UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estudos preliminares com proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína

MONICA APARECIDA DOS SANTOS

Araraquara
2010

MONICA APARECIDA DOS SANTOS

Estudos preliminares com proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof[a] Dra Maria Célia Bertolini

Araraquara

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Monica Aparecida dos
S237e Estudos preliminares com proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína / Monica Aparecida dos Santos. – Araraquara : [s.n], 2010
89 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Célia Bertolini
Co-orientador: Fernanda Zanolli Freitas

1. Biotecnologia. 2. *Neurospora crassa*. 3. Proteínas hipotéticas. 4. Gene *gsn*. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara

Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

MONICA APARECIDA DOS SANTOS

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

Araraquara, 10 de agosto de 2010.

BANCA EXAMINADORA

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

Profª Drª Dulce Helena Ferreira de Souza
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos

Prof. Dr. Iran Malavazi
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - UFSCar, São Carlos

DADOS CURRICULARES

Monica Aparecida dos Santos

1. Dados Pessoais:

Filiação: Aparecida Natalina Chagas dos Santos e Francisco Gonçalves dos Santos
Nascimento: 15 de março de 1983, Mococa – SP, Brasil
Documento de Identidade: 45.281.635-x / SSP-SP / 26/02/1998
Cadastro de Pessoa Física: 325.772.678-35
Endereço pessoal: Rua dos Bombeiros, 498 – Jd. Tabapuã
CEP: 14810-300 – Araraquara, SP
Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Rua Prof. Francisco Degni s/n - 14800-900 – Araraquara, SP
Profissão: Química

2. Formação acadêmica/titulação

2008-2010: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Título: Estudos preliminares com proteínas de *Neurospora crassa* identificadas em complexos DNA-proteína. Orientador: Maria Célia Bertolini, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2003-2007: Graduação em licenciatura em Química, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

3. Atividades de pesquisa

3.1. Artigos completos publicados em periódicos

BUENO, P. R.; SANTOS, Mônica Aparecida dos; Ramírez, M. A.; TARARAM, R.; LONGO, E. ; VARELA, J. A. Relationship between grain-boundary capacitance and bulk shallow donors in SnO polycrystalline semiconductor. Physica Status Solidi. A, Applied Research[JCR], v. 205, p. 1694-1698, 2008.

3.2. Resumos Expandidos em anais de congressos

SANTOS, Mônica Aparecida dos; RAMIREZ, M. A.; BUENO, P. R.; LONGO, E.. Correlação entre propriedades microestruturais e elétricas dos sistemas policristalinos SnO2.CoO e SnO2.MnO. In: 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006, Águas de Lindóia.

3.3. Resumo simples em anais de congressos

SANTOS, M. A.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. "*Neurospora crassa* hypothetical proteins involved in glycogen metabolism regulation and cell cycle progression". In: XXXIX Annual Meeting of SBBq, 2010, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

SANTOS, M. A.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Preliminary characterization of *Neurospora crassa* hypothetical DNA-binding proteins identified by mass spectrometry. In: XXXVIII Annual Meeting of SBBq, 2009, Águas de Lindóia.

SANTOS, Mônica Aparecida dos; RAMIREZ, M. A.; BUENO, P. R.; LONGO, E. Evaluation of deep trap relaxation as a functiono of CoO and MnO amount in SnO2.CoO and SnO2.MnO binary systems. In: 5th Brazilian MRS Meeting, 2006, Florianópolis.

SANTOS, M. A.; RAMIREZ, M. A.; BUENO, P. R. Estudo elétrico e microestrutural de sistemas policristalinos à base de SnO2.CoO e SnO2.MnO2. In: 50º Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2006, Blumenau, Santa Catarina.

3.4. Participação em eventos

XXXVIII Annual Meeting of SBBq. Preliminary characterization of Neurospora crassa hypothetical DNA-binding proteins identified by mass spectrometry. 2009.

V Evento de Educação em Química (EVEQ). 2007.

XIII Encontro Nacional de Ensino de Química. A interação entre professores do ensino médio e alunos de graduação: promovendo uma metodologia de ensino que aproxime o aluno do Ensino médio e o conhecimento científico. 2006.

XXXVI Semana da Química. 2006.

29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Correlação entre as propriedades microestruturais e elétricas dos sistemas policristalinos SnO2.CoO e SnO2.MnO. 2006.

V Encontro da SBPMat. Evaluation of deep trap relaxation as a function of CoO and MnO amount in SnO2.CoO and SnO2.MnO binary systems. 2006.

XXXV Semana da Química. 2005.

III Evento de Educação em Química. 2005.

XII Encontro Nacional do ensino de Química. 2004.

I EPPEQ. 2004.

II Fórum de professores de Química do ensino médio. 2004.

II Evento de Educação em Química. 2004.

XXXIII Semana da Química. 2003.

III Simpeq. 2003.

3.5. Organização de eventos

Lopes, L.; SANTOS, Mônica Aparecida dos; Júnior, G.G.; SANTOS, E. M.; ALMEIDA FILHO, E. ; ALMEIDA, T. A. L.; BIASETTO, C. R.; CASTRO, J. F. A.; COTRIM, C. A.; NOGUEIRA, K. L.; OLIVEIRA, L. A. A.; ZANON, D. A. V. V EVEQ" Ensino de Química: perspectivas e aplicações". 2007.

Dedico...
À Deus pela dádiva da vida e seus ensinamentos;
À minha avó Tereza por sempre estar ao meu lado, dando a razão de ser quem eu sou;
Aos meus pais Aparecida Natalina e Francisco pelo apoio incondicional;
Ao Éderson pelo seu companheirismo e amor.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original."

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Profª Dra. Maria Célia Bertolini, pelos ensinamentos, conselhos, pelas valiosas discussões e sugestões.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química,

A minha família, por toda minha vida, pelo amor, carinho, incentivo, e pelos sábios aconselhamentos desde sempre.

Ao Éderson, meu noivo, por todo amor, carinho, paciência, apoio e compreensão em todos os momentos vividos juntos.

Aos amigos de laboratório Amanda Piovesan Ucci, Rodrigo D. Gonçalves, Luiz Carlos Bertucci, Messias Miranda Junior, Flávia, Eliana, Fernanda Z. Freitas, Fernanda Cupertino, pela amizade, pela colaboração, pelas conversas e dúvidas esclarecidas, além dos bons momentos e convivência. Vocês são muito especiais.

Aos amigos que mesmo longe sempre estiveram perto, no meu coração, Giane Carneiro e Flávia Salvato.

Aos amigos Juliana Fernanda e Carolina Rabal que mesmo não estando no laboratório suportaram meus momentos de incertezas.

À Fátima, Waldenir e em especial ao Tarcísio, por toda ajuda, amizade e convivência.

Às funcionárias da Biblioteca e da Seção de Pós-Graduação.

À todos os funcionários do Instituto de Química.

À Fapesp pela bolsa concedida.

Muito obrigada a todos vocês que de alguma maneira contribuíram para formação pessoal e profissional.

LISTA DE ABREVIATURAS

5'- e 3'-UTR: 5'- e 3'- "Untranslated Region"

BSA: Albumina bovina sérica

C-terminal: região carboxi-terminal da proteína

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxiribonucléico

dNTPs: deoxiribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FGSC: *Fungal Genetics Stock Center*

gsn: glicogênio sintase do fungo *Neurospora crassa*

GSY2: glicogênio sintade do fungo *Saccharomyces cerevisiae*

HSE: *Heat shock elements*

kb: kilobase

kDa: kilodalton

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

NLS: Sinais de localização nuclear

N-terminal: região amino terminal da proteína

ORF: *Open Reading Frame*

PCR: "Polymerase Chain Reaction"

pI: Ponto isoelétrico

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA: ácido ribonucléico

mRNA: RNA mensageiro

rRNA: RNA ribossômico

tRNA: RNA transportador

rpm: rotações por minuto

SSC: Solução de citrato de sódio

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SSPE: Solução salina fosfato-EDTA

STRE: *Stress responsive elements*

TCA: Ácido tricloroacético

TLCK: Nα-p-tosil-L-lisina-clorometilcetona hidrocloreto

Tris: hidroximetilaminometano

V: volts

VM: Meio mínimo de Vogel

SUMÁRIO

DADOS CURRICULARES **II**

AGRADECIMENTOS **VII**

RESUMO **11**

ABSTRACT **14**

INTRODUÇÃO **16**

1. O fungo *Neurospora crassa* 17
2- Metabolismo de glicogênio 22
2.1- Controle do metabolismo de glicogênio 24

OBJETIVOS **30**

MATERIAIS E MÉTODOS **32**

1- Linhagens utilizadas 33
Neurospora crassa 33
Escherichia coli 33
2- Meios de cultivo 33
N. crassa 33
E. coli 34
3- Análise do crescimento das linhagens mutantes 34
3.1- Crescimento linear 34
3.2- Crescimento radial 36
4- Condições de cultivo de *N. crassa* e obtenção dos conídios 36
4.1- Choque térmico 36
5- Extração do DNA genômico do fungo 37
6- Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes 37
7- Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes 37
7.1- Preparo dos extratos celulares 37
7.2- Determinação do conteúdo de glicogênio 38
8- Extração de RNA e análise da expressão gênica por *Northern blot* 38
8.1- Extração de RNA total 38
8.2- Análise da expressão do gene *gsn* nas linhagens mutantes 39
9- Clonagem das ORFs 40
9.1- Biblioteca de cDNA utilizada 40

9.2- Clonagem dos cDNAs por PCR 40
9.3- Clonagem dos cDNAs por RT-PCR 42
10- Produção das proteínas recombinantes 44
10.1- Subclonagem das ORFs em vetor de expressão de *E. coli* 44
11- Sequenciamento e análise das seqüências obtidas 44
12- Ensaios de produção das proteínas recombinantes e análise de solubilidade 46
13- Análise da expressão protéica por *Western blot* 46
13.1 Ensaio de *Western blot* 47
14- Citometria de fluxo 47
15- Ensaios de viabilidade celular 48
16- Preparo e transformação das células competentes de *E. coli* 48
17- Mini-extração de DNA plasmidial 49

RESULTADOS **50**
1- Características estruturais das proteínas estudadas 51
2- Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes 51
3- Análise da expressão do gene *gsn* por *Northern blot* 54
4- Análise do crescimento das linhagens 56
5- Confirmação do nocaute nas linhagens mutantes 59
6-Clonagem dos cDNAs que codificam as proteínas estudadas 61
7- Análise morfológica das linhagens por citometria de fluxo 65
8- Análise do ciclo celular das linhagens por citometria de fluxo 68
9- Subclonagem dos cDNAs em vetor de expressão em *E. coli* 68
10- Análise da produção das proteínas recombinantes 74

DISCUSSÃO **78**

REFERÊNCIAS **84**

RESUMO

Os organismos pertencentes ao reino dos fungos têm exercido um papel fundamental no avanço da compreensão dos mecanismos moleculares de organismos eucariotos devido as suas facilidades de manipulação e o conhecimento das características genéticas e bioquímicas envolvidas em seu ciclo de vida. *Neurospora crassa* é um fungo cujos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos são bem definidos, e por isso tem sido muito usado como um sistema modelo em pesquisas que visam à elucidação de processos celulares complexos.

Em trabalhos anteriores desenvolvidos em nosso laboratório foram identificadas algumas proteínas que se ligam à região promotora do gene *gsn* que codifica a enzima glicogênio sintase, regulatória no processo de síntese de glicogênio. O presente trabalho teve como objetivo estudar algumas dessas proteínas, anotadas como hipotéticas, numa tentativa de entender melhor as suas participações no mecanismo de regulação. Para isto linhagens mutantes nos genes que codificam as referidas proteínas foram adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center*. Análises de determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes foram realizadas tanto em condições normais de crescimento (30º C) como em situações de choque térmico (45º C). Todas as linhagens mutantes avaliadas apresentaram um perfil de acúmulo de glicogênio semelhante ao da linhagem selvagem, isto é, todas apresentaram uma queda nas quantidades de glicogênio após o choque térmico. Entretanto a linhagem mutante na ORF NCU06679 apresentou o conteúdo de glicogênio mais reduzido, em ambas as situações ambientais (antes e depois do choque térmico).

Com o objetivo de verificar o envolvimento das proteínas estudadas na expressão do gene *gsn*, experimentos de *Northern blot* foram realizados e revelaram que na situação de estresse térmico, os níveis do transcrito *gsn* diminuem semelhantemente ao observado para a linhagem selvagem. Entretanto, a redução na expressão do gene é maior na linhagem que contem a ORF NCUO6679 nocauteada.

A caracterização morfológica das linhagens mutantes foi realizada através de análises do crescimento (linear e radial) tendo como referência o crescimento da linhagem selvagem e os resultados dos ensaios mostraram que o crescimento das linhagens mutantes não diferencia muito do crescimento da linhagem selvagem, exceto no crescimento apresentado pela linhagem mutante na ORF NCU06679.

Análises de citometria de fluxo foram realizadas com o objetivo de obter informações a respeito das características morfológicas dos conídios das linhagens estudadas e também de avaliar a participação das proteínas no ciclo celular. Estas análises permitiram concluir que as linhagens mutantes apresentaram características semelhantes às apresentadas pela linhagem selvagem, com relação à dispersão e tamanho de células, assim como em relação ao desenvolvimento celular. A exceção, semelhante à outras análises realizadas nesse trabalho, foi a linhagem mutante na ORF NCU06679. Esta linhagem mostrou alterações morfológicas nas análises e também indicou que a proteína pode estar envolvida no controle do ciclo celular.

Finalmente, a proteína NCU06679 foi produzida em *E. coli* e anticorpos serão produzidos em coelhos para a realização de outros experimentos que permitirão comprovar o papel desta proteína na regulação do metabolismo de glicogênio.

Palavras-chaves: *Neurospora crassa*, proteínas hipotéticas, metabolismo de glicogênio, gene *gsn.*

ABSTRACT

The organisms belonging to the kingdom of fungi have played a key role in advancing the understanding of the molecular mechanisms of eukaryotic organisms due to their easy handling and the genetic and biochemical mechanisms involved in their life cycle. *Neurospora crassa* is a fungus whose basic biochemical and genetic mechanisms are well defined, and therefore has been widely used as a model system in studies aimed to elucidate complex cellular processes.

In a previous work developed in our laboratory we identified some proteins that bind to the promoter region of the *gsn* gene that encodes glycogen synthase, the regulatory enzyme in the glycogen synthesis. This work aimed to start studying these proteins, annotated as hypothetical proteins, in an attempt to better understand their roles in the regulation of glycogen metabolism. For this, mutant strains in genes encoding the proteins were purchased from the Fungal Genetics Stock Center. Analysis of glycogen determination were performed in the mutant strains both under normal growth (30º C) and under heat shock condition (45º C). All mutant strains showed a glycogen content profile similar to the wild type strain, that is, all showed a decrease in the amounts of glycogen after heat shock. However the mutant strain in the ORF NCU06679 presented lower glycogen content compared to the wild type strain, in both environmental condition (before and after heat shock).

To verify the participation of the proteins in the *gsn* gene expression, *Northern blot* experiments were performed and showed that under heat stress the *gsn* transcript levels decreased similarly to that observed in the wild type strain. However the reduction in the gene expression was higher in the mutant strain containing the ORF NCUO6679 knocked out.

