzamidine, and 1 µg/mL each of pepstatin and aprotinin). Cellular extracts were clarified by centrifugation at 10,000g, for 10 min at 4 °C, and the supernatants were used for glycogen and protein quantifications. Glycogen content was measured according to Freitas et al. (2010). Briefly, 100 µL of the crude extract was precipitated with 20% TCA (final concentration) and centrifuged (5000g, 10 min, 4 °C). The glycogen in the supernatant was precipitated with 500 µL of 95% cold ethanol, collected by centrifugation, washed twice with 66% ethanol, dried and digested with α-amylase (10 mg/mL) and amyloglucosidase (30 mg/mL). Free glucose was measured using a glucose oxidase kit and the glycogen content was normalized to total protein. Total protein was quantified by the Hartree (1972) method, using BSA as standard.

2.3. Glycogen synthase activity

The activity of glycogen synthase was determined by [¹⁴C]-glucose incorporation, as described by Thomas et al. (1968). Briefly, mycelia pads were ground to a fine powder in nitrogen liquid in a pre-chilled mortar and 200 mg of each sample was extracted in 1 mL of lysis buffer (50 mM Tris HCl, pH 7.5, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 1 mM β-mercaptoethanol and 1 µg/mL each of aprotinin, pepstatin and TLCK). Cellular extracts were clarified (7000g, 10 min, 4 °C) and total proteins were quantified (Hartree, 1972) using BSA as standard. To assay

glycogen synthase activity, a volume of 15 μ L, containing approximately 30 μ g of total protein, was added to 30 μ L of reaction buffer [50 mM Tris–HCl, pH 7.8, 20 mM EDTA, 25 mM NaF, 0.67% glycogen, 3 mM UDP-[14 C]-glucose (1.8 mCi/mmol), with or without 7.2 mM glucose-6-phosphate (G6P)] and incubated at 30 °C during 15 min. After incubation, 75 μ L of each reaction were withdrawn, placed on Whatmann 3 MM filter paper and washed with cold ethanol (70%) under stirring for 15 min. Two additional washes in ethanol (70%) were done, the first for 60 min and the second for 15 min. After washing, the filters containing the reaction product were dried and radioactivity was quantified in a LS 6500 Scintillation Counter (Beckman CoulterTM). One unit of glycogen synthase activity was defined as the amount of enzyme that transferred 1 μ mol of glucose to glycogen per minute.

2.4. RNA isolation and gene expression analysis

Total RNA was prepared from mycelia samples according to Sokolovsky et al. (1990) method. RNA (10 μ g) from each sample was fractionated on a 2.2 M formaldehyde 1.2% (w/v) agarose gel, stained with ethidium bromide and visualized under UV light to assess the rRNAs integrity. Gene expression analysis was performed by quantitative PCR (qPCR). RNA samples (10 μ g) were

treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) and subjected to cDNA synthesis by using the SuperScript III First Strand Synthesis kit (Invitrogen) and oligo (dT) primers, according to the manufacturers' instructions. qPCR was performed on the StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific primers for glycogen synthase (*gsn*), glycogen phosphorylase (*gpn*), glycogenin (*gnn*), 1,4- α -glucan branching enzyme (*gdn*), glycogen debranching enzyme (*gdn*) and β -tubulin (*tub-2*) mRNA amplicons (Table 1). Five biological replicates were run and the data were analyzed using the StepOne™ Software v2.1 (Applied Biosystems) in the relative quantification standard curve method. The fluorescent dye ROX™ was used as a passive reference to normalize the SYBR green reporter dye fluorescent signal. All PCR products had melting curves indicating the presence of a single amplicon. The tubulin β chain (*tub-2* gene, NCU04054) was used as the endogenous control in all experiments.

2.5. Cellular localization

For microscopy experiments, conidia from the *cre-1*^{KO} complemented strain (*his-3::Pn-cre-1-gfp*) were inoculated onto a coverslip and incubated in liquid VM containing 1% sucrose for 16 h at

Table 1
Oligonucleotides used in this study.

Primers	Sequences ^{a, b} (5' → 3')	Source	Name	Positions
8807-F	ATGCAACGCGTACAGTCAGCAG	NCU08807	–	+1 to +22
8807-R	CAATCTTACAACCGGTCCATCATCTC	NCU08807	–	+1273 to +1293
qGSN-F	TACCAAGCATCACCACCACTCT	NCU06687	–	+1541 to +1564
qGSN-R	TGCTCGCGGCTCTCTGGGTAAAT	NCU06687	–	+1689 to +1712
qGPN-F	TGCCAATATCGAAATCACC CGCA	NCU07027	–	+2247 to +2061
qGPN-R	TCTCGATGGCTCAAACACCTTGA	NCU07027	–	+2375 to +2398
qGNN-F	ACAAGCACCCGAACCCAC	NCU06698	–	+1134 to +1151
qGNN-R	AAGGTTGGGCGATGCTGT	NCU06698	–	+1234 to +1251
qRAMIF-F	TCTGCGATGCCGAGTTGT	NCU05429	–	+1487 to +1504
qRAMIF-R	ACTCGTTGCCCTCGAAGT	NCU05429	–	+1616 to +1633
qDESRAM-F	TGGCGGTAATCAAGCCA	NCU00743	–	+3779 to +3796
qDESRAM-R	TGAATTTGCCGCTTCGT	NCU00743	–	+3935 to +3952
4054Tub-F	CCTCCACCTTCGTCGGTAACTCC	NCU04054	–	+1091 to +1113
4054Tub-R	GGTACTGCTGGTACTCGGAGACG	NCU04054	–	+1254 to +1276
XLNR-FP2	TGAGGGTGAGAAAGTTGC	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 1	–2173 to –2156
XLNR-RP2	TATTCTGCAACGGAACCTCC	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 1	–2053 to –2035
SREBP-F2	CATGGGAGTATTCGTTGC	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 2	–1790 to –1773
GSN-FP4	CTGATTGGGAAAGGTCAGA	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 2	–1645 to –1627
emsaSTRE1-F	CACTGCACAGATCTGGAG	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 2	–1590 to –1573
emsaSTRE1-R	GAGACATCCATGGGCATT	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 2	–1429 to –1412
STRE2i-F	GCTTCAGTGAGGCCCGT	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 3	–350 to –333
STRE2i-R	GCAGATCAGGTCGACGTAGC	<i>pgsn</i>	<i>gsn</i> 3	–204 to –185
oligoCRE1-F	GAGGCCCGTT CCCCGCTT CCGGCCCG	<i>pgsn</i>	oligo <i>cre-1</i>	–342 to –316
oligoCRE1-R	CCGGCCCGGA AGCGGG AACGGGGCCCTC	<i>pgsn</i>	oligo <i>cre-1</i>	–342 to –316
pGPNNit-F1	CGGTGGGTGGTAGGTTGTG	<i>pgpn</i>	<i>gpn</i> 1	–2111 to –2093
pGPNNit-R1	CCGACCCGACTTTGCG	<i>pgpn</i>	<i>gpn</i> 1	–1938 to –1922
pGPNNit-F3	GTAGTATCACGGTTGGGC	<i>pgpn</i>	<i>gpn</i> 2	–1287 to –1270
pGPNNit-R3	ACCCCATTTGGCCCTCC	<i>pgpn</i>	<i>gpn</i> 2	–1122 to –1105
pGPNxlnr-F	CTAGCCCATCAAGGTACGTG	<i>pgpn</i>	<i>gpn</i> 3	–321 to –302
pGPNxlnr-R	CCTAGGTGGTCTCTGGTC	<i>pgpn</i>	<i>gpn</i> 3	–203 to –184
GNNp-F3	CTCGCCAAGTTAGTTCA	<i>pgnn</i>	<i>gnn</i>	–198 to –181
GNNp-R	CTACTTGACAATCACAAAATTC	<i>pgnn</i>	<i>gnn</i>	–19 to +3
DEBP-F1	TAATCTCACAGCGGTGC	<i>pgdn</i>	<i>gdn</i> 1	–1633 to –1616
DEBP-R1	GCTGACCGCAACAAGACC	<i>pgdn</i>	<i>gdn</i> 1	–1447 to –1430
DEBP-F2	GCCTGTTTCTGACGGGT	<i>pgdn</i>	<i>gdn</i> 2	–707 to –690
DEBP-R2	TTGGCTGTGATAGGACCG	<i>pgdn</i>	<i>gdn</i> 2	–551 to –534
BRANCH-FP3	GCCCTCCATGAAGCGAAGA	<i>pgbn</i>	<i>gbn</i>	–1215 to –1196
BRANCH-RP1	TGGTTGGGCTTCTGGGCG	<i>pgbn</i>	<i>gbn</i>	–1133 to –1116
pCRE1-F	GCAACGGAGTCTGAACCC	<i>pcr-1</i>	<i>cre-1</i>	–1226 to –1209
pCRE1-R	CAATACAATACGCAGCAC	<i>pcr-1</i>	<i>cre-1</i>	–1073 to –1056
qUbi-F	CGAGTCTTCGGATACGATTG	NCU05995	ubiquitin	+735 to +754
pUbi-R	CCATCCTCAACTGCTTAC	NCU05995	ubiquitin	+842 to +824

^a The *EcoRI* restriction site is underlined in the 8807-R sequence.

^b The ATG start codon and TAA stop codon in the NCU08807-F/R sequences are represented in bold and italic. Primers are positioned according to the ATG start codons. The nucleotides in bold in the oligonucleotides oligoCRE-1-F/R represent the CreA motif.