Morphological characterization of mutant strains was obtained by analysis of growth (linear and radial) with reference to the growth of the wild type strain and the results showed that the growth of mutant strains was not different from that observed for the wild type strain, except for the mutant strains in the ORF NCU06679.

Analysis of flow cytometry was performed with the objective of obtaining information concerning the morphology of conidia and also to evaluate the participation of the proteins in the cell cycle development. The results showed that the mutant strains have morphological characteristics similar to those presented in the wild type strain, with respect to the dispersion and size of cells. The exception, similar to other tests carried out in this study was a mutant in ORF NCU06679. Conidia of this strain showed morphological alterations and the cell cycle analysis allowed us to suggest that this protein might have a role in cell cycle progression.

Finally, the NCU06679 protein was produced in *E. coli* and antibodies will be raised in rabbits to perform additional experiments to confirm the participation of the protein in the glycogen metabolism regulation.

Keywords: *Neurospora crassa,* hypothetical proteins, glycogen metabolism, *gsn* gene.

INTRODUÇÃO

1. O fungo *Neurospora crassa*

Os fungos representam o grupo de microorganismos mais importante do ponto de vista biotecnológico, são usados para sintetizar uma ampla gama de compostos economicamente importantes, tais como enzimas e metabólitos secundários, incluindo antibióticos e outros produtos farmacêuticos, são os principais agentes de degradação no planeta tendo papéis ecológicos na reciclagem de nutrientes e são freqüentemente encontrados em associação com outros organismos. Os fungos têm desempenhado um papel importante no progresso da bioquímica, genética e biologia molecular. Em 1940, Beadle e Tatum usaram *Neurospora crassa* em estudos para estabelecer relações entre genes e proteínas, o que ficou resumido na hipótese "um gene, uma enzima". Na segunda metade do século passado, o fungo *Neuropora* teve um papel central como organismo modelo, contribuindo para o fundamental entendimento de sistemas genômicos de defesa, metilação de DNA, importação de proteínas mitocondriais, ritmos circadianos, silenciamento gênico pós-transcricional e reparo de DNA.

Neurospora crassa é um fungo cujos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos são bem definidos, e por isso tem sido muito usado como um sistema modelo em pesquisas que visam à elucidação de processos celulares complexos. Pertence à classe dos *Eumicetos,* subclasse *Ascomiceta,* família *Sordariacea,* subfamília *Sphaeriales* (ESSER; KUENEN, 1967) É um organismo saprófito e não patogênico aos humanos, animais e plantas embora seu genoma esteja intimamente relacionado com fungos patogênicos.

Embora *Neurospora* seja um saprófita (isto é, alimenta-se de matéria morta ou em decomposição), a seqüência do genoma contém numerosos genes identificados em fungos patogênicos e semelhantes aos exigidos para a patogênese da planta. *Neurospora* também possui uma ampla série de enzimas extracelulares capazes de digerir a parede celular vegetal embora não haja homólogos à cutinase. Deste modo, *Neurospora* embora não seja conhecido por ser um patógeno, a seqüência genômica revelou muitos genes com similaridade com os necessários para a patogênese (GALAGAN et al., 2003).

Uma das principais vantagens desse fungo é que ele pode crescer em um meio simples, chamado de meio mínimo, contendo fonte de carbono, uma mistura de sais e alguns micronutrientes sendo que o único requisito é a vitamina biotina. Por ser de caráter heterotrófico, pode utilizar diversas fontes de carbono, como glicose, acetato, succinato, glicerol, manose, frutose, maltose, celobiose, sacarose, oligo e polissacarídeos e aminoácidos. O nitrogênio é metabolizado na forma de amônia, que pode ser obtida de maneira direta ou indireta, através da transformação de nitritos, nitratos, aminoácidos ou catabolismo de proteínas e ácidos nucléicos. Tem seu crescimento ótimo em pH 5,4, mas é bastante tolerante e consegue se desenvolver numa faixa variando entre 4,0 e 9,0. Trata-se de um aeróbio restrito, com um tempo de duplicação de aproximadamente 150 minutos.

Quando cultivado em condições adequadas de nitrogênio é possível observarmos estruturas de propagação denominadas conídios, que podem ser macro ou microconídios. Ambas as vias requerem interface água-ar e são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos que se encontram nas extremidades das hifas aéreas, as quais surgem a partir de hifas vegetativas em respostas às diferentes formas de estresse, tais como dessecação ou falta de nutrientes. Na microconidiação os conídios são formados dentro das hifas basais e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa. As hifas vegetativas são multinucleadas e possuem crescimento polarizado e ramificação constante. Estas hifas contêm septos incompletos que permitem a circulação de organelas entre os compartimentos. A fusão freqüente dos filamentos de hifas produz uma complexa rede de hifas (micélio) e promove a formação de heterocários (genomas múltiplos) em que pode contribuir para o metabolismo de um micélio único.

Quanto ao ciclo de vida (Fig. 1) deste fungo, pode ser tanto sexuado quanto assexuado, o qual é altamente influenciado por fatores do meio ambiente, como nutrientes, luz e temperatura. É um fungo heterotálico e possui dois tipos de "*mating type*" distintos denominados de **A** e **a**. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto outro pode se comportar como "macho" (doador de núcleos) ou "fêmea" (receptora de núcleos, denominada de protoperitécio).

Limitações de nitrogênio induzem a um tipo de agregação de hifas que leva à geração de órgãos sexuais femininos multicelulares (protoperitécio). O acasalamento é realizado pelo crescimento quimiotrófico de uma hifa especializada feminina do protoperitécio para a célula masculina (normalmente um conídio) em um processo que envolve os feromônios. Fecundação e meiose resultam no desenvolvimento da estrutura feminina em um corpo de frutificação (peritécio) dentro do qual há ascos contendo, cada um, oito ordenados esporos sexuais (ascósporos).

N. crassa tornou-se um modelo de estudo melhor que o de leveduras para eucariotos superiores em muitos aspectos de biologia celular considerando-se o fato de serem organismos multicelulares, de fácil manipulação e crescimento rápido (BORKOVICH et al*.,* 2004). A seqüência do genoma de *Neurospora* foi recentemente relatada (GALAGAN et al*.,* 2003) e encontra-se totalmente anotado, o que trouxe importantes informações. O fungo possui um grande número de genes sem homólogos em leveduras. É um organismo multicelular e possui um genoma haplóide de aproximadamente 40 Mb, maior que o de *Saccharomyces cerevisiae* e *S. pombe* (~12 Mb) (GALAGAN et al*.,* 2003). Existem cerca de 10.000 genes preditos e um terço deles não possuem ortólogos no GenBank, os quais podem representar novos genes com funções até então desconhecidas ou novos genes desempenhando diferentes maneiras de realizar funções conhecidas (GALAGAN et al*.,* 2003; DUNLAP et al., 2007).

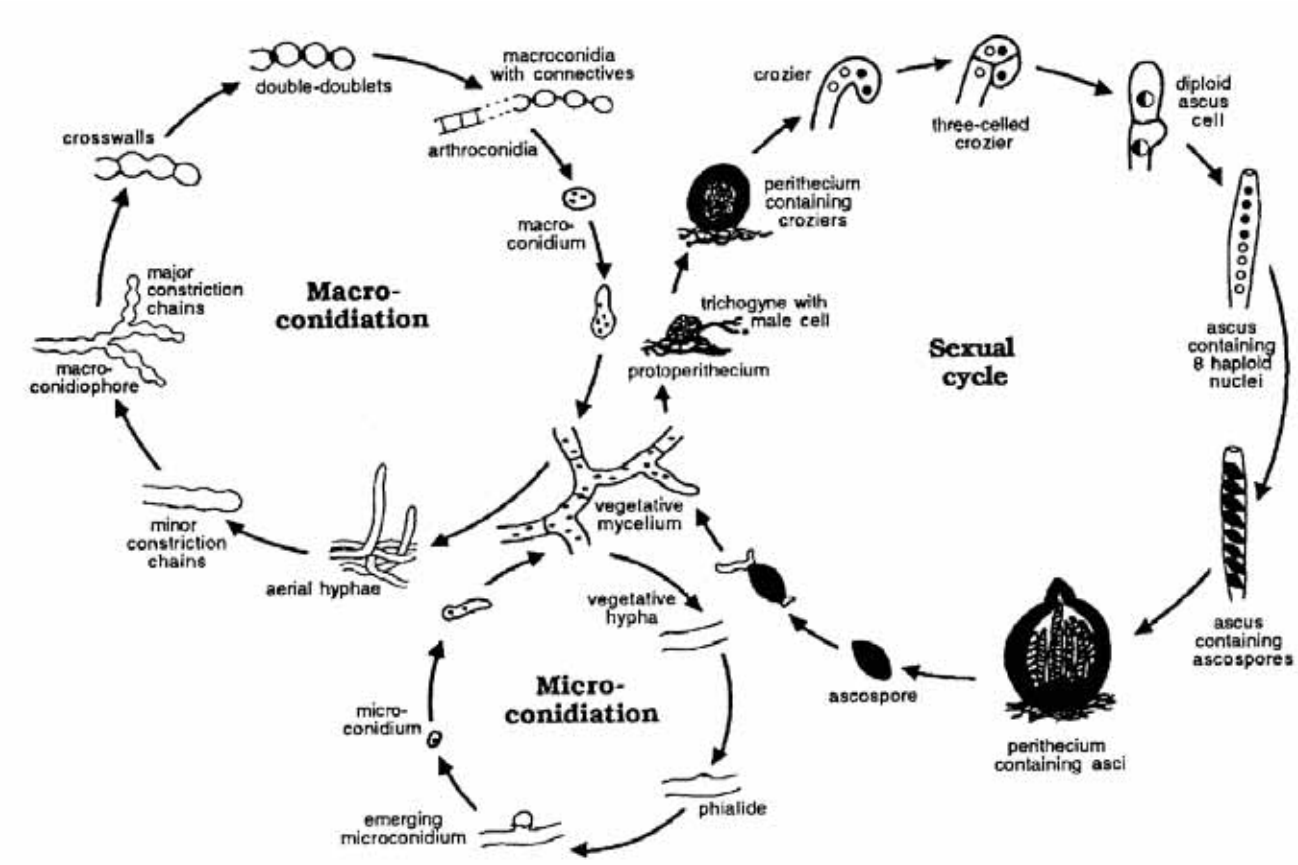


Figura 1- Ciclo de vida da *Neurospora crassa*. Dependendo das condições do ambiente, o micélio vegetativo pode sofrer processos de esporulação assexual, macroconidiação e microconidiação (BORKOVICH et al*.,* 2004).

Uma característica interessante deste fungo, revelada com o sequenciamento do seu genoma, é que *N. crassa* compartilha genes com uma variedade de grupos taxonômicos e o grau de complexidade do seu genoma se aproxima ao de *Drosophila melanogaster* (DUNLAP et al., 2007), o que sugere que esse fungo se relacione melhor com organismos eucariotos superiores do que com as leveduras. Uma característica interessante deste fungo é que 57% das proteínas não correspondem a proteínas de leveduras, enquanto que 14% possuem ortólogos em proteínas de animais e plantas, 41% estão relacionadas com proteínas conhecidas, 30% são consideradas proteínas hipotéticas sem semelhança com proteínas depositadas em banco de dados como mostra os dados da Tabela 1 (GALAGAN et al., 2003). Além disso, *N. crassa* possui numerosas proteínas que são preditas nas leveduras mencionadas, mas que se relacionam melhor com proteínas de animais ou de plantas (BORKOVICH et al., 2004).

N. crassa apresenta uma série de mecanismos de silenciamento de genes atuando em fase sexuada ou em fase vegetativa do ciclo de vida. Muito estudado é o seu mecanismo "Repeat Induced Point Mutation" (RIP), um sistema de defesa eficaz contra seqüências duplicadas. No entanto, RIP parece impor restrições sobre genética e evolução do genoma, levantando a questão de saber se *Neurospora* atualmente é capaz de utilizar a duplicação do gene como um meio de diversificação genética.

N. crassa é também um fungo preparado para responder a uma variedade de mudanças ambientais. Os fatores mais proeminentes e ambientais são a luz e a temperatura, os quais afetam o sistema circadiano do organismo. A luz é conhecida por afetar a expressão de genes que influenciam em eventos como carotenogênese e conidiação. O efeito da luz deriva de seu papel central no estado do relógio circadiano, que mesmo na ausência de luz pode influenciar na expressão de grande parte do genoma.

Os estudos sobre a sensibilidade à luz em *N. crassa* vêm fazendo menção à sua habilidade de percepção à luz azul, mas não à luz vermelha. Um aspecto inesperado do genoma *Neurospora* é a presença de novos genes cujos produtos refletem na sensibilidade ambiental dos estímulos luminosos. Apesar do intensivo estudo sobre a sensibilidade circadiana neste fungo, a sequência do genoma tem revelado um número surpreendente de novos homólogos de genes sensíveis à luz (BORKOVICH et al., 2004).

Em relação à resposta a temperaturas supra-ótimas, *Neurospora* apresenta uma classe de proteínas de choque térmico, as quais funcionam como chaperonas que orientam e estabilizam a conformação de outras proteínas. A maioria das proteínas de choque térmico (HSPs) também é sintetizada constitutivamente, e muitas são essenciais.

Em função das características apresentadas, *N. crassa* tornou-se um modelo de estudo em muitos aspectos de biologia celular considerando-se o fato de serem organismos multicelulares, de fácil manipulação e crescimento rápido.

Feature	Value
General	
Size (bp) (assembly 5)	38,639,769
Chromosomes	7
G + C content (%)	50
Protein-coding genes	10,082
Protein-coding genes >100 amino acids	9,200
tRNA genes	424
5S rRNA genes	74
Per cent coding	44
Per cent intronic	6
Average gene size (bp)	1,673 (481 amino acids)
Average intergenic distance (bp)	1,953
Predicted protein-coding sequences	
Identified by similarity to known sequences	1,336 (13%)
Conserved hypothetical proteins	4,606 (46%)
Predicted proteins (no similarity to known sequences)	4,140 (41%)

Tabela 1 - Características do genoma de *N. crassa* (GALAGAN et al., 2003).

2- Metabolismo de glicogênio

O glicogênio é a forma de armazenamento de açúcares nas células animais, como o amido é nas vegetais. É uma molécula ramificada, constituída por unidades de glicose em ligação glicosídica α1-4, com ramificação onde a ligação é α1-6. O peso molecular pode chegar a 100 milhões. A síntese e degradação do glicogênio (Fig. 2) envolvem conjuntos separados de enzimas funcionando de forma irreversível, ou seja, o processo de degradação não é o inverso ao da síntese. Ao todo há pelo menos oito enzimas envolvidas. Dessa maneira, a síntese e a degradação do glicogênio são processos metabólicos altamente regulados e as enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase são os principais sítios de regulação, implicando que o acúmulo ou a degradação do glicogênio está intimamente correlacionado com alterações rápidas e reversíveis nas atividades destas enzimas.

O armazenamento de carboidratos de reserva, tal como o glicogênio, é importante em diversos organismos, pois quando necessário estes carboidratos de reserva podem ser metabolizados para a produção de energia. A síntese do glicogênio tem início através da ação da glicogenina, uma proteína capaz de se auto-glicosilar e produzir, a partir de UDP-glicose (UDPG), uma cadeia glicosídica curta com ligações α(1,4). A enzima glicogênio sintase é responsável pela elongação da cadeia. Esta enzima catalisa a formação de ligações glicosídicas α(1,4) através da adição de resíduos de glicose, a partir de uma molécula de UDPG, para as extremidades não redutoras das cadeias lineares da molécula de glicogênio nascente (NELSON; COX, 2000).

Um dos pré-requisitos para a glicogênio sintase elongar a molécula de glicogênio é a presença de um oligossacarídeo contendo pelo menos oito resíduos de glicose, o qual é fornecido pela glicogenina autoglicosilada em seus resíduos de tirosina. As ligações glicosídicas do tipo α(1,6), responsáveis pela ramificação da molécula de glicogênio são catalisadas pela glicosil-(α1,6)-transferase. Esta enzima transfere um fragmento terminal de seis a sete resíduos de glicose da extremidade não-redutora da molécula nascente, criando ramificações importantes na molécula do polissacarídeo, pois, além de tornarem o polissacarídeo mais compacto e solúvel, também aumentam o número de extremidades não redutoras da molécula, favorecendo o acesso da glicogênio sintase e glicogênio fosforilase, que agem apenas sobre as extremidades não redutoras.

A degradação da molécula de glicogênio é catalisada por três enzimas: a glicogênio fosforilase que catalisa a fosforólise do glicogênio que ocorre ao longo de uma ramificação até que se aproxime de 4 a 5 resíduos de um ponto da ramificação α(1,6), produzindo glicose-1-fosfato (G1P). A glicogênio fosforilase age repetitivamente sobre as extremidades não-redutoras das ramificações da molécula de glicogênio até restarem apenas quatro resíduos de glicose distantes do ponto de ramificação; a enzima desramificadora remove ramificações do glicogênio tornando, assim, mais resíduos de glicose acessíveis à glicogênio fosforilase; a fosfoglicomutase converte

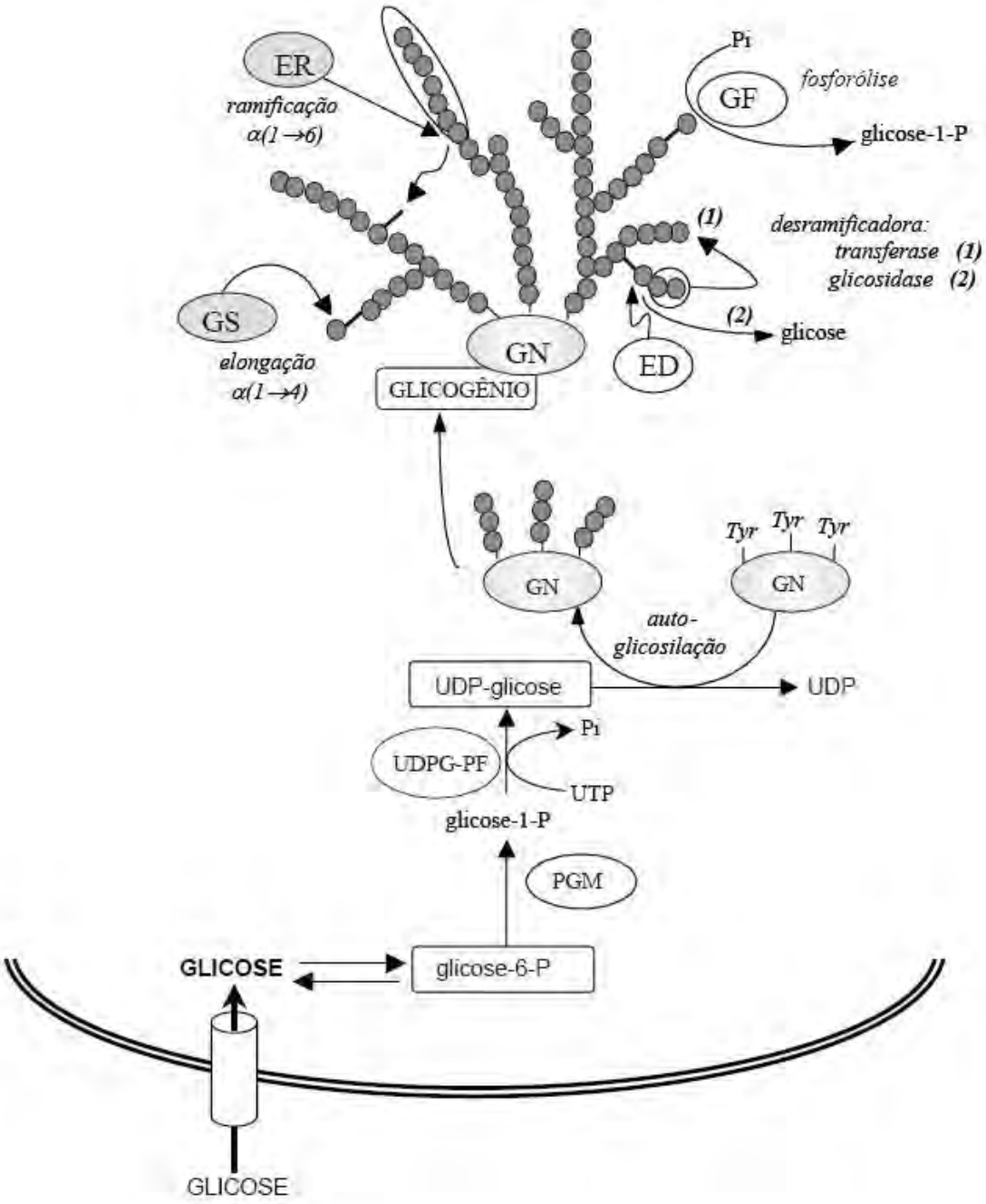


Figura 2- Esquema representativo das reações envolvidas na síntese e degradação do glicogênio. **GN,** glicogenina, **GS,** glicogênio sintase, **ER,** enzima ramificadora (glicosil-(α1,6)-transferase), **GF,** glicogênio fosforilase, **ED,** enzima desramificadora, **PGM,** fosfoglicomutase (FRANÇOIS; PARROU, 2001).

G1P em G6P (glicose-6-fosfato) que pode ter vários destinos metabólicos tais como síntese de glicogênio, catabolisada via glicólise para produzir ATP e acetil-CoA.

2.1- Controle do metabolismo de glicogênio

A síntese e a degradação do glicogênio devem ser controladas de acordo com as necessidades celulares. A regulação do metabolismo de glicogênio envolve controle alostérico e controle hormonal por meio de modificação covalente das enzimas regulatórias da via. Tanto a glicogênio sintase como a glicogênio fosforilase estão sob controle alostérico de efetores que incluem ATP, G6P e AMP. Em músculos a glicogênio fosforilase é ativada por AMP e inibida por ATP e G6P. Por outro lado, a glicogênio sintase é ativada por G6P. Isso sugere que quando há uma demanda alta de ATP (baixa concentração de ATP, baixa concentração de G6P e alta concentração de AMP) a glicogênio fosforilase é estimulada e a glicogênio sintase é inibida, o que favorece a degradação do glicogênio. Ao contrário, quando a concentração de ATP e G6P estão altas, a glicogênio sintase é favorecida.

Várias seqüências nucleotídicas codificando para a enzima glicogênio sintase, tanto de organismos procariotos como de eucariotos já foram descritas. Atualmente com o advento da era genômica várias seqüências polipeptídicas homólogas à enzima glicogênio sintase podem ser encontradas em bancos de dados. Seqüências de cDNA codificando para as glicogênio sintase de músculo (BROWNER et al., 1989) e fígado (NUTALL et al., 1994) humanos também foram determinadas. Nos microrganismos, a glicogênio sintase de *S. cerevisiae* é a melhor estudada. Em *S. cerevisiae* foram isolados dois genes codificando para a enzima glicogênio sintase, *GSY1* e *GSY2*, os quais codificam respectivamente as isoformas Gsy1p e Gsy2p, de 80 e 79 kDa (FARKAS et al.,1990 e 1991). Ambas são proteínas nutricionalmente reguladas, sendo que a Gsy2p é a forma predominante da enzima (FARKAS et al., 1990 e 1991; UNNIKRISHNAN et al., 2003). O cDNA que codifica a enzima glicogênio sintase de *N. crassa* (*gsn*) foi isolado (DE PAULA et al., 2002) e codifica para uma proteína com alta identidade tanto com as enzimas da levedura *S. cerevisiae* como com as enzimas de células de mamíferos.

A modificação covalente (fosforilação e desfosforilação) da glicogênio fosforilase e da glicogênio sintase fornece um sistema de controle mais sofisticado que modula a capacidade de resposta dessas enzimas a seus efetores alostéricos. A enzima glicogênio sintase sofre controle pós-traducional, via fosforilação multi-sítios através da ação de quinases e fosfatases. Assim, duas formas da enzima glicogênio sintase, uma forma fosforilada (ou menos ativa) e uma forma desfosforilada (ou ativa) são normalmente encontradas nas células (HUANG; CABIB, 1974). A fosforilação leva a uma redução na atividade enzimática, efeito que é revertido na presença do modulador alostérico G6P.

Além do controle sobre a enzima glicogênio sintase os níveis de glicogênio também são controlados por fatores ambientais e isto está muito bem caracterizado na levedura *S. cerevisiae*. Este organismo acumula glicogênio no início da fase estacionária do crescimento vegetativo e após choque térmico (FRANÇOIS et al., 1991; PARROU et al., 1997). O fungo *N. crassa* acumula glicogênio na final da fase exponencial e degrada o mesmo no início da fase estacionária. Entretanto, em situações como choque térmico e privação de glicose, os níveis de glicogênio encontram-se drasticamente reduzidos (DE PAULA et al., 2002), contrário ao que é observado em levedura.

Análise da expressão do gene que codifica a enzima glicogênio sintase, em nível de transcrição, também revelou resultados contrários quando se compara a levedura *S. cerevisiae* com o fungo *N. crassa* na situação de choque térmico. Nesta situação (30ºC para 45ºC) os níveis do transcrito *gsn* foram drasticamente reduzidos no fungo e foram recuperados aos níveis normais quando as células retornaram à temperatura normal de crescimento (DE PAULA et al., 2002). Na levedura a mesma situação estressante levou a um aumento da transcrição dos genes *GSY1* e *GSY2* (FRANÇOIS et al., 1988; NI; LaPORTE, 1995; UNNIKRISHNAN et al., 2003).

O aumento dos níveis de mRNA *GSY1* e *GSY2*, observados durante o choque térmico na levedura, mostrou estar relacionado à presença de elementos de DNA STRE nas respectivas regiões promotoras destes genes (NI; LaPORTE, 1995). Os STREs (*Stress Responsive Elements*) são elementos de transcrição *cis* presentes nos promotores de genes responsivos a várias condições estressantes (MARTINEZ-PASTOR et al., 1996). A maioria dos genes envolvidos no metabolismo de glicogênio em leveduras contém uma ou mais cópias de STRE e nem todos contribuem igualmente para a resposta ao estresse, mas um deles deve ser o predominante na reposta, como ocorre para os genes *GSY1*, *GSY2* e *HSP12* (NI; LaPORTE, 1995; VARELA et al., 1995; UNNIKRISHNAN et al., 2003).

A seqüência genômica do gene *gsn* de *N. crassa* foi isolada em nosso laboratório (FREITAS; BERTOLINI, 2004) e mostrou possuir vários elementos transcricionais *cis*, destacando-se os elementos HSEs (*Heat Shock Element*), três elementos STREs, um deles localizado dentro do *intron* presente na região 5'-UTR do gene, elementos CRE, elementos responsivos a AMP cíclico, elementos MIG, envolvidos em repressão de glicose e um elemento NIT, presente em genes regulados por nitrogênio (Fig. 3). Utilizando ensaios de retardamento em gel (EMSA) e seqüências da região 5´-flanqueadora do gene *gsn* contendo os elementos HSE e os elementos STRE, como sondas, foi mostrado que proteínas nucleares induzidas por choque térmico foram capazes de reconhecer e ligar especificamente às sondas contendo estes elementos de DNA (FREITAS; BERTOLINI, 2004). Os resultados fortemente sugeriram o envolvimento das regiões analisadas na regulação da expressão do gene *gsn* após a situação de choque térmico.

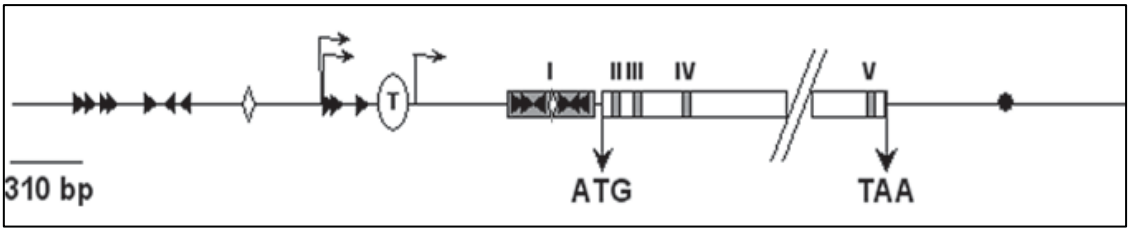


Figura 3- Representação esquemática do gene *gsn* com as regiões 5' e 3' flanqueadoras e a ORF. As relativas posições indicadas são de possíveis sítios de ligação de elementos de transcrição, ▶, HSEs (Heat Shock Elements), ◇, STREs (Stress Responsive Elements). Sítio de poliadenilação, ●. Sequência TATA-box, Ⓣ. A ORF está delimitada pelos códons de iniciação (ATG) e terminação (TAA) e os cinco íntrons estão sendo representados pelos números I, II, III, IV e V (FREITAS; BERTOLINI, 2004).

Na tentativa de obter maiores informações relacionadas à regulação da expressão do gene *gsn* no fungo *N. crassa*, experimentos foram conduzidos com a finalidade de identificar proteínas que se ligam à região promotora do gene e, portanto, podem estar envolvidas na regulação da expressão do gene. Estas proteínas poderiam estar envolvidas através da ligação direta ao DNA (fatores de transcrição) ou através da participação na formação de grandes complexos protéicos que são conhecidos participarem na regulação da transcrição em eucariotos. Como resultado do trabalho, foi possível identificar algumas proteínas por espectrometria de massas, as quais podem estar envolvidas na regulação do gene durante a condição de choque térmico (FREITAS et al*.,* 2008). A maioria destas proteínas encontra-se anotada como proteína hipotética e, após análise de suas seqüências polipeptídicas, algumas foram consideradas alvos altamente promissores, baseado na presença de domínios protéicos que são descritos estarem envolvidos em funções relacionadas em outras proteínas.

Uma das proteínas identificadas foi a NCU02424 que contém um domínio de ligação DnaJ localizado na extremidade C-terminal e três domínios tetratricopeptídicos (TPR) localizados na extremidade N-terminal. O domínio DnaJ é responsável por regular a função chaperona das proteínas da família Hsp70 (CYR et al*.,*1994), enquanto os domínios TPR estão presentes em uma grande variedade de proteínas responsáveis por estabelecer interações proteína-proteína e a formação de multi-complexos protéicos (DAS et al., 1998). O Domínio DnaJ geralmente é bem conservado com aproximadamente 78 aminoácidos. Os membros das famílias da *hsp70* e *hsp40* interagem uns com os outros para desempenhar funções específicas na montagem, dobramento e redobramento de proteínas durante uma variedade de processos celulares, incluindo replicação de DNA, translocação de proteína e resposta ao estresse (LU; CYR, 1998; FINK, 1999). O domínio TPR é uma seqüência degenerada de 34 aminoácidos identificada em uma grande variedade de proteínas, organizadas em conjuntos de 3-16 motivos. Nas células, as proteínas contendo domínios TPR estão localizadas em diversos compartimentos subcelulares, incluindo núcleo, citoplasma e mitocôndria. Diversos eventos celulares e moleculares estão relacionados a proteínas TPR, uma vez que tais proteínas mediam muitas interações proteína-proteína dentro da célula (ANDREW et al*.,* 2009).