30 °C. After this time, the cells were transferred to the following media: VM without carbon source, VM plus 1% sucrose and VM plus 1% xylose and incubated for 1 h at 30 °C. Before transferring, the cells were washed in the same transfer media to remove traces of sucrose. After incubation, mycelia on the coverslips were fixed (3.7% formaldehyde, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7.0, 0.2% (v/v) tween 80), washed with phosphate buffered saline (PBS) and stained with 0.5 µg/mL DAPI for 5 min. The mycelia were washed again in PBS and examined in an AXIO Imager.A2 Zeiss microscope. Images were captured with the AxioCam MRm camera and processed using the AxioVision software. Further processing was done using Adobe Photoshop 7.0.

2.6. *cre-1* cDNA cloning and production and purification of the recombinant protein

The *N. crassa cre-1* gene (ORF NCU08807) encodes a 430 amino acid protein with a theoretical molecular mass of 47 kD. The entire *cre-1* cDNA fragment (1293 bp) was amplified from the pYADE5 cDNA plasmid library (Brunelli and Pall, 1993) with the oligonucleotides 8807-F and 8807-R (Table 1) and subcloned into the pMOSBlue cloning vector (GE Healthcare) leading to the pMOS-8807 plasmid. A ~1.3 kb *Bam*HI-*Eco*RI fragment was removed from pMOS-8807 and inserted into the pGEX-4T1 vector (GE Healthcare) resulting in the pGEX-8807 plasmid. For expression of the non-fused GST and the GST::CRE-1 recombinant protein, *Escherichia coli* Rosetta (DE3) pLysS cells harboring the pGEX-4T1 or pGEX-8807 plasmid constructions were used, respectively. Cells were grown at 37 °C in 1 L of LB medium to an OD₆₀₀ of 0.7 and induced with IPTG (final concentration 0.4 mM) for 4 h at 37 °C and 200 rpm. For purification, cells were suspended in buffer A (10 mM NaH₂PO₄, 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.3, 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1 mM DTT, 1 mM PMSF and 10 mM benzamidine) containing 0.5% Triton X-100 and 0.5% Tween 20 and lysed by sonication (5 cycles of 30 s sonication and 30 s on ice). After centrifugation, the supernatant was subjected to affinity chromatography on a GSTrap HP column (GE Healthcare) using the ÄKTA Prime purification system. The recombinant protein was eluted in buffer B (50 mM Tris-HCl, pH 8, 0, 10 mM glutathione) and dialyzed twice against 1 L of dialysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 100 mM KCl, 10% v/v glycerol, 1 mM EDTA and 0.5 mM DTT). The purified protein was analyzed by 10% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) followed by Coomassie Brilliant blue staining and quantified by the Hartree (1972) method using BSA as standard.

2.7. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

DNA-protein binding reactions were carried out in 30–80 µL of 1× binding buffer (25 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 20 mM KCl, 10% v/v glycerol, 1 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 12.5 mM benzamidine, and 5 µg/mL each of antipain and pepstatin A) containing 2 µg of poly(dI-dC). (dI-dC) as non-specific competitor and 3–10 µg of either GST or GST::CRE-1 recombinant protein. A radiolabeled DNA probe (~10⁴ cpm) was added and the reactions were incubated at room temperature for 20 min. Free probe was separated from DNA-protein complexes by electrophoresis on a native 5% polyacrylamide gel in 0.5× TBE buffer at 300 V, 10 mA and 10 °C. After electrophoresis, the gel was dried and autoradiographed. For competition assays, an excess of specific DNA competitor was added to the binding reactions 10 min prior to incubation with the radiolabeled probe.

2.8. DNA probe and competitors for EMSA

A high number of CreA motif (5'-SYGGRG-3') was identified in the 5'-flanking region of the *gsn*, *gpn*, *gmn*, *gbn* and *gdn* genes by

in silico analysis. To obtain the *gsn* and *gpn* probes, DNA fragments containing the CreA motif were amplified from genomic DNA using the oligonucleotides described in Table 1, in the presence of [α -³²P]-dATP (3000 Ci/mmol). The probes were purified on a 2% low-melting point agarose gel. The unlabeled probes were used as specific DNA competitors. A 27 bp DNA oligonucleotide was also used as a competitor after annealing the complementary oligonucleotides oligoCRE-1-F and oligoCRE-1-R (Table 1). The specific competitors were quantified by measuring the absorbance at 260 nm. For competition assays, the specific competitors and the dsDNA CRE-1 oligonucleotide were added to the binding reactions in 10–30-fold and 3–10-fold molar excess, respectively.

2.9. ChIP-qPCR analysis

Chromatin immunoprecipitation assays were performed as described by Tamaru et al. (2003) with modifications. Briefly, conidia from the *his-3::Pn-cre-1-gfp* strain were grown in 125 mL of liquid VM medium containing 2% sucrose at 30 °C, 250 rpm, for 24 h and the chromatin was fixed by adding formaldehyde to 1% final concentration, followed by incubation for 30 min at 30 °C and 250 rpm. Formaldehyde was quenched using 125 mM glycine, at 30 °C, 250 rpm, for 10 min. Sonicated chromatin prepared from each sample was pre-cleared with protein A Mag Sepharose (GE Healthcare) pre-blocked with 0.5% BSA in PBS and then immunoprecipitated with anti-GFP antibody (Sigma) and protein A Mag Sepharose. As a negative control, a mock reaction without antibody was run (no Ab). The DNA concentration was quantified and 25 ng of each reaction: input DNA, no Ab and IPs (immunoprecipitated DNAs with anti-GFP) were analyzed by absolute quantification by quantitative PCR (qPCR). qPCR was performed on the StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) using the Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and specific oligonucleotides for *gsn*, *gpn*, *gmn*, *gbn*, and *gdn* promoter regions (Table 1). A *cre-1* promoter region containing the CreA motif was used as positive control of binding and an ubiquitin region, lacking the motif were used as negative control of binding. All PCR products had melting curves indicating the presence of a single amplicon.

3. Results

3.1. CRE-1, RCO-1, and RCM-1 proteins regulate glycogen accumulation, glycogen synthase activity and expression of genes encoding glycogenic enzymes

We previously screened a set of *N. crassa* knockout strains in genes encoding transcription factors and identified the RCO-1 as a protein that regulates glycogen metabolism (Gonçalves et al., 2011). This protein is the *S. cerevisiae* Tup1 orthologue. In yeast, Tup1 requires Ssn6, the called Ssn6-Tup1 complex, which, together with the Mig1 transcription factor, acts as a repressor of glucose-repressible genes (Smith and Johnson, 2000). Since the *N. crassa* CRE-1, RCO-1 and RCM-1 proteins correspond to the *S. cerevisiae* Mig1, Tup1 and Ssn6 orthologous proteins, respectively, we investigated the glycogen metabolism in the corresponding knockout strains. The *rcm-1*^{RIP} is a mutant strain, in which the gene was partially inactivated by RIP (Repeat Induced Point Mutation); the knockout strain is not viable (Olmedo et al., 2010). Glycogen accumulation and *gsn* gene expression were previously analyzed in a wild-type strain of *N. crassa* during vegetative growth (30 °C), and the results showed higher levels after ~24 h of growth (de Paula et al., 2002). Here, we analyzed the glycogen content, the glycogen synthase phosphorylation (the rate-limiting enzyme in glycogen synthesis) and the expression of genes encoding the

glycogenic enzymes glycogenin (*gnn*), glycogen synthase (*gsn*), branching enzyme (*gbn*), glycogen phosphorylase (*gpn*), and debranching enzyme (*gdn*) in the *cre-1^{KO}*, *rco-1^{KO}* and *rcm-1^{RIP}* strains after 24 h of growth.

All mutant strains presented significant differences in glycogen accumulation compared to the wild-type strain (Fig. 1A). However, whereas the *cre-1^{KO}* strain showed increased glycogen levels (two times), the *rcm-1^{RIP}* strain showed a reduction of three times in glycogen content. The *rco-1^{KO}* strain showed only a slight increase in glycogen level, in agreement with our previous findings (Gonçalves et al., 2011). Glycogen synthase phosphorylation was analyzed in the presence and absence of the allosteric modulator G6P (–/+ G6P ratio), lower values corresponding to higher

phosphorylation and, then, less active enzyme. All mutant strains displayed higher ratio when compared to the wild-type strain showing that the enzyme is less phosphorylated, and then more active in the mutant strains (Fig. 1B). The relative gene expression was also analyzed for all genes encoding glycogenic enzymes (Fig. 1C). The *cre-1^{KO}* strain showed misregulation in the expression of all glycogenic genes. The CRE-1 protein appeared to act as a repressor of glycogen synthesis since *gsn*, *gbn* and *gnn* expression (genes encoding enzymes for the glycogen synthesis) was higher in the mutant strain than in the wild-type strain. In addition, *gpn* expression (encodes a degradation enzyme) was lower in the same strain, likely contributing to the high glycogen accumulated by the mutant strain (Fig. 1A). The *gnn* and *gpn* expression was