Outro domínio importante presente em algumas das proteínas identificadas (NCU03876, NCU06679) é o domínio WD40 localizado ao longo da seqüência polipeptídica das proteínas. Proteínas contendo domínios WD40 pertencem a uma grande família de proteínas de eucariotos, envolvidas em uma ampla variedade de funções, como transdução do sinal e controle transcricional. Elas coordenam a formação de complexos multi-proteicos através de seus domínios WD40. Os domínios WD40 podem ser encontrados em muitas proteínas eucarióticas. Estas proteínas devem ter um papel muito importante na transdução do sinal, dinâmica citoesquelética, trafego de proteínas, exportação nuclear, biogênese de rRNA e especialmente em modificação de cromatina e transcrição. O aspecto mais comum e definido de proteínas WD40 é seu domínio

WD40 que se constitui de uma extensão de 40 aminoácidos tipicamente terminada em Trp-Asp (triptofano-aspartato), mas exibindo uma limitada conservação na seqüência dos aminoácidos. Uma típica proteína WD40 possui o domínio WD40 em várias unidades repetidas em *tandem* e menos de quatro desses domínios é requerido para a alta organização e estrutura funcional (HUANG et al*.,* 2008).

Outra proteína (NCU01021) identificada apresenta o domínio Mov3/MPN/PAD-1 localizado na extremidade N-terminal da proteína, o qual é encontrado em subunidades regulatórias do proteossomo 26S, nas subunidades eIF3 e reguladores de fatores de transcrição. Já a proteína NCU03482 foi anotada como sendo uma proteína hipotética semelhante à helicase do tipo RuvB, uma subunidade dos complexos protéicos Swr1 e Ino80 que atuam na remodelagem de cromatina (PAPAMICHOS-CHRONAKIS et al., 2006). A análise da seqüência polipeptídica revelou a presença de um domínio Tip49 C-terminal. Este domínio interage com vários tipos de fatores nucleares, além de apresentar atividade DNA helicase intrínseca. Um estudo com proteínas de ligação TATA (TBP), um componente central para a regulação da transcrição, mostrou que as proteínas TATA formam complexos com vários reguladores de transcrição. O cDNA que codifica a proteína de interação TBP de 49 kDa (Tip 49) de humanos foi isolada e mostrou-se altamente homóloga a proteínas bacterianas RuvB que funcionam como uma DNA helicase. Análises de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-TIP49 mostraram um típico padrão nuclear em forma de manchas, sugerindo que TIP49 está incluída em uma estrutura macromolecular no núcleo e pode participar de eventos nucleares de transcrição e recombinação (MAKINO et al*.,*1998).

Finalmente, uma proteína (NCU06679) foi anotada como ortóloga à proteína Cac3p (*chromatin assembly-3*) de *S. cerevisiae*. Na levedura, os genes *CAC* (*CAC1, CAC2* e *CAC3*) codificam as proteínas do complexo heterotrimérico Caf-I (*Chromatin assembly factor I*), o qual está envolvido em processos como a organização da cromatina durante a etapa de replicação (SMITH; STILLMAN, 1991) e reparo de DNA (GAILLARD et al., 1996). Outras funções não relacionadas com a remodelagem da cromatina também foram atribuídas às proteínas Cac (SCHNEIDER et al., 1994). Em *N. crassa* CAF-1 é dita ser composta de três subunidades (CAC-1 a CAC-3). Linhagens do fungo contendo mutações no gene que codifica a maior e mais conservada subunidade, CAC-1 são viáveis, o que é semelhante à situação em *S. cerevisiae*. Estes resultados sugerem que fatores de organização de cromatina CAC-2 e CAC-3 contêm domínios WD40 e são conservados entre todos os eucariotos estudados (BORKOVICH et al*.,* 2004).

Duas das proteínas identificadas (NCU06679 e NCU03482) possuem em suas seqüências prováveis sítios de localização nuclear clássicos (NLS), os quais constituem-se de uma seqüência rica de aminoácidos básicos lisina e arginina com uma função de “direcionar” complexos protéicos para o núcleo (DINGWALL; LASKEY, 1998).

As proteínas identificadas, como já dito anteriormente, podem atuar junto com fatores de transcrição ou mesmo como proteínas componentes dos grandes complexos protéicos que participam no controle transcricional em eucariotos. Como as proteínas identificadas estão anotadas como hipotéticas e, portanto, não possuem ortólogos funcionais descritos em outros organismos, este trabalho, objetivou estudar estas proteínas visando, no futuro, compreender melhor as suas participações no mecanismo de regulação da expressão do gene *gsn* neste fungo.

Embora *N. crassa* tenha sido estudado durante mais de 60 anos pela genética clássica e molecular, relativamente pouco é conhecido sobre a regulação da transcrição neste organismo. A disponibilidade da seqüência completa do genoma de *Neurospora* tem permitido a anotação de 182 genes fatores de transcrição. Apenas 21 fatores de transcrição foram bioquimicamente caracterizados até o momento, e menos ainda têm sido estudados em qualquer sistema de outros fungos filamentosos. Os genes que têm sido estudados em *N. crassa* desempenham papéis no metabolismo e durante o desenvolvimento, incluindo a utilização de nutrientes ou absorção, o crescimento vegetativo e macroconidiação, as respostas à luz e ao ritmo circadiano, o desenvolvimento sexual, reparo do DNA, e funções do *matyng-type*. Há muitos outros processos para os quais as informações básicas sobre os mecanismos de controle transcricional são totalmente inexistentes. Portanto, um estudo funcional em grande escala de fatores de transcrição de *Neurospora* é oportuno e vai proporcionar uma base para a compreensão de modos complexos de regulação gênica em fungos filamentosos (COLOT et al*.,* 2006).

OBJETIVOS

O presente projeto foi desenvolvido para atingir os seguintes objetivos:

- **Avaliar morfologicamente as linhagens mutantes nas proteínas estudadas.** Alguns aspectos morfológicos das linhagens mutantes, tais como: crescimento em meio sólido, crescimento linear, conidiação e formação e extensão das hifas aéreas serão avaliados nas linhagens. Nesta parte o principal objetivo será analisar se a ausência das proteínas pode afetar os diferentes aspectos celulares.
- **Avaliar o conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes.** O conteúdo de glicogênio será determinado em células do fungo sob condições normais de crescimento e durante a situação de estresse de choque térmico. A determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes permitirá avaliar a participação ou não das proteínas na regulação do metabolismo do carboidrato nas duas situações. Isto é um aspecto importante do trabalho uma vez que as proteínas foram identificadas como presentes em complexos DNA-proteína formados com extratos celulares submetidos a esta situação de estresse.
- **Analisar a expressão gênica nas linhagens mutantes e selvagem do fungo.** Em um primeiro momento este trabalho terá como objetivo analisar a expressão do gene *gsn* por *Northern blot* durante o crescimento normal do fungo e sob a condição de estresse térmico. A expressão do gene nas linhagens mutantes será comparada à expressão, já bem caracterizada na linhagem selvagem. Como as proteínas foram identificadas em complexos DNA-proteína formados com extratos celulares submetidos à situação de estresse térmico, os quais não foram formados com extratos celulares do fungo não submetidos ao choque térmico é importante analisar a expressão nos extratos submetidos ao choque térmico.
- **Clonar as ORFs e produzir as proteínas recombinantes.** Os cDNAs que codificam as proteínas que se mostrarem mais interessantes em relação ao papel funcional serão clonados e as proteínas produzidas na forma recombinante em *E. coli* fusionada a cauda de poli-His.
- **Analisar as linhagens mutantes por citometria de fluxo.** Pretende-se avaliar se a ausência das proteínas pode afetar morfologicamente os conídios das linhagens mutantes e se as proteínas podem estar participando na regulação do ciclo celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Linhagens utilizadas

Neurospora crassa

Linhagens mutantes de *N. crassa*, contendo genes que codificam fatores de transcrição individualmente nocauteados foram adquiridas pelo laboratório. O nocaute gênico nestas linhagens foi realizado através de recombinação homóloga, na qual a seqüência nucleotídica inteira, incluindo os códons de iniciação e término da tradução, foi removida (COLOT et al., 2006). Todas as linhagens utilizadas foram adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center,* Kansas City, MO, USA, e os nocautes gênicos nessas linhas foram confirmados como descrito em Materiais e Métodos (item 6).

	Mating type	***Características***
FGSC#2489	A	Selvagem
FGSC#9718	*a*	Selvagem
FGSC#11902	*a*	contém o gene da ORF **NCU02424** nocauteado
FGSC#16510	*a*	contém o gene da ORF **NCU01021** nocauteado
FGSC#13658	*a*	contém o gene da ORF **NCU03482** nocauteado
FGSC#13915	*a*	contém o gene da ORF **NCU06679** nocauteado
FGSC#15693	*a*	contém o gene da ORF **NCU03876** nocauteado

Escherichia coli

- DH10B

2- Meios de cultivo

N. crassa

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

510 g de citrato de sódio.H_2O

250 g de KH_2PO_4

100 g de NH_4NO_3

10 g de $MgSO_4.7H_2O$

5 g de $CaCl_2.2H_2O$ (pré-dissolvido em água destilada)

5 mL de solução de elementos traços

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

5 g de $MgSO_4.7H_2O$

5 g de ácido cítrico.H_2O

5 g de $ZnSO_4.7H_2O$

1 g de $F(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$

0,25 g de $CuS_4.5H_2O$

0,05 g de $MnSO_4.H_2O$

0,05 g de H_3BO_3

0,05 g de $NaMoO_4.2H_2O$

O meio mínimo de Vogel foi preparado contendo 2% de sacarose, sais de Vogel 1X, biotina 0,1 mg/mL preparada em etanol 50% e 2% de ágar para culturas em meio sólido.

E. coli

O meio de cultivo utilizado para crescimento foi o meio 2YT acrescido de glicose:

1,6% de triptona

1,0% de extrato de levedo

0,5% de NaCl

0,2% glicose

Para culturas sólidas, foram adicionados ao meio 2% de ágar.

3- Análise do crescimento das linhagens mutantes

3.1- Crescimento linear

A taxa de crescimento das linhagens mutantes e selvagem foi determinada através do crescimento em “race tubes”. Race tubes são tubos de vidro com dimensões de 50 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro, contendo as duas extremidades curvadas num ângulo de aproximadamente 45º (Fig. 4). Tais tubos foram parcialmente preenchidos com meio VM sólido. As linhagens foram rejuvenescidas e hifas (7 a 10 dias de crescimento) foram inoculadas em uma das extremidades dos tubos e o crescimento do fungo ao longo do tubo foi

Figura 4- Esquema representativo do ensaio utilizando *Race-tubes.*

monitorado diariamente por aproximadamente 3 dias. O monitoramente foi realizado por meio da marcação da frente do crescimento micelial.

3.2- Crescimento radial

O crescimento radial das linhagens mutantes e selvagem foi realizado em placas contendo meio VM e meio VM suplementado com extrato de levedo 2%. Uma quantidade mínima (ponta de uma agulha) de hifas rejuvenescidas foi inoculada na região central da placa e o crescimento radial foi analisado após a incubação das placas a 30ºC por 24 h.

4- Condições de cultivo de *N. crassa* e obtenção dos conídios

Culturas de *N. crassa* em meio sólido foram cultivadas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio mínimo de Vogel e deixadas a 30ºC na estufa por 48 horas e, em seguida, expostas à luz até um total de 9 a 10 dias à temperatura ambiente para estimular a conidiação. Após esse período os conídios foram coletados pela adição de aproximadamente 25 mL de água destilada estéril à garrafa, seguida da filtração em gaze estéril para retenção das hifas, os conídios foram contados em câmara de Neubauer e inoculados em culturas líquidas numa densidade de $1x10^7$ células/mL.

4.1- Choque térmico

A suspensão de conídios (densidade de 10^7 células/mL) foi inoculada em 30 mL de meio VM (Erlenmeyers de 125 mL), em duplicata, e colocada a 30ºC sob agitação constante de 250 rpm por 24 horas em um agitador New Brunswick. Após esse período, o micélio correspondente a um dos frascos de cada linhagem foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, rapidamente congelado em nitrogênio liquido e armazenado à -80ºC (amostra ZERO, não submetida a choque térmico). O micélio da amostra do outro frasco também foi coletado por filtração a vácuo, e transferido para um terceiro frasco contendo VM líquido, pré-aquecido a 45ºC (choque térmico) e deixado nesta temperatura por 30 minutos. Em seguida o micélio foi rapidamente coletado por filtração, congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80ºC (amostra submetida ao choque térmico, HS30).

As amostras coletadas foram usadas, posteriormente, para a preparação dos extratos celulares.

5- Extração do DNA genômico do fungo

O DNA genômico das linhagens selvagem e mutante de *N. crassa* foi preparado segundo o método de Weiland (1997). Para isso micélio congelado do fungo foi pulverizado com nitrogênio líquido em gral de porcelana e o pó resultante foi transferido para tubos eppendorf de 2 mL contendo 500 µL de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0 e SDS 1%) e 500 µL de fenol saturado em tampão. Os tubos foram homogeneizados por aproximadamente 5 minutos em *vortex* e, em seguida, centrifugados a 16.000 *x g*/4ºC/10min. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e o DNA contido na fração solúvel foi precipitado com 80 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram deixados a -20ºC por aproximadamente 3 h e, posteriormente, centrifugados a 16.000 *x g*/4ºC/10min.

O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água e acrescido de fenol saturado para a desproteinização das amostras. Os tubos novamente foram centrifugados (16.000 *x g*/4ºC/10min) e a fase aquosa transferida para tubo eppendorf limpo, e o DNA foi precipitado com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado. Os tubos foram deixados a -80ºC por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados (16.000 *x g*/4ºC/10min) e o precipitado obtido foi lavado com 700 µL de etanol 70% por duas vezes. O precipitado foi ressuspenso em 100 µL de água contendo 2 µL de RNAse A (10 mg/mL) e deixado em banho-maria a 37ºC por 30 minutos. A concentração do DNA foi determinada por absorbância a 260 nm e a pureza foi analisada pela relação das absorbâncias 260/280nm em um espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640.

6- Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes

O nocaute nas ORFs estudadas foi verificado através de reações de PCR utilizando o DNA genômico das linhagens mutantes e os oligonucleotídeos apresentados na Tabela 1. As reações de amplificação foram realizadas juntamente com o DNA genômico de uma linhagem selvagem (FGSC#9718) e as condições das reações foram as mesmas descritas para a clonagem das ORFs (item 9 de Materiais e Métodos).

7- Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes

7.1- Preparo dos extratos celulares

O extrato celular foi preparado pela pulverização de aproximadamente 200 mg do micélio congelado a -80ºC, em gral de porcelana com nitrogênio líquido. Em seguida, transferiu-se o pó

obtido para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de solução tampão gelada (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, TLCK 2 mM, aprotinina 1 µg/mL e pepstatina A 1 µg/mL). Após forte agitação em *vortex,* a mistura foi centrifugada (10.000 x *g*/4ºC/10 min) em centrífuga Eppendorf de bancada, recolhendo o sobrenadante em um tubo eppendorf novo. Uma alíquota foi utilizada para a determinação das proteínas totais do extrato celular pelo método de Hartree utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (HARTREE, 1972).

7.2- Determinação do conteúdo de glicogênio

A determinação do conteúdo de glicogênio foi realizada como descrito por Hardy and Roach (1993), com algumas modificações. Primeiramente, foram coletados 100 µL do extrato celular bruto e adicionado 25 µL de TCA 50%. Este material foi centrifugado a 5.000 x *g* /4ºC/10 min. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf limpo, ao qual foram adicionados 500 µL de etanol absoluto e deixado 30 minutos a -80ºC para a precipitação do glicogênio presente na fração solúvel. Finalmente, a solução foi centrifugada a 14.000 x *g*/4ºC/ 10 minutos para a coleta do glicogênio, o qual foi lavado duas vezes com 500 µL de etanol 66% e levemente seco ao ar. Os precipitados contendo glicogênio foram ressuspensos em 400 µL de solução tampão (acetato de sódio 50 mM, $CaCl_2$ 5 mM, pH 5,2) e a digestão foi realizada com 1 µL das enzimas α-amilase (solução 10 mg/mL) e amiloglicosidase (solução 30 mg/mL) durante 12 a 15 horas a 37ºC. O conteúdo de glicose livre foi determinado pelo kit *Glicose PAP Liquiform* (Labtest) segundo as instruções do fabricante. O conteúdo de glicogênio presente em cada amostra foi calculado de acordo com uma curva padrão de glicogênio e expresso em relação à quantidade de proteína total de cada amostra (µg glicogênio/mg de proteínas totais).

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

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

8.1- Extração de RNA total

O procedimento de extração foi realizado segundo o método de cloreto do lítio (SOKOLOVSKY et al., 1995). Para isto, uma pequena quantidade do micélio congelado foi pulverizada em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para tubo eppendorf de 2 mL contendo uma mistura de 750 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1 M, 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, à temperatura ambiente, durante 15 minutos e então centrifugada a 10.650 x *g*/4ºC/10 minutos em centrífuga refrigerada de bancada. A fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorf limpo e o RNA contido nesta foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M e mantido a 4ºC durante uma noite. Após esta etapa, o material foi centrifugado a 15.700 *x g* /10 minutos, o precipitado foi ressuspenso em 300 µL de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC) e, em seguida, precipitado com acetato de sódio 3 M e etanol absoluto gelado a -80ºC, durante 30 minutos. O RNA total foi coletado a 15.700 *x g*/4ºC/15 minutos, lavado duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a 15.700 *x g*/4ºC/ 5 minutos, seco e solubilizado em 50 a 100 µL de água 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.

8.2- Análise da expressão do gene *gsn* nas linhagens mutantes

A análise foi realizada por *Northern blot* segundo protocolo descrito por Sambrook and Russell (2001). Para isto, aproximadamente 15 µg de cada amostra de RNA total foi previamente desnaturada em tampão de desnaturação (MOPS 1X, formamida deionizada 50%, formaldeído 20 %, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,025%, brometo de etídeo 0,05 µg/mL) a 65ºC durante 10 minutos. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 0,6 M a 65 V por aproximadamente 4 horas em tampão MOPS 1X (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM e EDTA 1 mM, pH 7,0). O RNA total, após eletroforese, foi transferido por capilaridade para membrana de nylon neutra (Hybond N, Amersham) utilizando solução tampão SSC 2X (NaCl 0,3 M e citrato de sódio 3 mM, pH 7,0) durante a noite. Após a transferência, os RNAs foram fixados na membrana por *crosslinking* (Ultraviolet Crosslinker UVP mod. CL1000) durante 2 minutos e, em seguida, a membrana foi lavada com solução tampão SSC 2X para a total remoção do formaldeído. Após as lavagens, a membrana foi pré-hibridizada a 42ºC, durante 4 h com 5 mL da solução *ULTRAhyb*™ (Ambion) em forno de hibridização Hybaid.

Um fragmento do gene *gsn* de aproximadamente 1350 pb subclonado no vetor pMOS*Blue* (construção existente no laboratório) foi utilizado como sonda, a qual foi marcada radiativamente com α[^{32}P]dATP por *random priming* utilizando o kit *NEBlot*™ (Biolabs) e, em seguida, purificada por filtração em resina Sephadex G-50 (Sigma) equilibrada em tampão NT (Tris-HCl 1 mM, pH 8,0, NaCl 1 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0) a fim de eliminar os nucleotídeos não incorporados. Em seguida, a desnaturação da sonda foi realizada pela incubação da mesma a 100ºC por 10 minutos e 100µL da sonda desnaturada (aproximadamente 10^8 cpm total) foi adicionada à solução de pré-hibridização. A hibridização foi realizada a 42ºC durante uma noite. Após a hibridização a membrana foi lavada em diferentes condições de estringência antes de ser exposta ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA).

Condições de lavagem:

SSPE 2x - 15 min/42°C

SSPE 0,5x; SDS 0,1% - 15 min/42°C

SSPE 0,1x; SDS 0,1% - 15 min/42°C

SSPE 0,1x; SDS 0,1% - 30 min/65°C

9- Clonagem das ORFs

9.1- Biblioteca de cDNA utilizada

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

9.2- Clonagem dos cDNAs por PCR

A biblioteca de cDNA (YpADE5) foi usada para a amplificação dos fragmentos, por PCR, utilizando os oligonucleotídeos apresentados na Tabela 2. Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das seqüências nucleotídicas dos genes que codificam as proteínas existentes no banco de dados do genoma de *N. crassa* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html). Nas seqüências dos oligonucleotídeos os códons de iniciação (AUG) e de término (UAA e UGA) estão salientados em negrito. Os sítios correspondentes às enzimas de restrição foram adicionados para facilitar a posterior subclonagem no vetor de expressão pET.

Combinações dos oligonucleotídeos F e R foram usadas em reações de PCR utilizando como molde a biblioteca de cDNA plasmidial YpADE5-*Nc*. As reações de amplificação das ORFs NCU02424 e NCU03876 foram realizadas utilizando 1,5 µg da biblioteca de cDNA, 0,5 µL (1,25U) da enzima *Platinum Pfx DNA Polimerase* (*Invitrogen*), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão de PCR 10x, 1 µL de $MgSO_4$ 50 mM, 2 µL de dNTP (10 mM) e de *enhancer* 10x (Invitrogen). Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96ºC/1 min), anelamento (50ºC/1 min) e polimerização (68ºC/1,5 min), por 30 ciclos, num volume final de 50 µL de reação.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados.

ORF	SEQUÊNCIA	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	FRAGMENTO ESPERADO (nt)
NCU03482	**F**: 5'-CCAT**ATG**GTGCAAATCAGCGAGG-3'	*Nde*I	1377
	R: *5'*-CGGAATTC**TCA**ACAAATAAACTCCTG-3'	*Eco*RI	
NCU06679	**F**: 5'-CCAT**ATG**GCGCGCGACGAGATTG-3'	*Nde*I	1695
	R: 5'-GAATTC**TCA**TTGCTGCTGTTGCTTC-3'	*Eco*RI	
NCU02424	**F**: 5'-GGAATTCCAT**ATG**CTGATCCGGCTATCAGCC-3'	*Nde*I	1554
	R: 5'-CGGAATTC**TTA**GCCACCAAACGGAAACCC-3'	*Eco*RI	
NCU03876	**F**: 5'-GGAATTCCAT**ATG**AGGCCCATTCTTC-3'	*Nde*I	1041
	R: 5'-CGGAATTC**TTA**GGCAGAAATGGTCTG-3'	*Eco*RI	
NCU01021	**F**: 5'-GGAATTCCAT**ATG**GCTGTCGATCAGG-3'	*Nde*I	1110
	R: 5'-CGGAATTC**TTA**CTCGGCAGCTTCCCT-3'	*Eco*RI	

A amplificação da ORF NCU01021 foi obtida por PCR, onde as condições da reação foram: 0,2 µg da biblioteca de cDNA e os ciclos dessa PCR foram: desnaturação (96ºC/1 min), anelamento (58ºC/1 min) e polimerização (68ºC/1,5 min), por 39 ciclos, num volume final de 50 µL de reação.

9.3- Clonagem dos cDNAs por RT-PCR

Os cDNAs que codificam as proteínas NCU06679 e NCU03482 foram amplificados por RT-PCR. A amplificação da ORF NCU06679 foi realizada inicialmente utilizando o "Kit Superscript III Platinum One-Step Quantitative RT-PCR System" (Invitrogen). No entanto a análise de restrição do fragmento obtido revelou que tal fragmento não correspondia ao respectivo cDNA. Dessa maneira outra metodologia foi empregada utilizando o kit comercial *Superscript*® III *First-strand Systhesis for* RT-PCR (Invitrogem). Para isso cerca de 5 µg do RNA total da linhagem selvagem FGSC#9718 foram tratadas com a enzima DNase RQ1 RNase-Free DNase (Promega) para eliminar contaminações por DNA genômico presente nas amostras de RNA. Em seguida, a síntese do cDNA foi efetuada, utilizando-se o kit de acordo com as instruções do fabricante.

A ORF NCU03482, inicialmente obtida por PCR convencional, foi amplificada utilizando como molde a biblioteca de cDNA plasmidial YpADE5-*Nc*. No entanto, uma análise de restrição realizada mostrou que o fragmento amplificado não correspondia à ORF. Dessa maneira a mesma metodologia empregada para amplificação da ORF NCU06679 também foi utilizada para a amplificação da ORF NCU03482.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf) no volume final de 50 µl, nas seguintes condições: 40 ciclos de 96°C por 1 minuto, 58ºC por 1 minuto e 68°C por minutos, após desnaturação inicial de 96°C por 4 minutos. Os produtos das reações de amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TAE 1x (Tris 0,4 M, ácido acético glacial 0,2 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0) contendo 50 µL de brometo de etídeo 1 mg/mL e, em seguida, foram purificados utilizando o kit Geneclean (Bio 101). Os fragmentos purificados foram confirmados por análise de restrição. Os fragmentos confirmados foram inseridos no vetor pMOS-Blue (“Blunt Ended PCR cloning kit”, GE Healthcare), cujo mapa físico está mostrado na Figura 5.

Os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes da linhagem DH10B e os plamídeos resultantes foram confirmados por análises de restrição.

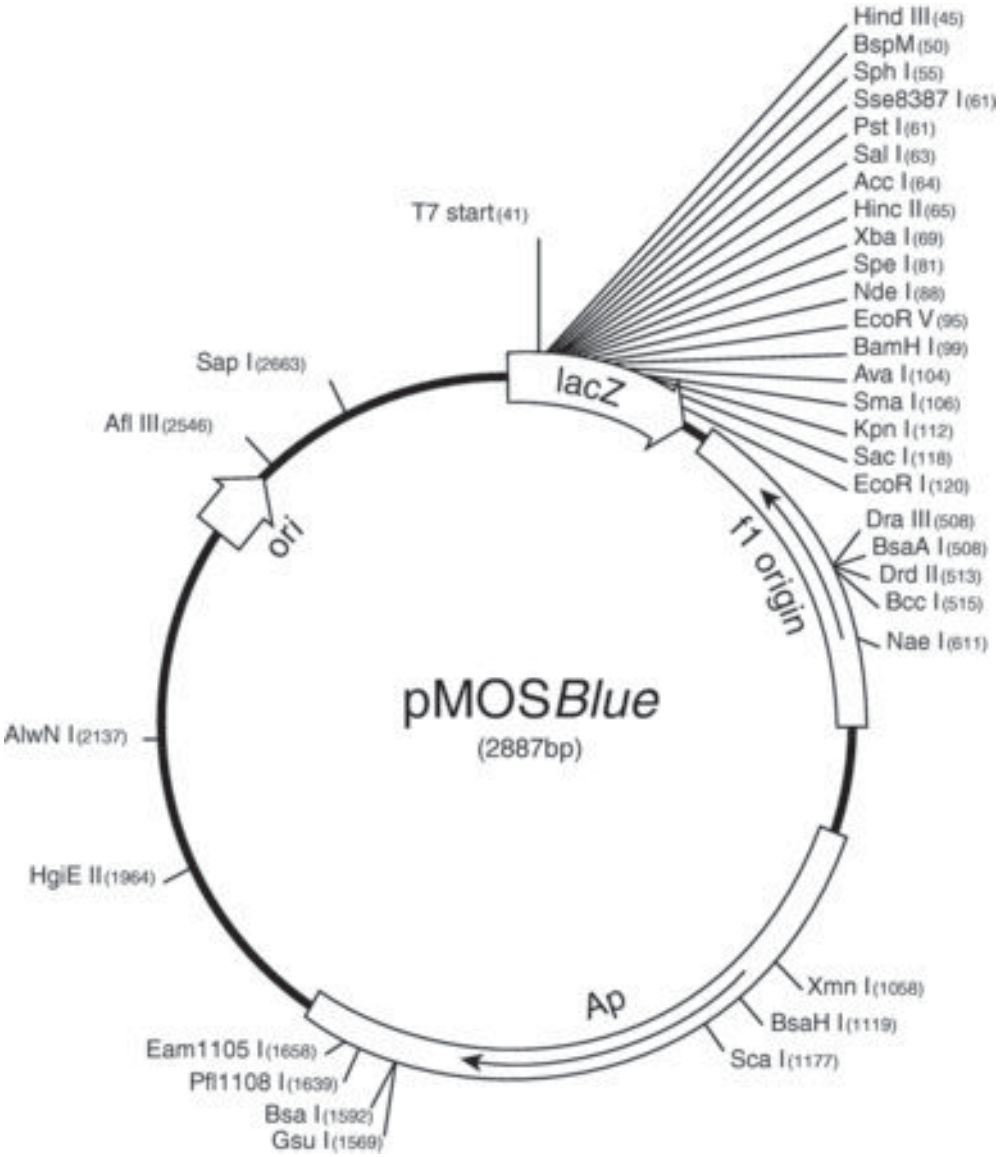


Figura 5- Mapa físico do vetor pMOS Blue (GE Healthcare).

10- Produção das proteínas recombinantes

10.1- Subclonagem das ORFs em vetor de expressão de *E. coli*

Após a obtenção do DNA plasmidial recombinante, as clonagens em vetor de expressão dos fragmentos de DNA correspondentes às ORFs NCU06679 e NCU02424 foram realizadas. Os fragmentos foram subclonados no vetor de expressão de *E. coli* pET-28a (Novagen), cujo mapa físico está mostrado na Figura 6. Este vetor possui a marca de seleção *KAN*, a qual confere resistência ao antibiótico canamicina em bactérias. Neste vetor, a produção de proteínas recombinantes está sob o controle do promotor induzível T7, o qual permite a produção da proteína recombinante em alta concentração em meio contendo IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo).

Para a subclonagem das ORFs foi realizada a clivagem dos plasmídeos pMOS-2424 e pMOS-6679 com as enzimas de restrição *EcoRI e NdeI* e os insertos isolados foram subclonados no vetor de expressão pET-28a, previamente linearizado com as mesmas enzimas de restrição, resultando na construção dos plasmídeos pET-2424 e pET-6679. Em ambas as reações foram utilizados 0.5 µL da enzima T4 ligase (NE Biolabs), 1 µL do tampão da enzima e água destilada completando o volume final para 10 µL. Os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem DH10B. As colônias obtidas na transformação foram utilizadas para a extração de DNA plasmidial recombinante, o qual foi submetido à análise de restrição com enzimas que clivam ao longo da seqüência nucleotídica dos insertos e do vetor para selecionar possíveis clones positivos. Os clones apresentando os tamanhos esperados foram submetidos ao seqüenciamento automático de DNA para certificação da integridade da seqüência do inserto.