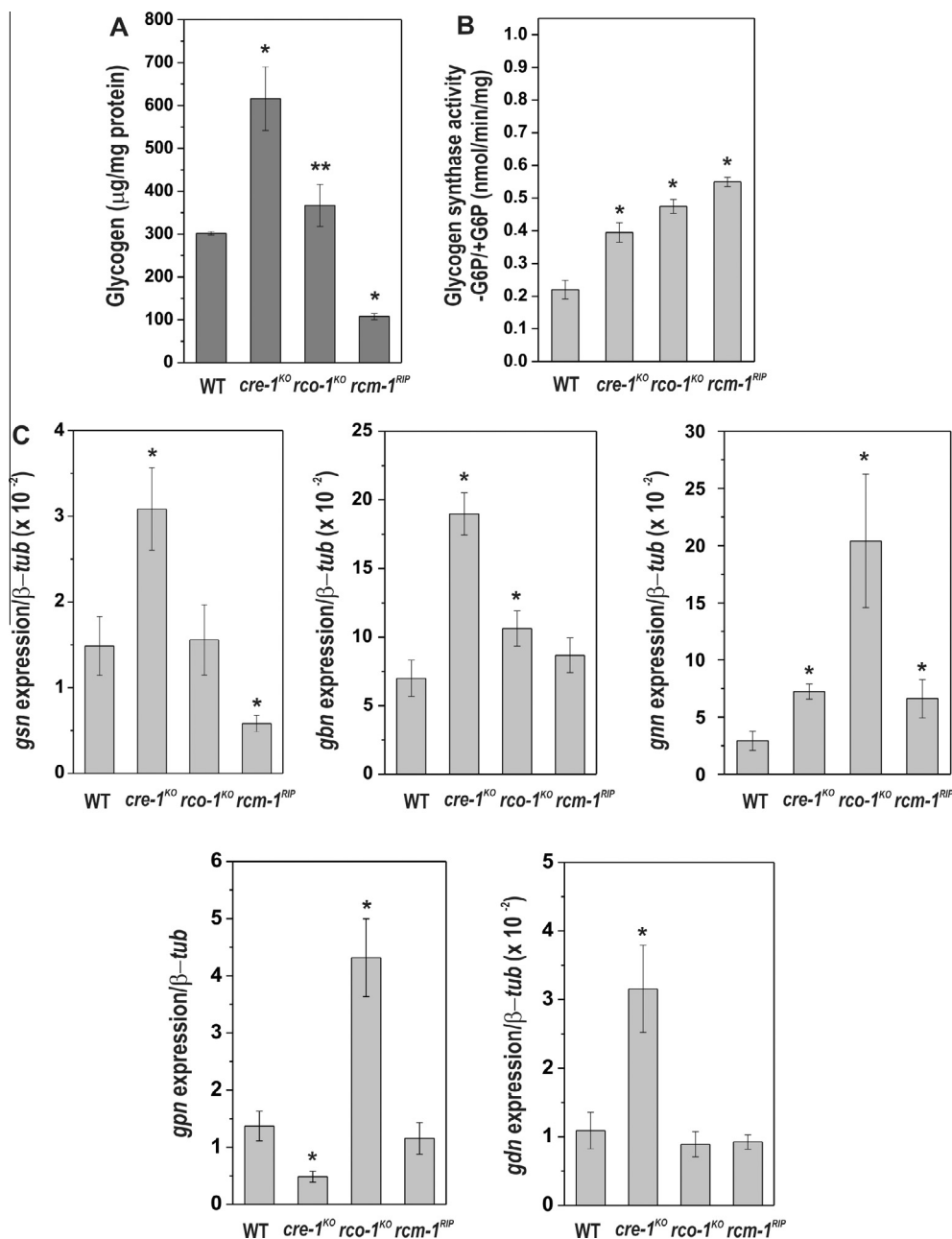


Fig. 1. Glycogen accumulation, glycogen synthase activity and expression of genes encoding glycogen metabolism enzymes under physiological growth. (A) Glycogen accumulation in wild-type and mutant strains. (B) Glycogen synthase activity (–G6P/+G6P ratio) in the same strains. (C) Gene expression analysis of genes *gsn* (NCU006687), *gpn* (NCU07027), *gnn* (NCU06698), *gbn* (NCU05429) and *gdn* (NCU00743) in the same strains. The expression of the tubulin *tub-2* gene (NCU04054) was used as the endogenous control for all genes. Mycelia were grown at 30 °C for 24 h in VM medium containing 2% sucrose. Results represent the average of 3–5 independent experiments. The asterisks indicate significant differences compared to the wild-type strain (*T*-test), **p* < 0.01 and ***p* < 0.05.

dramatically increased in the *rco-1*^{KO} strain, in agreement with previous results on *gpn* expression in this mutant strain (Bertolini et al., 2012). Finally, the *gpn*, *gpn* and *gdn* expression was not substantially changed in the *rco-1*^{RIP} strain and the gene expression results did not explain the levels of the glycogen accumulated by this strain. It is likely that the lower *gsn* gene expression contributed to the reduced glycogen levels in this mutant strain.

Based on these results, we concluded that the transcription factor CRE-1 could act as a repressor of the glycogen metabolism in *N. crassa*, likely by regulating the expression of genes encoding glyco-genic enzymes.

3.2. CRE-1 mediates repression of glycogen metabolism under carbon repressing and non-repressing conditions

Since the transcription factor CreA/CRE-1/Mig1 mediates the CCR mechanism in most fungi and CRE-1 regulates glycogen metabolism in *N. crassa* we decided to investigate whether the

regulation was dependent on the growth conditions. First, we confirmed that CRE-1 protein mediates CCR by growing the wild-type and *cre-1*^{KO} strains in VM medium containing either glucose or sucrose (for repressing condition) and in VM containing xylose (for non-repressing condition), in the absence and presence of 2-DG (Fig. 2A). This compound is a non-metabolizable glucose analog that can be phosphorylated but cannot be further isomerized. The wild-type strain showed reduced growth in xylose medium containing 2-DG while the growth of the mutant strain was unaffected by the presence of 2-DG. These results confirmed that, like in other fungi, *N. crassa* CRE-1 plays an important regulatory role in CCR.

To analyze whether the repressing and non-repressing carbon sources influenced the regulation of glycogen metabolism by CRE-1 protein, conidia were first grown for 24 h in fructose (derepressor carbon source) medium and then transferred to glucose (repressor carbon source), xylose or glycerol (non-repressing carbon sources). The *rco-1*^{KO} and *rco-1*^{RIP} mutant strains were included in this assay in order to assess whether RCO-1 and

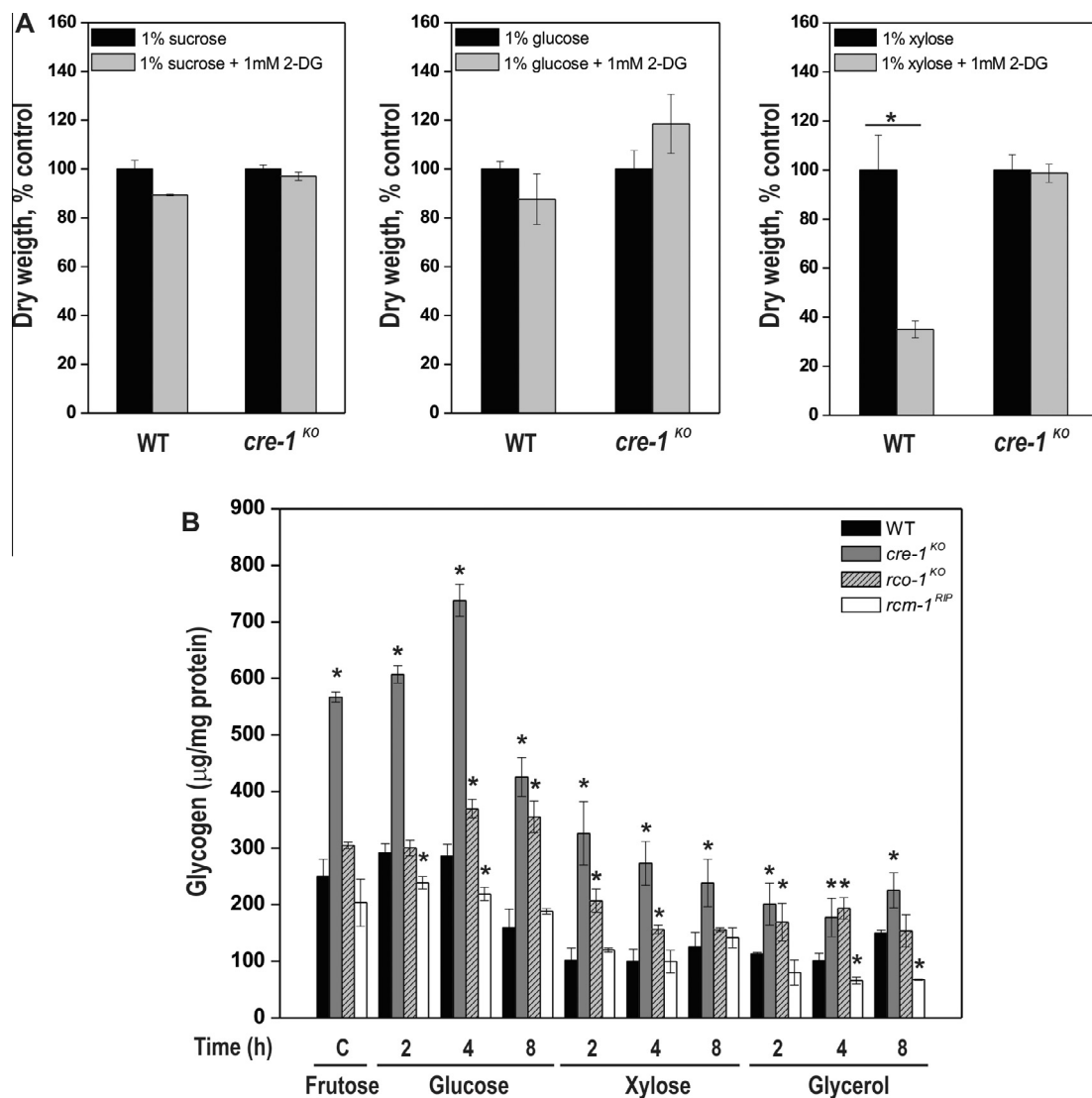


Fig. 2. Glycogen accumulation under different carbon sources. (A) Effect of 2-deoxy-D-glucose (2-DG) on the growth of wild-type and *cre-1*^{KO} mutant strains. Mycelia were grown for 24 h at 30 °C in VM medium containing 1% sucrose (left panel), glucose (middle panel) or xylose (right panel) in the absence or presence of 1 mM 2-DG. Mycelial mats were harvested, dried at 98 °C for 16 h and weighed. (B) Glycogen content in wild-type and mutant strains. Mycelia were grown at 30 °C for 24 h in VM medium containing 2% fructose (C, control) and then transferred to VM medium containing 2% glucose, xylose or glycerol. Mycelia were collected 2, 4 and 8 h after transferring. Results represent the average of at least three independent experiments. The asterisks indicate significant difference (*T*-test, *p* < 0.01) in the presence and absence of 2-DG (A), and differences between the mutants and wild-type strains in the same growth condition (B).