11- Sequenciamento e análise das seqüências obtidas

Para a reação de seqüenciamento, o DNA plasmidial dos clones foi obtido pela utilização do *kit Miniprep* Geneclean® II onde as recomendações do fabricante foram seguidas rigorosamente. As reações de sequenciamento foram realizadas com o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction* (Applied Biosystems), seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante, utilizando 2 µL de oligonucleotídeos T7 terminator e pET-F na concentração de 1,6 pmol/µL cada, 2 µL de tampão de sequenciamento 5x, 2 µL de Big Dye e água completando o volume final para 10 µL. Na reação de PCR aplicou-se um ciclo inicial de 96°C por 2 minutos seguido de 40 ciclos de 96ºC por 30 segundos, 52ºC por 30 segundos, 60ºC por 4 minutos e finalmente 4ºC.

Para a lavagem, aos 10 µL da reação de sequenciamento foram adicionados 16,7 µL do *coktail* de precipitação. As amostras foram agitadas vigorosamente em *vortex* e mantidas no gelo

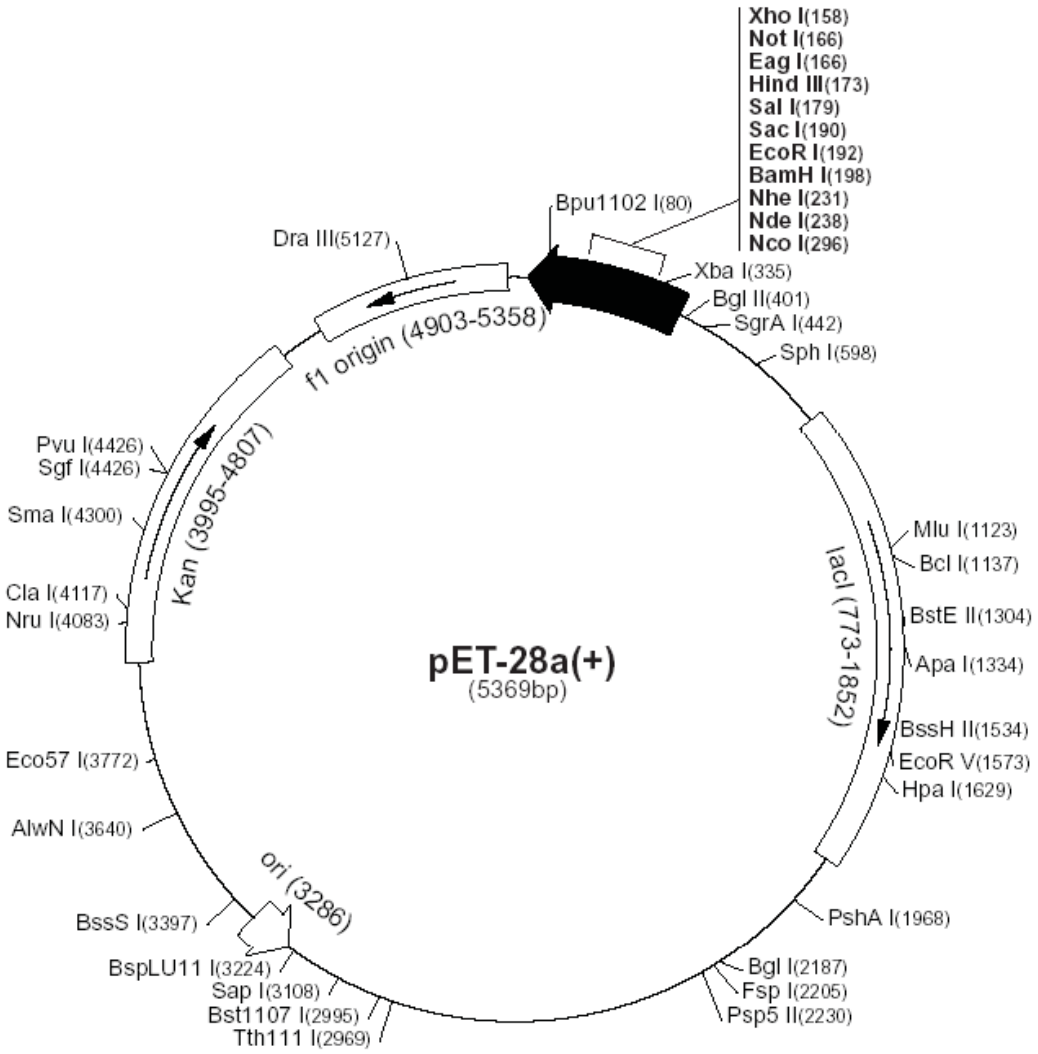


Figura 6- Mapa físico do vetor pET-28a (Novagen).

por 15 minutos. Em seguida foram centrifugadas a 1.500 *x g* por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente 50 µL de etanol 70% gelado foi adicionado nas amostras, as quais foram novamente centrifugadas por 20 minutos na mesma velocidade. Por fim, as amostras foram colocadas para secar por 1 minuto à 95ºC. Após a lavagem e secagem as amostras foram enviadas para seqüenciamento ao laboratório de seqüenciamento de DNA no Instituto de Química, USP, São Paulo.

12- Ensaios de produção das proteínas recombinantes e análise de solubilidade

Para a produção das proteínas recombinantes células da linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram utilizadas para a transformação com os plasmídeos pET-6679 e pET-2424. Seis colônias foram avaliadas em relação à produção das proteínas, em um ensaio preliminar. As colônias isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT contendo os antibióticos kanamicina 30 µg/mL e cloranfenicol 200 µg/mL e deixadas crescer a 37ºC, 200 rpm, por uma noite. Um volume de 500 µL dessa solução foi transferido para um Erlenmeyer contendo 50 mL do mesmo meio e incubados a 37ºC 250 rpm até atingir uma densidade óptica a 600 nm de 0,6 a 0,8.

Um volume de 2 mL de cada cultura foi retirado para análise das amostras antes da indução (amostras não induzidas – NI) e às culturas restantes foram adicionados volumes de IPTG nas concentrações de 0,4 mM ou 0,1 mM. As culturas foram incubadas a 30ºC ou 37ºC, 250 rpm, por mais 4 ou 6 horas. Ao final deste período, as células foram coletadas por centrifugação, ressuspensas em 10 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50mM, pH 8.0, NaCl 20mM, glicerol 5%, tween-20 0,5%, triton x-100 0,5%) e congeladas à -20 C por uma noite. As células, no dia seguinte, foram descongeladas totalmente e lisadas através de 3 ciclos de 30 segundos de sonicação a uma amplitude de 30% (sonicador SONICS, Vibra Cell) seguidos por 30 segundos de banho de gelo. Em seguida, o lisado celular foi centrifugado durante 10 minutos a 30.000 x *g* a 4ºC, o sobrenadante foi reservado separadamente e o precipitado ressuspenso em 10 mL do mesmo tampão de lise. Proteínas das amostras não induzidas, do precipitado e do sobrenadante foram analisadas através de SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) para verificar se as proteínas eram solúveis (presente no sobrenadante) ou insolúveis (presente no precipitado). Os géis foram corados com Coomassie Brilliant Blue R-250.

Como controle positivo da expressão, foi utilizado o plasmídeo pET-2369, contendo a ORF XAC2369 de *Xanthomonas citri* (construção existente no laboratório).

13- Análise da expressão protéica por *Western blot*

A análise da expressão protéica foi também realizada por *Western blot*. Para isso, as proteínas das amostras não induzidas, sobrenadantes e precipitadas foram analisadas em SDS-

PAGE gel 12%. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, com uma diferença de potencial de 100 V no sistema de eletroforese Mini-Protean II (Bio-Rad).

13.1 Ensaio de *Western blot*

A proteínas, após fracionamento por eletroforese, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicina 150 mM e metanol 20%, 100V, durante 2 horas utilizando o sistema de eletrotransferência "TransBlot (Bio-Rad)". A transferência foi visualizada na membrana de nitrocelulose pela coloração com solução de "Ponceau-S" (0,1% Ponceau-S e 10% ácido acético) por 5 minutos e descorada em água destilada para o aparecimento do marcador de peso molecular, o qual foi marcado com caneta.

Posteriormente, as membranas foram incubadas em TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%) acrescido de 5% de leite em pó desnatado, por aproximadamente 12 horas, sob baixa agitação. As membranas foram então lavadas com TBST para retirar todo o leite e incubadas com o anticorpo monoclonal anti-polyhistidine, conjugado com fosfatase (Sigma) em TBST contendo 5% de leite em pó durante 2 horas (diluição 1: 10000) em agitação lenta. Em seguida, as membranas foram submetidas a três lavagens consecutivas de 5 minutos cada com TBST. Por fim, procedeu-se a revelação incubando as membranas em solução reveladora constituída de tampão carbonato ($NaHCO_3$ 100 mM, $MgCl_2$ 1 mM, pH 9,8) acrescido de BCIP (5'-bromocloro indolil fosfato) e NBT (nitroazul de tetrazólio). Após revelação as membranas foram secas.

14- Citometria de fluxo

Culturas de *N. crassa* em meio sólido foram obtidas como descrito no item 3 de Materiais e Métodos. Os conídios foram coletados a 20.000 x *g* /5min/4ºC e um total de $5x10^4$ conídios foram suspensos em 0,5 mL de solução PI (Triton X-100 0.1%, citrato de sódio 0.1%, 0.9 U/ml RNase A, iodeto de propídeo 50 µg/mL) e deixados no escuro durante 90 minutos. Os conídios foram coletados por centrifugação e suspensos em tampão adequado (BD FACSFlow™) para realização da leitura em citometro de fluxo (BD FACSCalibur™ Flow Cytometer, BD Bioscience) utilizando um laser de argônio em 488nm. A análise dos dados coletados foi realizada através dos softwares BD FACSDiva (para análise morfológica) e CellQUEST™ (Becton Dickinson, San Juan, CA, USA) (para análise de ciclo celular). Um total de 10.000 células foram avaliadas por amostra e os experimentos foram repetidos três vezes.

As células em suspensão foram analisadas no laboratório do Prof. Dr. Rui Curi, no Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo com o auxílio do pós-doutorando Dr. Augusto Ducatti Luchessi, do ICB e do pós-graduando Rodrigo D.

Gonçalves, do IQ, UNESP, Araraquara. Para cada amostra foi determinado o tamanho, expresso em FSC (*forward scatter*) e a granulosidade, expresso em SSC (*side scatter*). Os dados foram disponibilizados em gráficos de dispersão de pontos (*dot plot*).

15- Ensaios de viabilidade celular

Estes ensaios foram realizados para complementar os resultados de incorporação de iodeto de propídeo obtidos nas análises morfológicas por citometria de fluxo. Para este ensaio, as linhagens foram cultivadas em garrafas e os conídios coletados como descrito anteriormente (item 3 de Materiais e Métodos). Placas de Petri foram preparadas com os meios VM acrescido de sorbose 2%, glicose 0,05%, frutose 0,05% e VM acrescido de sorbose 2%, glicose 0,05%, frutose 0,05% e extrato de levedo 2%. Placas de 96 *wells* foram utilizadas para a preparação da diluição das amostras onde em cada poço foram colocados 180 µL de meio VM líquido com exceção da primeira coluna onde foi colocado 200 µL de suspensão conidial numa densidade de 10^8 conídios/mL. Diluições seriadas foram realizadas a partir da amostra inicial até o total de 10^1 conídios/mL. Posteriormente, 5 µL de cada diluição foram transferidos para a superfície do meio contido nas placas de Petri, as quais foram incubadas a 30ºC/24h.

16- 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 37ºC 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 37ºC 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*/4ºC/15 minutos em microcentrífuga de mesa. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de $CaCl_2$ 100 mM gelada e estéril e dissolvidos em 8 mL de $CaCl_2$ 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas para as reações de transformação.

Para a transformação das células competentes, 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 42ºC por 2 minutos. Após o choque térmico, as suspensões foram adicionadas de 400 µL de meio 2YT e novamente incubadas a 37ºC/60 min. A seleção dos transformantes foi realizada através do plaqueamento em meio de cultura 2YT suplementado com 100 µg/mL de ampicilina e cultivados a 37ºC durante uma noite. As colônias resultantes do crescimento foram submetidas à extração do DNA plasmidial.

17- Mini-extração de DNA plasmidial

Células de colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT e crescidas a 37ºC durante uma noite. O DNA plamidial foi extraído pelo método de *boiling prep* descrito por Holmes and Quigley (1981), no qual cerca de 1,5 mL da cultura de células foram transferidos para tubos eppendorf de 1,5 mL, centrifugados a 14.000 rpm/1min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 350 µL de solução STET (Tris 10 mM, pH 8,0, sacarose 8%, Triton X-100 0,5%, EDTA 50 mM, pH 8,0, contendo 30 mg de lisozima). A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 40 segundos, e imediatamente resfriada em freezer -20ºC por 10 minutos. Em seguida, centrifugada a 20.817 x *g*/10 minutos.

Com uso de palitos de dente, o precipitado foi retirado e descartado, sendo os ácidos nucléicos precipitados com 40 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 420 µL de isopropanol. A seguir, o material foi centrifugado a 20.817 x *g* /10 minutos. O precipitado foi dissolvido em 100 µL de água pura e 100 µL de fenol saturado com tampão foi adicionado. Essa mistura foi vigorosamente agitada em *vortex* por 20 segundos e, posteriormente, centrifugada a 20.817 x *g* /10minutos. Um volume de 80 µL da fase aquosa foi transferido para um tubo eppendorf novo e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70% gelado. O DNA foi dissolvido em 20 µL de água após secagem por aproximadamente 15 minutos ao ar.

Os DNAs plasmidiais extraídos foram analisados por digestão com enzimas de restrição seguindo as instruções do fabricante. Células dos clones positivos selecionados foram armazenados à -80ºC como cultura permanente em glicerol 16%.

RESULTADOS

1- Características estruturais das proteínas estudadas

Em um trabalho anterior do nosso laboratório, algumas proteínas capazes de reconhecer e ligar ao elemento de DNA STRE da região promotora do gene *gsn* foram identificadas (FREITAS et al., 2008). A maioria destas proteínas encontra-se anotada como proteína hipotética e, após análise de suas seqüências polipeptídicas, algumas foram consideradas alvos promissores de estudo, baseado na presença de domínios protéicos bem caracterizados em outras proteínas. Estas proteínas foram alvo de estudos neste trabalho e a Figura 7 mostra uma representação destas ORFs:

- NCU01021, anotada como relacionada ao fator de iniciação da tradução (eIF3). Análises em sua seqüência polipeptídica revelou a presença de um domínio Mov3/MPN/PAD-1 localizado na extremidade N-terminal.
- NCU03876 e NCU06679 com domínios WD40 localizados ao longo da seqüência polipeptídica das proteínas. A proteína codificada pela ORF NCU06679 foi anotada como ortóloga à proteína Cac3p (*chromatin assembly-3*) de *S. cerevisiae.*
- NCU03482, uma proteína cuja análise da seqüência polipeptídica revelou a presença de um domínio Tip49 C-terminal, o qual interage com vários fatores nucleares, além de apresentar atividade DNA helicase intrínseca.
- NCU02424, uma proteína potencialmente interessante para investigação que se caracteriza por apresentar um domínio DnaJ localizado na extremidade N-terminal e três domínios tetratricopeptídicos (TPR).