RCM-1 proteins were required, together with CRE-1, in the regulation. The Fig. 2B shows that the *cre-1*^{KO} strain accumulated the highest levels of glycogen regardless of the carbon source, indicating that CRE-1 negatively regulates glycogen metabolism under repressing and non-repressing growth conditions. However, the glycogen accumulation in the *cre-1*^{KO} was more pronounced in the presence of fructose and glucose, the preferable carbon source for glycogen accumulation. The glycogen accumulated by the *rco-1*^{KO} and *rcm-1*^{RIP} mutant strains followed the same pattern presented in Fig. 1A, with some variations. In general, the *rco-1*^{KO} strain showed slightly higher levels while the *rcm-1*^{RIP} strain showed slightly lower levels than those presented by the wild-type strain ($p < 0.01$). These results suggest that both RCO-1 and RCM-1 proteins may not have a role in the glycogen metabolism repression mediated by CRE-1. Although the *cre-1*^{KO} strain accumulated high levels of glycogen in the presence of glucose (repressing condition), the glycogen levels accumulated in the presence of glycerol (non-repressing condition) were very similar to those of the other mutant strains, mainly to the *rco-1*^{KO} strain. Finally, comparison of the different growth conditions, it was possible to observe that alternative carbon sources such as those used in this work (xylose or glycerol) are not good substrates for glycogen synthesis.

We analyzed the cellular localization of CRE-1 under repressing and derepressing conditions in a CRE-1::GFP complemented strain in which the protein expression is under control of the native promoter. For this, conidia were germinated in VM containing sucrose for 16 h and then transferred to medium containing sucrose (repressing condition) and media containing either xylose (non-repressing condition) or lacking any carbon source. In cells grown in sucrose and transferred to sucrose, the CRE-1::GFP localization was predominantly nuclear (Fig. 3A and B), as expected for a repressor carbon source such as sucrose. However, after 1 h of transfer to

medium containing xylose, CRE-1::GFP was detected in nuclei and the cytoplasm (Fig. 3C). In VM lacking any carbon source (C-free) the protein was localized both in the nuclei and cytoplasm after 1 h of transfer (Fig. 3D) and it was predominantly outside the nuclei after later time of transferring (4 h, Fig. 3E). The results demonstrated that CRE-1 protein is present in both the nucleus and the cytoplasm in derepressed and starved conditions, showing that the CRE-1 partial absence of nucleus may induce derepression of glucose-repressible genes. Although cycling was observed, complete absence of CRE-1 from the nucleus seems not be essential for depression in *N. crassa*. Our results were similar to those described for *A. nidulans* by Brown et al. (2013) but differed from those reported by Sun and Glass (2011) in *N. crassa*, although the later experiments were performed in a different way. The authors observed a nuclear CRE-1 localization in agarose medium lacking any carbon source.

3.3. Recombinant GST::CRE-1 binds to *gsn* and *gpn* promoters in vitro

The CreA DNA-binding motif was first identified in the *A. nidulans* gene promoters, including the *alcR* and *alcA* for ethanol utilization (Kulmburg et al., 1993) as being the consensus sequence 5'-SYGGRG-3'. In *N. crassa* genome, this sequence is very common in the genome, however, Sun and Glass (2011) described that genes having adjacent motifs in their promoter regions are more likely to be the direct targets of CRE-1. A search for this motif in the promoters of the glycogenic genes (*gmn*, *gsn*, *gpn*, and *gdn*) revealed many motifs in all 5'-flanking regions, either adjacent or not (Fig. 4). Some of these motifs (shaded boxes), containing either two or three CRE-1 adjacent motifs in different position of the promoter regions, were analyzed by DNA shift using the recombinant GST::CRE-1 protein produced in *E. coli*. First, we assayed the

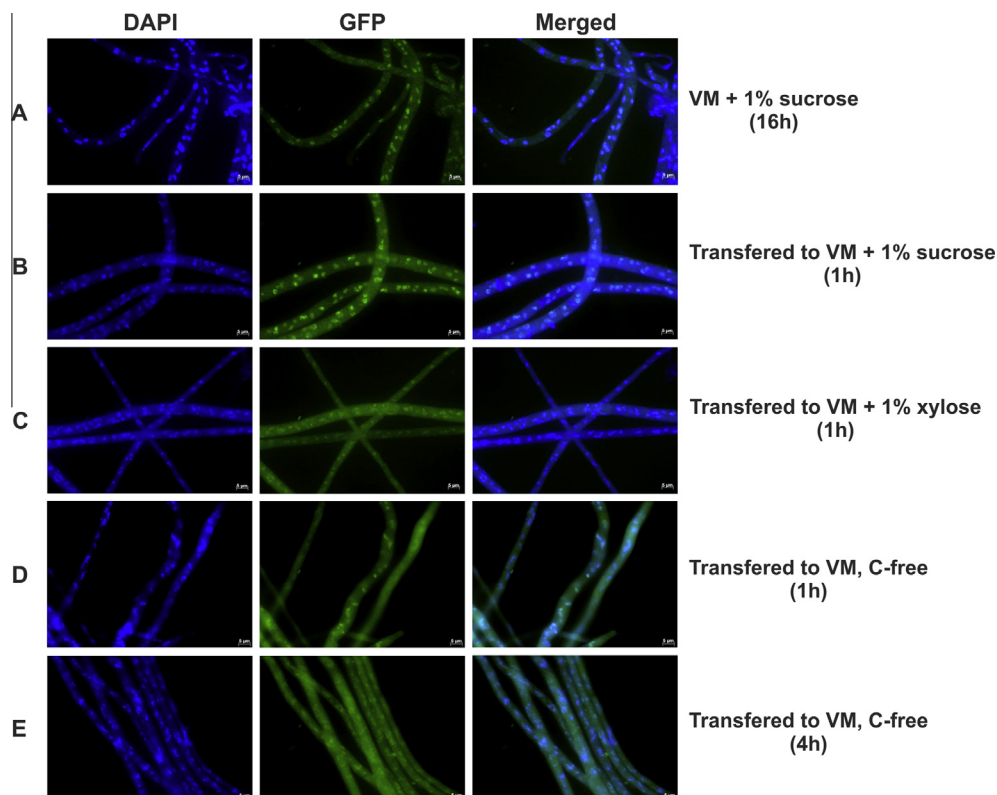


Fig. 3. Subcellular localization of CRE-1::GFP under repressing and derepressing conditions. The *his-3::Pn-cre-1-sfgfp* strain (6) was grown on VM medium containing 1% sucrose for 16 h (A) and then transferred to medium containing sucrose (repressing condition) (B), or xylose (derepressing condition) (C) or a medium lacking carbon source (D and E). Images were taken after 1 and 4 h of incubation. Fluorescence was evaluated using a Zeiss Microscope at a magnification of 100 $\times$. Results shown represent one of at least two independent experiments.

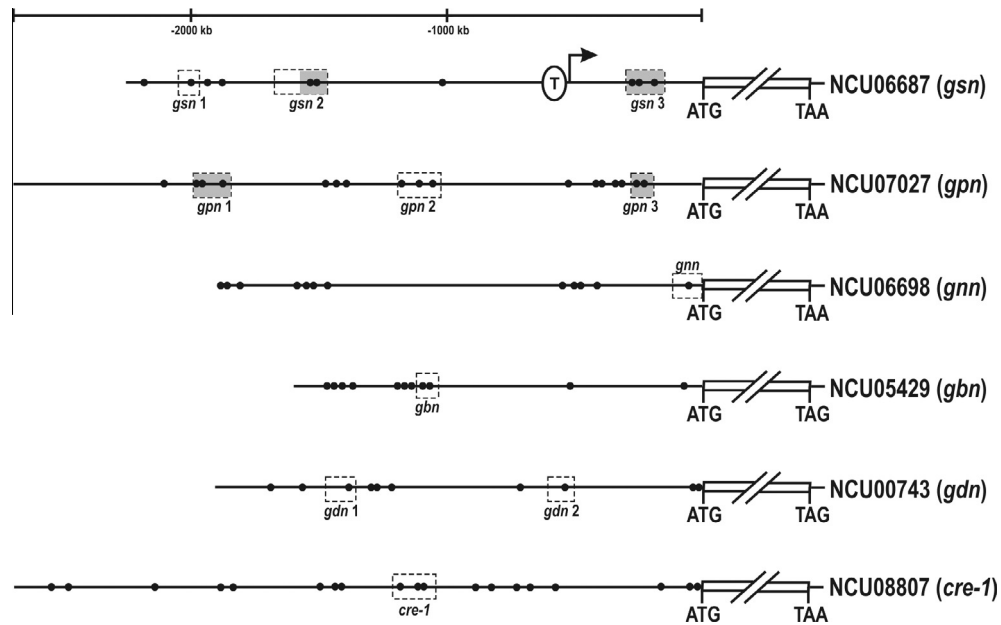


Fig. 5. Binding of recombinant GST::CRE-1 to the *gsn* promoter. (A) Upper panel, schematic representation of the *gsn* 2 probes (179 and 234 bp) with the CreA motifs analyzed. Lower panels, gel shift analysis using different concentrations of GST::CRE-1 and two probes in the absence and presence of specific competitors (SC and oligo *cre-1*). Lanes 1 and 10, *gsn* 2 probe, no protein added. Lane 9, the protein GST was used as a negative control. (B) Upper panel, schematic representation of the *gsn* 3 probe and the oligo *cre-1* with the CreA motifs. Lower panel, gel shift analysis using different concentrations of GST::CRE-1 in the absence and presence of specific competitors (SC and oligo *cre-1*). Lane 1, *gsn* 3 probe, no protein added. Lane 8, the protein GST was used as a negative control. O, gel origin; SC, specific competitor; FP, free probe. Results shown represent one of at least two independent experiments.

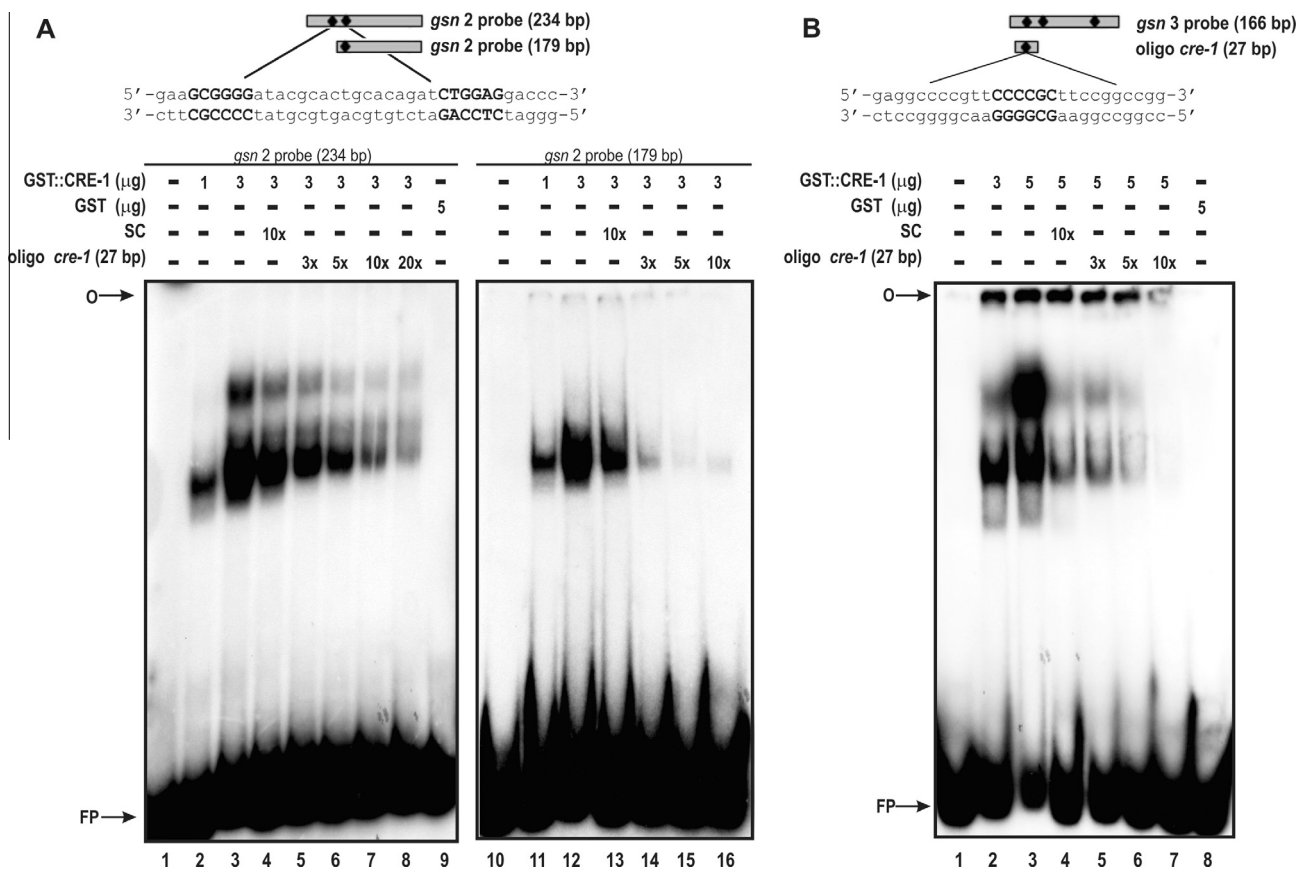


Fig. 5. Binding of recombinant GST::CRE-1 to the *gsn* promoter. (A) Upper panel, schematic representation of the *gsn* 2 probes (179 and 234 bp) with the CreA motifs analyzed. Lower panels, gel shift analysis using different concentrations of GST::CRE-1 and two probes in the absence and presence of specific competitors (SC and oligo *cre-1*). Lanes 1 and 10, *gsn* 2 probe, no protein added. Lane 9, the protein GST was used as a negative control. (B) Upper panel, schematic representation of the *gsn* 3 probe and the oligo *cre-1* with the CreA motifs. Lower panel, gel shift analysis using different concentrations of GST::CRE-1 in the absence and presence of specific competitors (SC and oligo *cre-1*). Lane 1, *gsn* 3 probe, no protein added. Lane 8, the protein GST was used as a negative control. O, gel origin; SC, specific competitor; FP, free probe. Results shown represent one of at least two independent experiments.

binding reaction in the labeled *gsn* 234 bp-probe (*gsn* 2) containing two adjacent motifs (Fig. 5A) located –1578 and –1601 bp from the ATG start codon. Two DNA–protein complexes of different electrophoretic mobility were observed using 3 µg of the recombinant protein (Fig. 5A, lane 3), which were lightly reduced in the presence of unlabeled specific competitor added prior to the probe (Fig. 5A, lane 4). However, the complexes were strongly reduced by adding the 27 bp oligonucleotide *cre-1* (Fig. 5A, lanes 5–8), which is a short dsDNA oligonucleotide containing a single 5'-SYGGRG-3' motif (see Fig. 5B, upper panel). The complexes were not observed when the GST protein was added (Fig. 5A, lane 9) demonstrating that the binding complexes were specific for CRE-1. An interesting result was obtained when only one motif of the same probe was analyzed (*gsn* 2, 179 bp). A unique DNA–protein complex was visualized (Fig. 5A, lane 12), which was totally removed in the presence of the CRE-1 motif-containing oligonucleotide *cre-1* (Fig. 5A, lanes 15 and 16). A similar result was observed when the *gsn* 3 DNA probe, which contains three adjacent motifs (*gsn* 3, 166 bp) located –228, –293, and –327 bp from the ATG start codon, was used (Fig. 5B). Three DNA–protein complexes exhibiting different molecular masses were visualized (Fig. 5B, lanes 2 and 3), with the lower mass complex showing weak intensity and specificity. The specificity was probed using the same oligonucleotide *cre-1* (Fig. 5B, lane 7) and the GST protein (Fig. 5B, lane 8). The results in Fig. 5A and B showed that *N. crassa*

CRE-1 recognized the same DNA motif as in *A. nidulans* but did not require adjacent motifs for binding as previously described (Cubero and Scazzocchio, 1994). From these results, we suggest that each DNA–protein complex may correspond to only one DNA motif.

We also investigated whether GST::CRE-1 was able to recognize and bind *in vitro* to some CreA motifs identified in the *gpn* promoter (see Fig. 4, shaded boxes). Initially, a 190 bp-probe (*gpn* 1) containing three motifs located –1984, –2074 and –2090 bp from the start codon was assayed and three DNA–protein complexes were visualized (Fig. 6A, lane 2). The highest and lowest molecular mass complexes were strongly decreased when the unlabeled probe was added as specific competitor prior to binding (Fig. 6A, lane 3) and the lowest molecular mass complex was completely abolished in the presence of 20-fold molar excess of the DNA oligonucleotide *cre-1* (Fig. 6A, lane 6). Interestingly, the intermediate complex was not removed by adding these competitors, which suggested that it was a high affinity DNA–protein complex. Fig. 6B shows the binding reaction of the GST::CRE-1 protein to the *gpn* 3 probe (138 bp) containing two motifs, localized at –262 and –290 bp from the start codon; three complexes were also visualized (Fig. 6B, lane 2). Similar to the results described in Fig. 5A and B, formation of the complexes was either decreased or abolished in the presence of the specific competitors and the GST protein was unable to bind to the probes (Fig. 6A and B, lanes