Utilizando as informações disponíveis no genoma do fungo *N. crassa* (http://www.fgsc.net) juntamente com a utilização de ferramentas de bioinformática foram possíveis as caracterizações bioquímica, molecular e estrutural dessas proteínas, tais como ponto isoelétrico (pI), massa molecular teórica (MM) e a presença de sinais de localização nuclear (NLS). A estimativa teórica das propriedades físico-químicas das proteínas identificadas, bem como a determinação NLS clássicos foi realizada por meio das ferramentas ProtPAram (www.expasy.org/tools/protpar-ref.html) e PsortII (http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl), respectivamente.

A Tabela 3 mostra alguns dados bioquímicos das proteínas estudadas e a Tabela 4 mostra os dados físico-químicos.

2- Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes

A determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes foi realizada para avaliar a participação ou não das proteínas na regulação do metabolismo do carboidrato. Como as proteínas foram identificadas em complexos DNA-proteínas formados com um fragmento do

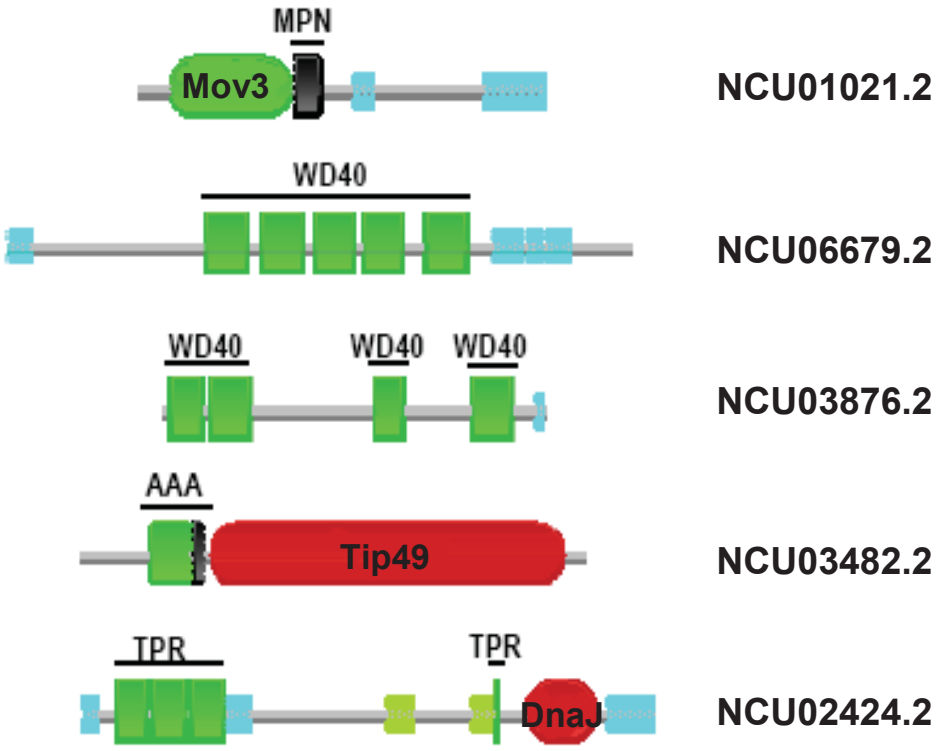


Figura 7- Representação esquemática das proteínas codificadas pelas ORFs hipotéticas estudadas neste trabalho. Estas proteínas foram previamente identificadas por espectrometria de massas, e as sequências polipeptídicas foram analisadas (mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa). As características estruturais dos domínios protéicos foram descritas em Introdução (página 26).

Tabela 3: Dados moleculares das proteínas estudadas.

ORF	cDNA (nt)	GENE (nt)	ÍNTRONS
NCU01021	1110	1345	1
NCU03876	1041	1300	2
NCU03482	1377	1580	2
NCU02424	1554	1633	1
NCU06679	1695	1825	1

Tabela 4: Dados teóricos das propriedades físico-químicas das proteínas estudadas.

ORF	Resíduos de AA	Massa molecular estimada (Da)	Ponto isoelétrico	NLS*
NCU01021	370	39694.0	4.92	-
NCU03876	347	38796.6	6.19	-
NCU03482	459	49811.3	5.69	230-HKKK (M)
NCU02424	518	55776.4	8.02	-
NCU06679	565	63446.3	5.33	533-RAAQMTGAERHRKTRS (B)

* *Nuclear Localization Site.* M e B correspondem ao sinal de localização nuclear monopartido (M) e bipartido (B).

promotor *gsn* (gene que codifica a enzima glicogênio sintase, regulatória no processo de síntese do carboidrato) seria importante avaliar o conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes e comparar ao obtido para a linhagem selvagem. As quantificações foram realizadas nas amostras dos micélios coletados antes do choque térmico (amostra ZERO) e após o choque térmico (amostra HS30). A avaliação após o choque térmico é um aspecto importante do trabalho, uma vez que as proteínas foram identificadas como presentes em complexos DNA-proteína formados com extratos celulares submetidos a esta situação de estresse. Na linhagem selvagem o acúmulo de glicogênio é máximo no final da fase exponencial de crescimento (24 h) e diminui acentuadamente no início da fase estacionária. Quando o micélio do fungo é submetido ao choque térmico (transferência de 30 para 45ºC) o conteúdo de glicogênio é drasticamente reduzido (DE PAULA et al*.,* 2002; FREITAS; BERTOLINI, 2004).

O conteúdo de glicogênio antes e depois do choque térmico foi analisado em todas as linhagens mutantes tendo como referência o conteúdo da linhagem selvagem, nas mesmas condições. A dosagem foi realizada através da determinação da quantidade de glicose liberada pela digestão do glicogênio com as enzimas α-amilase e amiloglicosidase e a concentração de glicogênio foi expressa em relação à quantidade de proteína presente no extrato protéico. Os resultados estão apresentados na Figura 8. Em uma primeira análise, todas as linhagens mutantes avaliadas apresentaram um perfil de acúmulo de glicogênio semelhante ao da linhagem selvagem após 30 minutos de choque térmico, isto é, todas apresentaram uma queda nas quantidades de glicogênio após o choque térmico, como mostra a figura. Entretanto, o acúmulo de glicogênio pelas linhagens mutantes antes do choque térmico (30ºC) é menor do que aquele observado para a linhagem selvagem na mesma situação. A linhagem mutante na ORF NCU06679 apresentou o conteúdo de glicogênio mais reduzido, comparado ao da linhagem selvagem, em ambas as situações (antes e depois do choque térmico). Esta proteína e a linhagem mutante respectiva parecem ser, portanto, alvos interessantes de estudos, uma vez que é a linhagem na qual o conteúdo de glicogênio mostra-se mais comprometido.

3- Análise da expressão do gene *gsn* por *Northern blot*

A análise da expressão do gene *gsn* nas linhagens mutantes é uma análise importante a ser realizada uma vez que resultados obtidos anteriormente em nosso laboratório mostraram que a expressão do gene *gsn* é máxima em 24 horas de crescimento e é drasticamente reduzida após choque térmico (DE PAULA et al*.,* 2002; FREITAS; BERTOLINI, 2004). Para isto, o RNA total das linhagens mutantes e selvagem foi preparado a partir das mesmas amostras de micélio utilizadas na dosagem de glicogênio, ou seja, amostras não submetidas ao choque térmico (amostra ZERO) e amostras obtidas após choque térmico (amostra HS30). O RNA total da linhagem selvagem (FGSC#9718) foi utilizado como referência. Na análise, o transcrito do gene codificador do RNA

Linhagens	Conteúdo de glicogênio a 30ºC (%)*
FGSC#9718 (selvagem)	100%
NCU01021	20,3%
NCU06679	60,6%
NCU03876	18,7%
NCU03482	29,7%
NCU02424	16,2%

*Porcentagem de redução do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes em relação à selvagem.

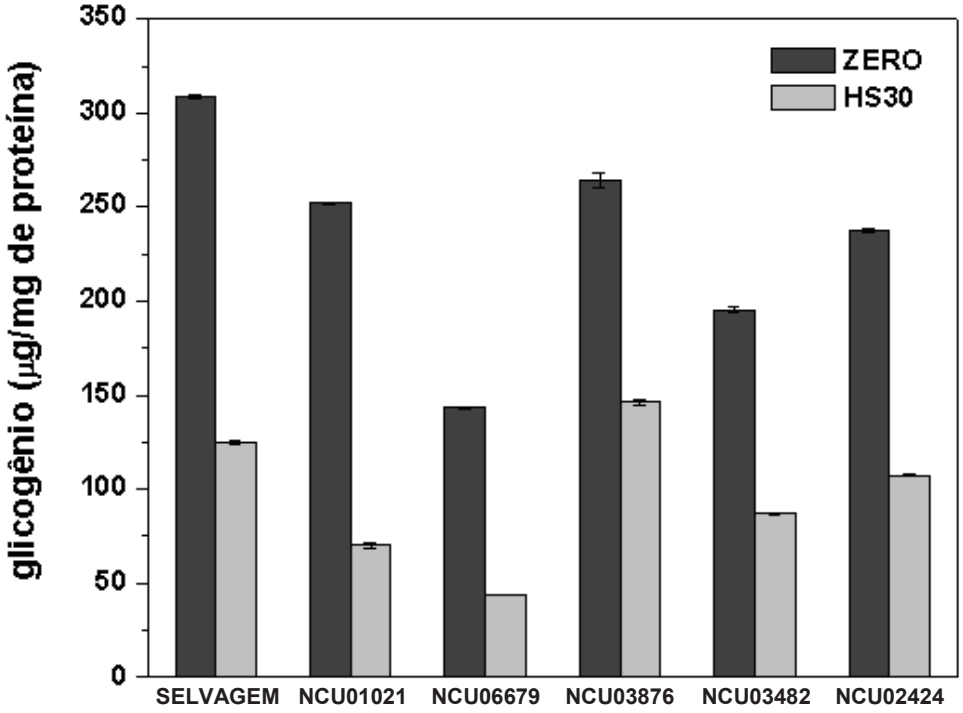


Figura 8- Conteúdo de glicogênio nas linhagens selvagem e mutantes de *N. crassa*. Linha 1, linhagem selvagem (FGSC#9718). Linhas 2-6, linhagens mutantes nas ORFs. O conteúdo de glicogênio foi determinado através da digestão com as enzimas α-amilase e amiloglicosidase e posterior quantificação de glicose livre. Os resultados correspondem à média de no mínimo três experimentos independentes.

ribossômico 18 S foi utilizado como controle endógeno e os resultados estão apresentados na Figura 9.

Os resultados mostraram que na situação de estresse térmico os níveis do transcrito *gsn* diminuem em todas as linhagens mutantes, semelhante ao observado para a linhagem selvagem. Entretanto, a diminuição na expressão do gene é ainda maior na linhagem que contem a ORF NCUO6679 nocauteada, uma vez que antes do choque térmico o nível do transcrito *gsn* nesta linhagem mutante é maior do que o observado na linhagem selvagem. Os resultados obtidos na expressão do gene corroboraram com os resultados obtidos na quantificação de glicogênio nas mesmas linhagens em relação à redução após choque térmico e demonstraram que mudanças na síntese do carboidrato podem acontecer por alterações na expressão gênica. Em relação à linhagem mutante na ORF NCU06679 o resultado obtido mostrou um aumento na expressão do gene antes do choque térmico, comparado à linhagem selvagem e mais uma vez mostrou que esta linhagem constitui num importante alvo de estudo.

Analisando conjuntamente os resultados de acúmulo de glicogênio e expressão do gene *gsn* foi possível observar que as proteínas podem atuar na regulação do metabolismo do carboidrato, uma vez que os conteúdos de glicogênio, assim como os níveis de expressão do gene *gsn* estão levemente alterados quando comparados aos obtidos para a linhagem selvagem nas duas situações estudadas, durante o crescimento normal do fungo e após submissão ao choque térmico, principalmente na linhagem mutante na ORF NCU06679.

4- Análise do crescimento das linhagens

A análise das seqüências polipeptídicas das proteínas alvo deste estudo mostrou a presença de domínios protéicos importantes. Em função disso, foi analisado se a ausência de um determinado fator de transcrição poderia afetar o crescimento celular da linhagem mutante. Para isso, o crescimento das linhagens mutantes foi comparado em relação ao crescimento da linhagem selvagem. A taxa de crescimento em meio sólido foi avaliada utilizando *race tubes,* e os resultados mostraram que o crescimento das linhagens mutantes não diferenciou muito do crescimento da linhagem selvagem, exceto no crescimento apresentado pela linhagem mutante na ORF NCU06679 (Fig.10A) O crescimento médio apresentado por esta linhagem, comparativamente à linhagem selvagem, até o terceiro dia, foi visivelmente mais reduzido. As demais linhagens mutantes acompanharam o crescimento da linhagem selvagem, as quais atingiram o final dos tubos em 3 dias.