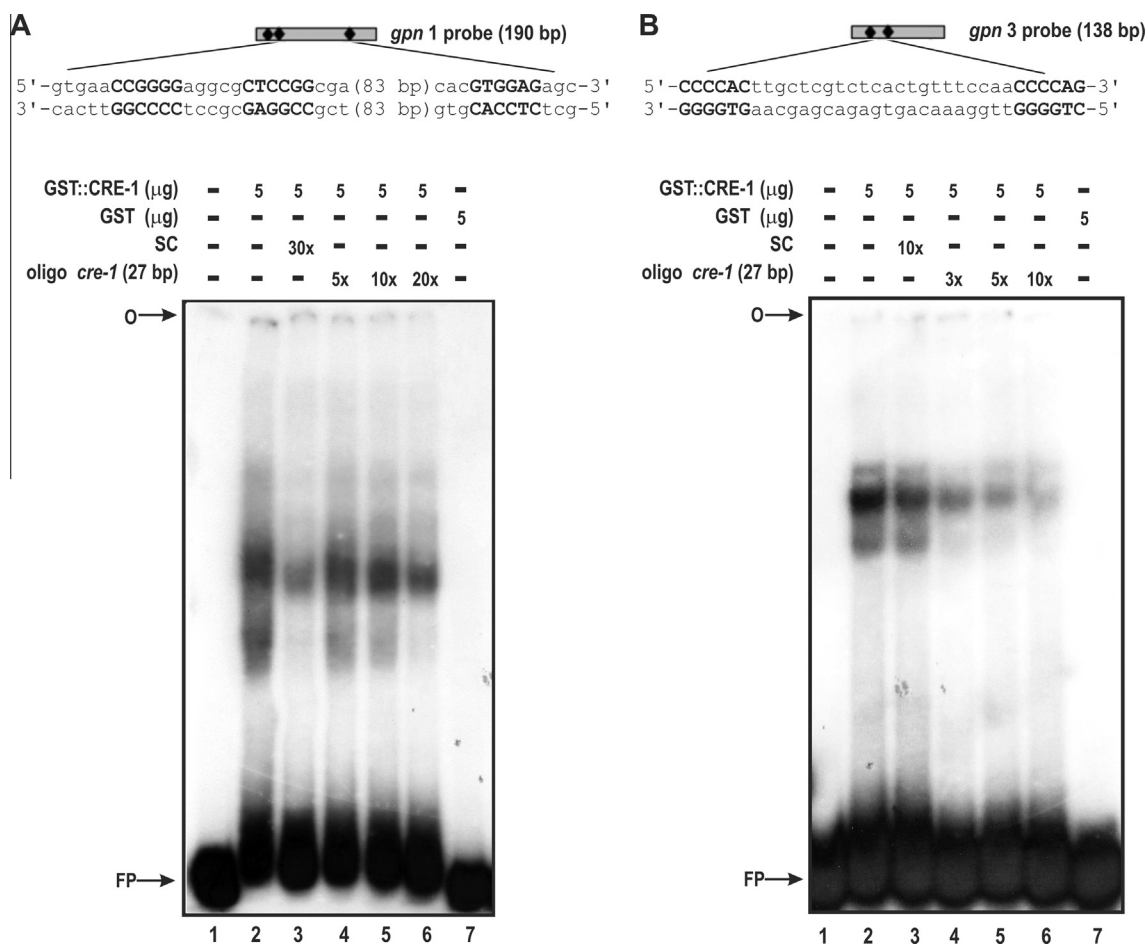


Fig. 6. Binding of recombinant GST::CRE-1 to the *gpn* promoter. (A) Upper panel, schematic representation of the *gpn* 1 probe with the CreA motifs analyzed. Lower panel, gel shift analysis using 5.0 µg of GST::CRE-1 in the absence and presence of specific competitors (SC and oligo *cre-1*). Lane 1, *gpn* 1 probe, no protein added. Lane 7, the protein GST was used as a negative control. (B) Upper panel, schematic representation of the *gpn* 3 probe with the CreA motif analyzed. Lower panel, gel shift analysis using 5.0 µg of GST::CRE-1 in the absence and presence of specific competitors (SC and oligo *cre-1*). Lane 1, *gpn* 3 probe, no protein added. Lane 7, the protein GST was used as a negative control. O, gel origin; SC, specific competitor; FP, free probe. Results shown represent one of at least two independent experiments.

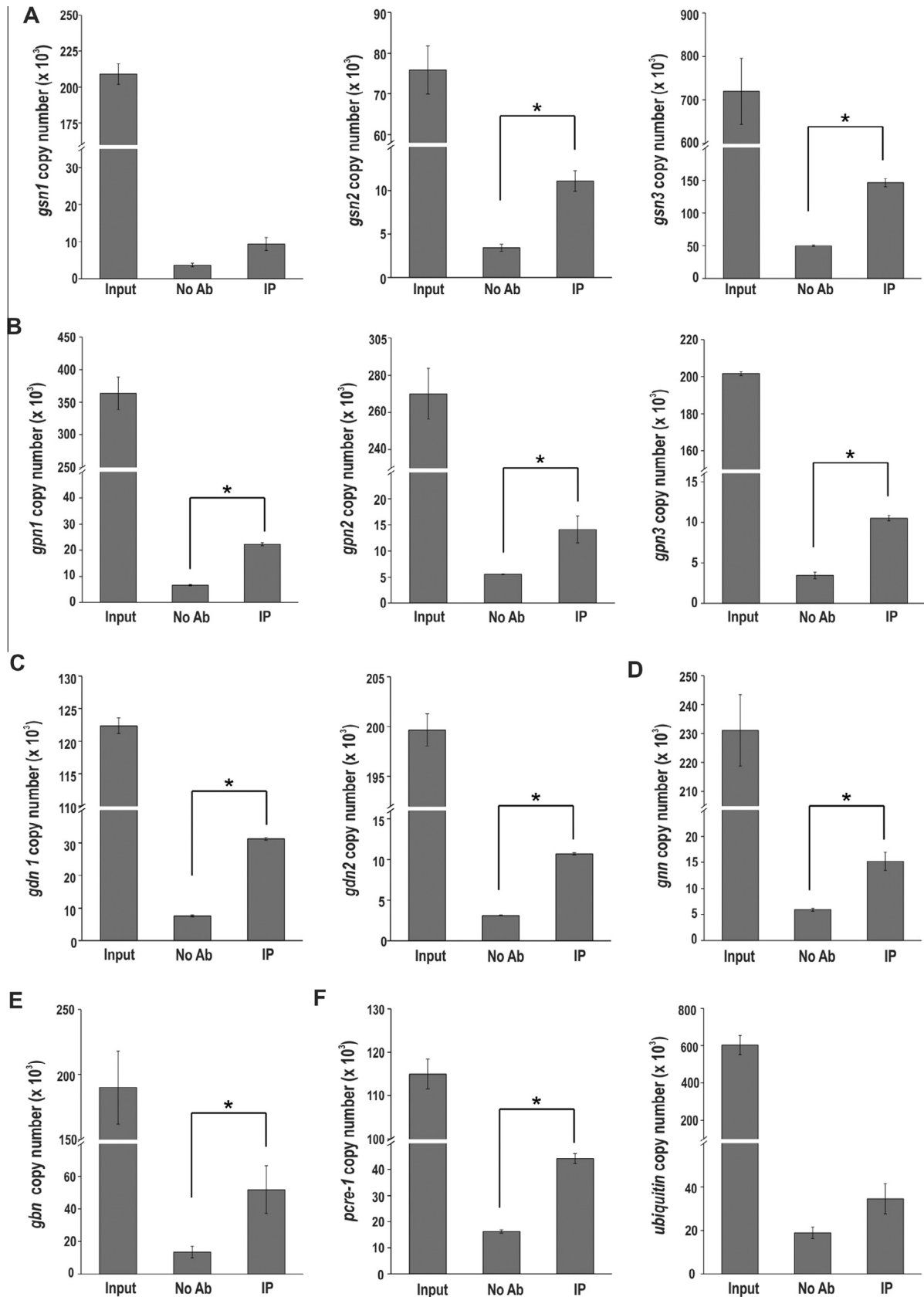


Fig. 7. ChIP-qPCR. Genomic DNA from *his-3::Pn-cre-1-gfp* strain grown at 30 °C for 24 h in VM medium containing 2% sucrose was immunoprecipitated with anti-GFP antibody and subjected to qPCR by absolute quantification to detect direct targets of CRE-1. DNA fragments amplification was analyzed in *gsn* (A), *gpn* (B), *gdn* (C), *gnn* (D), *gbn* (E) and *cre-1* (F) promoters in the genomic DNA. A region inside the coding sequence of the ubiquitin gene was used as negative control of binding (F). The input DNA was used as positive controls of the reactions. As the negative control, the immunoprecipitation reactions were done without antibodies (no Ab). The results represent the average of experimental triplicate in two biological replicates. The asterisks indicate significant differences (*T*-test, $p < 0.001$).

7). It is noteworthy that the oligonucleotide *cre-1*, used as a specific competitor in all DNA-binding reactions, corresponds to a motif present in the *gsn* promoter (*gsn* 3), suggesting that the regions surrounding the DNA motif do not strongly influence the protein binding. In addition, it should be noted that all CRE-1 DNA motifs (5'-SYGGRG-3') analyzed in this work corresponded to different nucleotide sequences. An interesting result was the presence of multiple DNA-protein complexes exhibiting different molecular masses for probes having more than one motif. We speculate that they may represent complexes having distinct conformational structures.

3.4. CRE-1 binds to all glycogenic gene promoters *in vivo*

Chromatin immunoprecipitation-qPCR assays were done to confirm the binding *in vivo* of CRE-1 to the DNA motifs in the glycogenic genes (Fig. 7). Using ChIP-qPCR we analyzed whether the DNA motifs were indeed the binding targets for CRE-1. In these experiments we used the *cre-1*^{KO} complemented strain (*his-3::Pn-cre-1-gfp*) and anti-GFP antibody. Chromatin was obtained from mycelia grown in VM medium containing sucrose (repressing carbon source), a condition that favors glycogen accumulation in the *cre-1*^{KO} strain (see Fig. 1A). As a negative control, a mock reaction without antibody was run and the input DNA was used as positive control of the experiments. As previously described, many CreA motifs were identified in the 5'-flanking regions of the glycogenic genes and some of them were bound *in vitro* by the recombinant CRE-1 (Figs. 5 and 6).

The ChIP-qPCR was analyzed in *gsn* (Fig. 7A), *gpn* (Fig. 7B), *gdn* (Fig. 7C), *gnn* (Fig. 7D) and *gbn* (Fig. 7E) promoters. The *cre-1* promoter and a region inside the coding sequence of the ubiquitin gene, lacking the motif, were used as positive and negative control of binding, respectively. The Fig. 7A shows that CRE-1 was not able to bind to the single motif located at -2034 bp from the ATG start codon in the *gsn1* promoter region. However, CRE-1 bound to *gsn2* and *gsn3* promoter regions, which possess two and three CreA adjacent motifs, respectively. CRE-1 also bound specifically to all regions in *gpn* (Fig. 7B), *gdn* (Fig. 7C), *gnn* (Fig. 7D), and *gbn* (Fig. 7E) promoters. Interestingly, some regions possess a single motif (*gnn* and *gdn* promoters) showing that the CRE-1 transcription factor can also recognize and bind *in vivo* to one single motif. It is important to observe the high copy number of the *gsn3* (Fig. 7A, right panel), which may suggest a major regulatory role of CRE-1 in the expression of this gene. Finally, CRE-1 bound to its own promoter, which contains three adjacent CreA motifs (see Fig. 4) but did not bind to the ubiquitin gene fragment, which does not have any CreA motifs (Fig. 7F) (considering $p < 0.001$). These results showed that CRE-1 specifically recognizes and binds to all glycogenic gene promoters *in vivo*, therefore regulating their expression in the presence of sucrose (repressive condition).

4. Discussion

A screening of *N. crassa* strains deleted in transcription factors allowed us to identify transcriptional regulators that are likely involved in glycogen metabolism control. Some of the proteins identified are described in the literature as involved in alternative cellular processes what raised insights concerning the importance of the energy balance provided by glycogen metabolism in different biological processes (Gonçalves et al., 2011). In this work, we investigated the link between glycogen metabolism and carbon repression in *N. crassa*. Carbon catabolic repression (CCR) is a mechanism present in many microorganisms and related to the glucose-preferred effect on the metabolism of other carbon sources. It is mediated by the transcription factor Mig1/CreA/CRE-1, highly conserved among fungal species, and in *S. cerevisiae*,

Mig1 recruits the repressor complex Tup1-Ssn6 to promoters of glucose-repressible genes (Treitel and Carlson, 1995). In this study, we used the *cre-1*^{KO} strain to assess the regulation of glycogen metabolism and included the strains *rco-1*^{KO} and *rcm-1*^{RIP}, which are the RCO-1 and RCM-1 mutant strains, the orthologues of *S. cerevisiae* Tup1 and Ssn6, respectively. We previously identified RCO-1 as likely involved in the regulation of glycogen metabolism (Gonçalves et al., 2011) and also observed a severe defect in glycogen accumulation by the *cre-1*^{KO} strain, which suggested that this transcription factor represses glycogen metabolism in *N. crassa*. In this work, we demonstrated that the repressor activity mediated by CRE-1 was observed under repressing and non-repressing carbon conditions, indicating that it was not dependent on the external carbon source. The accumulation of glycogen in *cre-1*^{KO} strain could result from misregulation in the expression of genes encoding glycogenic enzymes. All genes, except *gpn* (encodes glycogen phosphorylase), were up-regulated in *cre-1*^{KO}, indicating that loss of CRE-1 caused derepression of these genes. On the other hand, *gpn* was down-regulated indicating that CRE-1 also plays a role in gene activation, in agreement with Sun and Glass (2011) and similar to the findings described for this transcription factor in *A. nidulans* (Mogensen et al., 2006) and *T. reesei* (Portnoy et al., 2011). In the Sun and Glass (2011) work, the genes *gsn* and *gpn* were described as putative targets of CRE-1 regulation.

To analyze the regulatory role of CRE-1 on gene expression we examined the 5'-flanking regions of all glycogenic genes and many CreA DNA-binding motifs (5'-SYGGRG-3') were identified. Some motifs were examined for protein binding *in vitro* and *in vivo* based on their positions and number in the genomic region analyzed. DNA shift experiments showed that the *E. coli* recombinant GST-tagged CRE-1 was able to bind to DNA fragments from the *gsn* and *gpn* promoters containing CRE-1 motifs producing DNA-protein complexes with different molecular masses and affinities, depending on the DNA probe. All DNA-binding reactions were specific since binding was reduced or even abolished when the DNA oligonucleotide *cre-1* containing the CRE-1 binding site was used as a specific competitor. These findings revealed that CreA binding sites in the promoters analyzed were indeed the target for the binding of recombinant CRE-1. In addition, the nucleotide sequences in the neighborhood may not play an important role in DNA binding since only a single DNA oligonucleotide competed in all the DNA probes analyzed. Our results are not consistent with findings previously reported in the literature in some aspects. First, the number of complexes formed was independent of the motif orientation; in *A. nidulans* two divergently oriented sequences, separated by one base pair, are necessary for binding (Cubero and Scazzocchio, 1994). Other important difference was related to the number of motifs required for CRE-1 binding; while some reports indicated a requirement for multiple motifs for binding (Cubero and Scazzocchio, 1994; Sun and Glass, 2011), in our work, CRE-1 was able to bind *in vitro* and *in vivo* to only one motif and there seemed to be a correlation between the number of motifs and the number of complexes in the *in vitro* assays. We observed binding *in vivo* of CRE-1 in the motifs present in all promoters, with the exception of a region in the *gsn* promoter, independently of whether a single motif or not. We conclude that under the physiological growth conditions analyzed here (VM medium containing 2% sucrose and 24 h of growth) the majority of CreA motifs existent in the glycogenic gene promoters may be functional *in vivo*. Based on these results we suggest that CRE-1 is a repressor of glycogen synthesis, likely repressing the expression of *gsn* and *gbn* genes, that encode enzymes in the glycogen synthesis, and that in its absence the repressor activity is released and glycogen accumulates.

Since in *S. cerevisiae* Mig1 recruits the complex Tup1/Ssn6 to glucose-repressed promoters (Treitel and Carlson, 1995), we

investigated the role of the RCO-1 and RCM-1 proteins in the regulation of the glycogen metabolism. We demonstrated that both proteins regulate the glycogen metabolism by influencing in the glycogen synthase phosphorylation and in the expression of the genes that encode enzymes of the glycogen metabolism. Taking in consideration the results when repressing and non-repressing conditions were used (Fig. 2B), we conclude that RCO-1 and RCM-1 proteins do not play a regulatory role in the regulation of glycogen metabolism under repressing and non-repressing growth conditions; however, CRE-1 may play a repressor central role in this process. RCO-1 was previously described to have a minor role in CreA-mediated carbon repression in *A. nidulans* (Hicks et al., 2001; García et al., 2008). We have not determined whether these proteins interact to each other and we cannot preclude the possibility of additional proteins being required for binding. The Tup1-Ssn6 complex has been implicated in the repression of a large number of genes in *S. cerevisiae*, although neither Tup1 nor Ssn6 binds directly to DNA (reviewed in Parnell and Stillman, 2011). Different mechanisms have been proposed to explain the repressor function of the Tup1-Ssn6 complex, including interaction with histone deacetylases, inhibition of transcriptional activators and modification of chromatin structures. However, in a recent study, Wong and Struhl (2011) proposed that the Tup1-Ssn6 complex regulates transcription by blocking the activation domains of DNA-binding proteins, thereby preventing their interaction with transcriptional activators rather than by acting as a corepressor. In *N. crassa*, the RCO-1-RCM-1 complex was identified to transiently interact with the clock-controlled transcriptional repressor CSP1 (Sancar et al., 2011), regulating its kinetics of phosphorylation and thus its degradation. Interestingly, the authors described the gene encoding glycogen phosphorylase as a putative target of regulation by CSP-1 and RCO-1.

Our findings show that CRE-1 mediates the repression of glycogen metabolism under carbon repressing and non-repressing conditions, however repressing carbon sources such as glucose are preferred to non-repressing carbon sources such as xylose and glycerol for glycogen accumulation. Glucose is metabolized to pyruvate by glycolysis and further metabolism depends on the growth conditions whether aerobic/anaerobic, whereas xylose is metabolized via the pentose phosphate pathway. Different organisms, including filamentous fungi, need to regulate the metabolic reprogramming of their glucose/carbon metabolism, although the molecular mechanisms involved are not always well understood. The regulation of galactose metabolism by the *S. cerevisiae* gene *GAL1* provides a good example for understanding such regulation. In glucose-rich medium, *GAL1* is repressed by the Mig1-Tup1-Ssn6 complex (Nehlin et al., 1991), while in galactose-containing medium without glucose, *GAL1* transcription is activated by Gal4 that recruits the SAGA complex (Bhaumik and Green, 2001). The repressed/activated states are the consequence of a distinct chromatin architecture and epigenetic status such that multiple transcriptional regulatory proteins must be required, depending on the DNA region. Han and Emr (2011) showed that in *S. cerevisiae* conversion of the *GAL1* promoter from a repressed state to an activated state is dependent on a cytoplasmic component, phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate [PI(3,5)P₂] that interacts with Cti6 protein to assemble the activator complex Cti6-Tup1-Ssn6. More recently, the same group showed that this mechanism controls the reprogramming from glycolysis to gluconeogenesis (Han and Emr, 2013). The genes *FBP1* (encoding fructose-1,6-bisphosphatase) and *ICL1* (encoding isocitrate lyase) are under control of Mig1 repressor and the Tup1-Ssn6 corepressor complex and require PI(3,5)P₂ for transcriptional activation.

Although the findings described here represent an important progress in assessing the CRE-1 transcription factor regulating a specific metabolic process in *N. crassa*, more studies are required

to understand if there is a role of the RCO-1/RCM-1 complex in this process. One model proposed for the repressor activity of Tup1 protein in yeast suggests that, together with Ssn6, they recruit histone deacetylases for chromatin remodeling at the promoter (Parnell and Stillman, 2011). Since the complex needs to interact with a DNA-binding protein, it is assumed that large protein complexes must be recruited to ensure the repression of target genes. We have previously identified that a histone acetyltransferase protein binds to some regions of the *gsn* promoter (Freitas et al., 2008), a finding that raises interesting questions regarding the role of chromatin architecture in the regulation of this gene. The answer to this question may reveal fundamental aspects of gene regulation in *N. crassa* glycogen metabolism.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, for grants and fellowships. We deeply thank NL Glass (University of California, Berkeley, CA, USA) for providing the *cre-1*^{KO} complemented strain. We also thank PA de Castro (from GH Goldman's lab, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil) and I Malavazi (Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil) for their support on the microscopic analysis.

References

- Aro, N., Pakula, T., Penttilä, M., 2005. Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 719–739.
- Bertolini, M.C., Freitas, F.Z., de Paula, R.M., Cupertino, F.B., Gonçalves, R.D., 2012. Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa*. In: Witzany, G. (Ed.), *Biocommunication of Fungi*. Springer, Dordrecht, pp. 39–55.
- Bhaumik, S.R., Green, M.R., 2001. SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* 15, 1935–1945.
- Brown, N.A., de Gouveia, P.F., Krohn, N.G., Savoldi, M., Goldman, G.H., 2013. Functional characterisation of the non-essential protein kinases and phosphatases regulating *Aspergillus nidulans* hydrolytic enzyme production. *Biotechnol. Biofuels* 6, 91. <http://dx.doi.org/10.1186/1754-6834-6-91>.
- Brunelli, J.P., Pall, M.L., 1993. A series of yeast/*Escherichia coli* lambda expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision. *Yeast* 9, 1309–1318.
- Cubero, B., Scazzocchio, C., 1994. Two different, adjacent and divergent zinc finger binding sites are necessary for CREA-mediated carbon catabolite repression in the proline gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* 13, 407–415.
- Cziferszky, A., Mach, R.L., Kubicek, C.P., 2002. Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor CRE-1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). *J. Biol. Chem.* 277, 14688–14694.
- Cziferszky, A., Seiboth, B., Kubicek, C.P., 2003. The Snf1 kinase of the filamentous fungus *Hypocrea jecorina* phosphorylates regulation-relevant serine residues in the yeast carbon catabolite repressor Mig1 but not in the filamentous fungal counterpart CRE-1. *Fungal Genet. Biol.* 40, 166–175.
- de Paula, R., de Pinho, C.A., Terenzi, H.F., Bertolini, M.C., 2002. Molecular and biochemical characterization of *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by *gsn* cDNA. *Mol. Genet. Genomics* 267, 241–253.
- De Vit, M.J., Waddle, J.A., Johnston, M., 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell* 8, 1603–1618.
- de Vries, R.P., Visser, J., de Graaff, L.H., 1999. CreA modulates the XlnR-induced expression on xylose of *Aspergillus niger* genes involved in xylan degradation. *Res. Microbiol.* 150, 281–285.
- Freitas, F.Z., Bertolini, M.C., 2004. 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* 272, 550–561.
- Freitas, F.Z., Chapeaurouge, A., Perales, J., Bertolini, M.C., 2008. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. *Proteomics* 8, 2052–2061.
- Freitas, F.Z., de Paula, R.M., Barbosa, L.C.B., Terenzi, H.F., Bertolini, M.C., 2010. CAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. *Fungal Genet. Biol.* 47, 43–52.
- García, I., Mathieu, M., Nikolaev, I., Felenbok, B., Scazzocchio, C., 2008. Roles of the *Aspergillus nidulans* homologues of Tup1 and Ssn6 in chromatin structure and cell viability. *FEMS Microbiol. Lett.* 289, 146–154.
- Gonçalves, R.D., Cupertino, F.B., Freitas, F.Z., Luchessi, A.D., Bertolini, M.C., 2011. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. *Mol. Cell. Proteomics* 10, 11. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M111.007963>.

- Han, B.K., Emr, S.D., 2011. Phosphoinositide [PI(3,5)P₂] lipid-dependent regulation of the general transcriptional regulator Tup1. *Genes Dev.* 25, 984–995.
- Han, B.K., Emr, S.D., 2013. The phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P₂)-dependent Tup1 conversion (PIPTC) regulates metabolic reprogramming from glycolysis to gluconeogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 20633–20645.
- Hartree, E.F., 1972. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48, 422–427.
- Hicks, J., Lockington, R.A., Strauss, J., Dieringer, D., Kubicek, C.P., Kelly, J., Keller, N., 2001. RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. *Mol. Microbiol.* 39, 1482–1493.
- Ilmén, M., Saloheimo, A., Onnela, M.L., Penttilä, M.E., 1997. Regulation of cellulase gene expression in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1298–1306.
- Jonkers, W., Rep, M., 2009. Mutation of CRE-1 in *Fusarium oxysporum* reverts the pathogenicity defects of the FRP1 deletion mutant. *Mol. Microbiol.* 74, 1100–1113.
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., Johnson, A.D., 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709–719.
- Kulmburg, P., Mathieu, M., Dowzer, C., Kelly, J., Felenbok, B., 1993. Specific binding sites in the alcR and alcA promoters of the ethanol regulon for the CREA repressor mediating carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Microbiol.* 7, 847–857.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lee, K., Ebbole, D., 1998. Tissue-specific repression of starvation and stress responses of the *Neurospora crassa* con-10 gene is mediated by RCO-1. *Fungal Genet. Biol.* 23, 269–278.
- Lichius, A., Seidl-Seiboth, V., Seiboth, B., Kubicek, C.P., 2014. Nucleo-cytoplasmic shuttling dynamics of the transcriptional regulators XYR1 and CRE1 under conditions of cellulose and xylanase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Mol. Microbiol.* <http://dx.doi.org/10.1111/mmi.12824>.
- Lundin, M., Nehlin, J.O., Ronne, H., 1994. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1979–1985.
- Mach-Aigner, A.R., Pucher, M.E., Steiger, M.G., Bauer, G.E., Preis, S.J., Mach, R.L., 2008. Transcriptional regulation of *xyr1*, encoding the main regulator of the xylanolytic and cellulolytic enzyme system in *Hypocrea jecorina*. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6554–6562.
- McCluskey, K., 2003. The fungal genetics stock center: from molds to molecules. *Adv. Appl. Microbiol.* 52, 245–262.
- Mogensen, J., Nielsen, H.B., Hofmann, G., Nielsen, J., 2006. Transcription analysis using high-density micro-arrays of *Aspergillus nidulans* wild-type and *creA* mutant during growth on glucose or ethanol. *Fungal Genet. Biol.* 43, 593–603.
- Nehlin, J.O., Carlberg, M., Ronne, H., 1991. Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* 10, 3373–3377.
- Olmedo, M., Navarro-Sampedro, L., Ruger-Herreros, C., Kim, S.R., Jeong, B.K., Lee, B.U., Corrochano, L.M., 2010. A role in the regulation of transcription by light for RCO-1 and RCM-1, the *Neurospora* homologs of the yeast Tup1-Ssn6 repressor. *Fungal Genet. Biol.* 47, 939–952.
- Orejas, M., MacCabe, A.P., González, J.A.P., Kumar, S., Ramón, D., 1999. Carbon catabolite repression of the *Aspergillus nidulans* *xlnA* gene. *Mol. Microbiol.* 31, 177–184.
- Ostling, J., Ronne, H., 1998. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. *Eur. J. Biochem.* 252, 162–168.
- Parnell, E.J., Stillman, D.J., 2011. Shields up: the Tup1-Cyc8 repressor complex blocks coactivator recruitment. *Genes Dev.* 25, 2429–2435.
- Portnoy, T., Margeot, A., Linke, R., Atanasova, L., Fekete, E., Sándor, E., Hartl, L., Karaffa, L., Druzhinina, I.S., Seiboth, B., Le Crom, S., Kubicek, C.P., 2011. The CRE-1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation. *BMC Genomics* 12, 269–280.
- Roy, P., Lockington, R.A., Kelly, J.M., 2008. CreA-mediated repression in *Aspergillus nidulans* does not require transcriptional auto-regulation, regulated intracellular localization or degradation of CreA. *Fungal Genet. Biol.* 45, 657–670.
- Ruijter, G.J.G., Visser, J., 1997. Carbon repression in *Aspergilli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151, 103–114.
- Sancar, G., Sancar, C., Brügger, B., Ha, N., Sachsenheimer, T., Gin, E., Wdowik, S., Lohmann, I., Wieland, F., Höfer, T., Diernfellner, A., Brunner, M., 2011. A global circadian repressor controls antiphasic expression of metabolic genes in *Neurospora*. *Mol. Cell* 44, 687–697.
- Smith, R.L., Johnson, A.D., 2000. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25, 325–330.
- Sokolovsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M., Russo, V.E.A., 1990. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 37, 41–43.
- Strauss, J., Horvath, H.K., Adballah, B.M., Kindermann, J., Mach, R.L., Kubicek, C.P., 1999. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and post-transcriptional level. *Mol. Microbiol.* 32, 169–178.
- Sun, J., Glass, N.L., 2011. Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. *PLoS ONE* 6, e25654.
- Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P.B., Nakayama, J., Grewal, S.I., David Allis, C., Cheng, X., Selker, E.U., 2003. Trimethylated lysine 9 of histone H3 is a mark for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *Nat. Genet.* 34, 75–79.
- Thomas, J.A., Schlender, K.K., Larner, J., 1968. A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glucose. *Anal. Biochem.* 25, 486–499.
- Treitel, M.A., Carlson, M., 1995. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 3132–3136.
- Vautard-Mey, G., Fèvre, M., 2000. Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not the nuclear targeting of the fungal glucose regulator CRE-1. *Curr. Genet.* 37, 328–332.
- Vautard-Mey, G., Cotton, P., Fèvre, M., 1999. Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE-1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur. J. Biochem.* 266, 252–259.
- Vinuselv, P., Kim, M.K., Lee, S.K., Ghim, C.-M., 2012. Rewiring carbon catabolism repression for microbial cell factory. *BMB Rep.* 45, 59–70.
- Vogel, H.J., 1956. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). *Microbiol. Genet. Bull.* 13, 42–43.
- Wong, K.H., Struhl, K., 2011. The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes Dev.* 25, 2525–2539.
- Yamashiro, C.T., Ebbole, D.J., Lee, B.U., Brown, R.E., Bourland, C., Madi, L., Yanofsky, C., 1996. Characterization of *rco-1* of *Neurospora crassa*, a pleiotropic gene affecting growth and development that encodes a homolog of Tup1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6218–6228.
- Ziv, C., Gorovits, R., Yarden, O., 2008. Carbon source affects PKA-dependent polarity of *Neurospora crassa* in a CRE-1-dependent and independent manner. *Fungal Genet. Biol.* 45, 103–116.