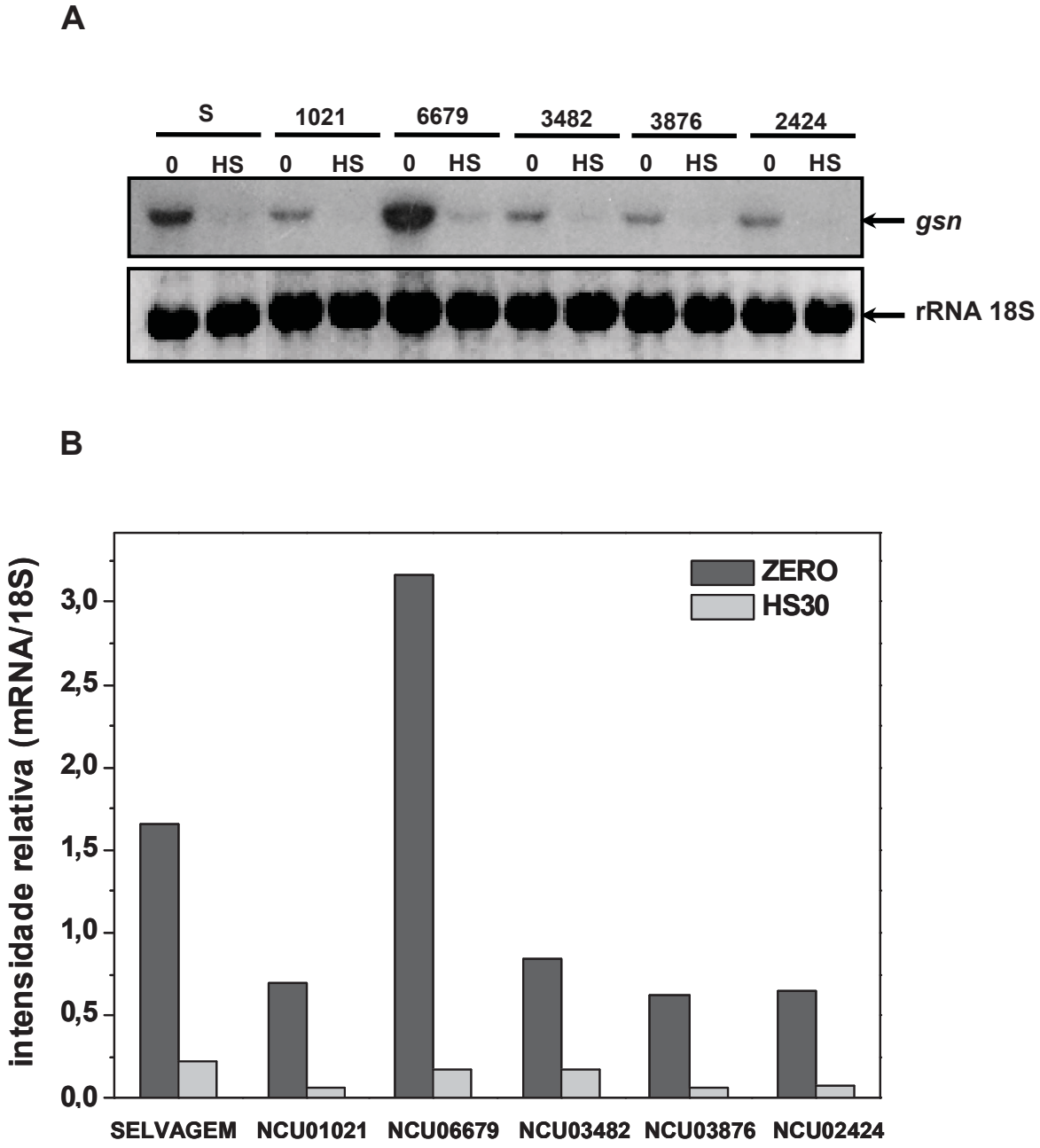
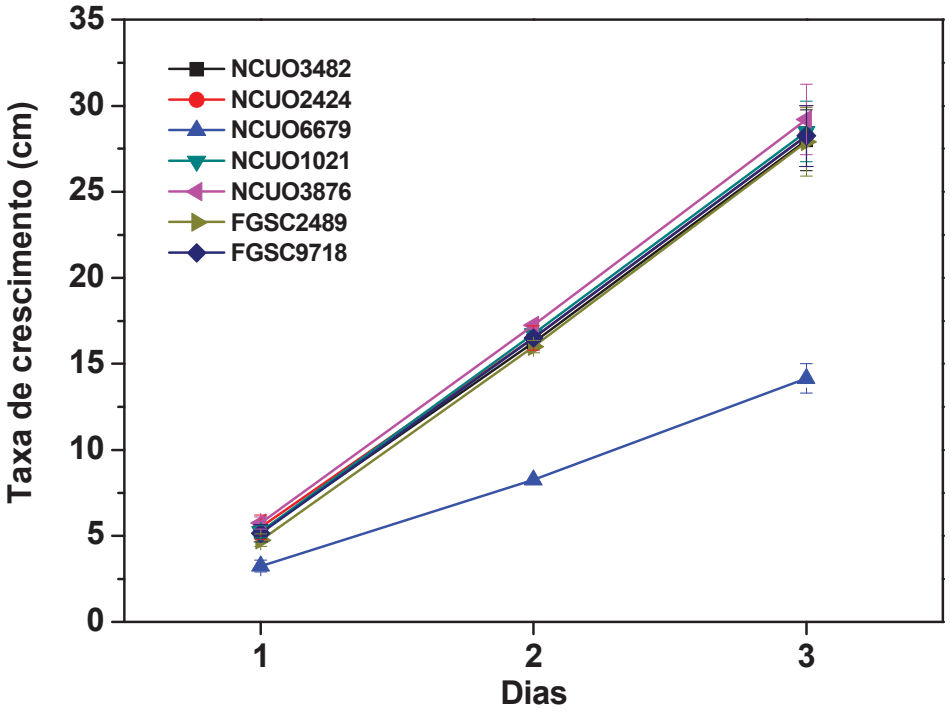


Figura 9- Expressão do gene *gsn* nas linhagens mutantes. **A**, RNA total das linhagens selvagem e mutantes de *N. crassa* analisado por *Northern blot*. Autoradiografia do gel (painel superior) e gel de agarose (painel inferior). **S,** selvagem; **0**, amostra antes do choque térmico; **HS**, amostra após choque térmico. **B**, Análise densitométrica da indução do gene *gsn* antes e depois do choque térmico nas linhagens selvagem e mutantes.

A



B

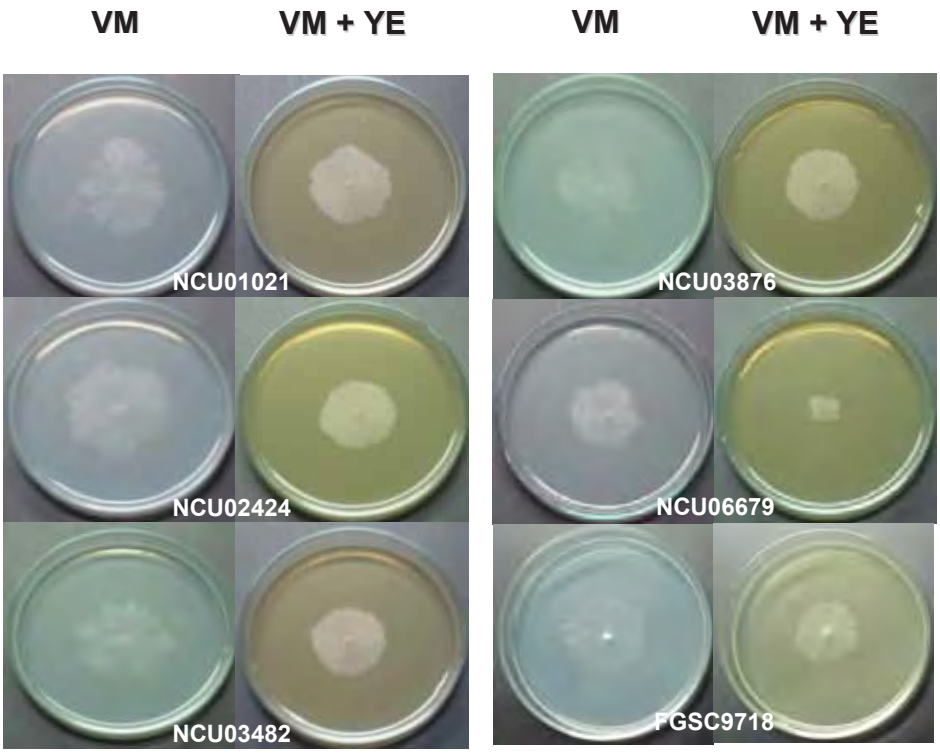


Figura 10- Análise do crescimento nas linhagens mutantes. **A,** Taxa de crescimento linear em *race tubes* e **B,** crescimento radial.

Ainda com o objetivo analisar se a ausência de uma determinada proteína poderia afetar o crescimento celular da linhagem mutante, o crescimento radial foi observado, sempre em comparação à linhagem selvagem. Os resultados desse ensaio estão apresentados na Figura 10B. A figura mostra que o crescimento radial das linhagens mutantes, tanto em meio VM ou em VM + YE (um meio mais rico), acompanhou o crescimento da linhagem selvagem exceto, novamente, na linhagem mutante na ORF NCU06679 em que é observado um crescimento bastante reduzido.

Um aspecto interessante, observado nesse ensaio, é que as linhagens apresentam um maior crescimento em meio mínimo (VM) livre de extrato de levedo. No entanto as hifas estão menos agrupadas o que favorece o espalhamento pela placa. Em placas com meio mínimo acrescido de extrato de levedo (VM + YE) o crescimento se mostra menor, porém as hifas estão mais condensadas.

5- Confirmação do nocaute nas linhagens mutantes

As linhagens mutantes, objetos de estudo deste trabalho, correspondem a linhagens nocauteadas nos genes alvos através da inserção por recombinação homóloga de uma marca de seleção. Estas linhagens não foram construídas em nosso laboratório, deste modo a confirmação deste nocaute foi importante para verificar se as linhagens são realmente mutantes nos genes alvos.

Com o objetivo de confirmar a ausência dos genes nas linhagens mutantes o DNA genômico de cada uma foi extraído e utilizado em reações de amplificação por PCR, juntamente com o DNA genômico da linhagem selvagem do fungo. As condições de ambas as reações foram as mesmas e sempre realizadas concomitantemente. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 11.

Analisando os resultados observamos que os genes correspondentes às ORFs NCU03876 (Fig. 11B, fragmento de 1,3 kb), NCU03482 (Fig. 11C, fragmento de 1,6 kb), NCU02424 (Fig. 11A, fragmento de 1,6 kb) e a NCU01021 (Fig. 11E, fragmento de 1,3 kb) foram amplificados nos tamanhos esperados (Tabela 2) e apenas na linhagem selvagem, confirmando, portanto, a ausência dos genes nas linhagens mutantes correspondentes. É importante lembrar que estas ORFs foram amplificadas a partir do DNA genômico e, portanto, os fragmentos apresentaram um tamanho esperado para a seqüência nucleotídica contendo íntrons. Entretanto, o produto de amplificação na linhagem selvagem não corresponde ao tamanho esperado para o gene correspondente à ORF NCU06679 que com a presença do íntron deveria apresentar um tamanho de1,8 kb (Fig. 11D).

A ausência do produto de amplificação por PCR nas linhagens mutantes não é a melhor comprovação do nocaute.

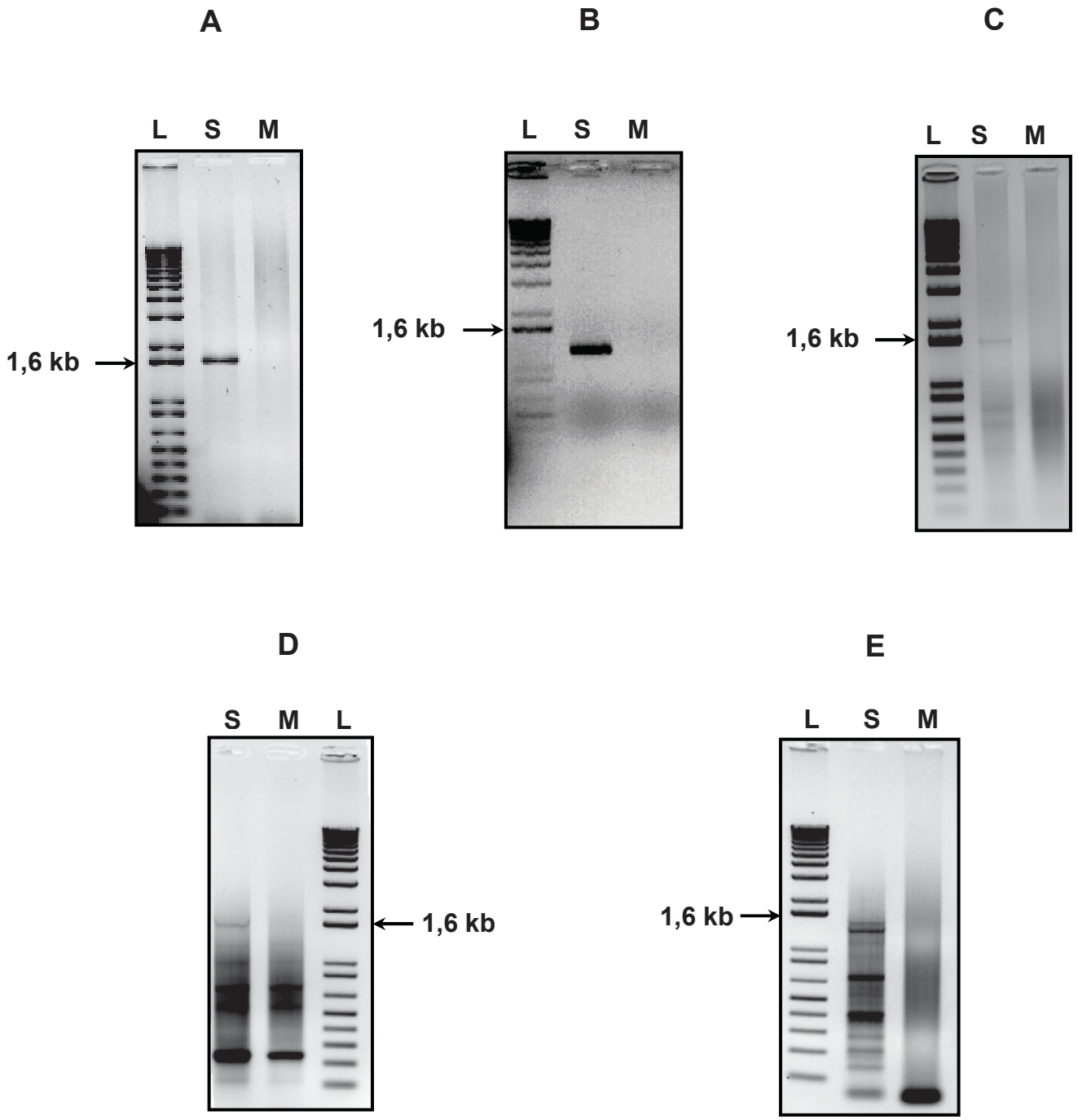


Figura 11- Amplificação de fragmentos correspondentes às ORFs a partir de DNA genômico das linhagens selvagem e mutantes. **A**, NCU02424; **B**, NCU03876; **C**, NCU03482; **D**, NCU06679 e **E**, NCU01021. **S**, reação de amplificação usando o DNA genômico da linhagem selvagem como fonte de DNA e **M**, reação de amplificação usando o DNA genômico da linhagem mutante como fonte de DNA. Eletroforese em gel agarose 1,0% dos produtos de amplificação. **L** representa o *ladder* de DNA de 1 kb.

6-Clonagem dos cDNAs que codificam as proteínas estudadas

A clonagem dos cDNAs foi realizada por PCR utilizando como fonte de DNA uma biblioteca de cDNA (YpADE5) ou por RT-PCR a partir de RNA total. As reações de amplificação foram realizadas utilizando diferentes combinações de oligonucleotídeos, variações de temperatura de anelamento (55ºC e 50ºC) e também variações na concentração de DNA (1µg e 1,5 µg). As ORFs NCU02424 e NCU03876 foram amplificadas a partir da biblioteca de cDNA e a melhor condição de amplificação foi obtida com uma temperatura de anelamento de 50ºC e uma concentração de DNA de 1,5 µg.

Para as amplificações dos fragmentos das ORFs NCU06679, NCU01021 e NCU03482 inúmeras tentativas experimentais foram realizadas, nas quais mudanças nas concentrações de DNA (0,5 µg, 1 µg e 2,5 µg) e variações na temperatura de anelamento (51 a 68ºC) foram realizadas. Finalmente, fragmentos correspondentes às ORF NCU06679 e NCU03482 foram amplificados numa reação de RT-PCR, a partir de RNA total e a amplificação do fragmento correspondente à ORF NCU01021 foi obtida com uma reação de PCR utilizando uma quantidade muito reduzida da biblioteca plasmidial.

Os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,0% e estão mostrados na Figura 12. Todos os fragmentos amplificados corresponderam aos tamanhos esperados, os quais são: NCU02424 (Fig. 12A, linha 2, fragmento de 1554 bp), NCU03482 (Fig. 12B, linhas 1 e 2, fragmento de 1377 bp), NCU03876 (Fig. 12A, linha 1, fragmento de 1041 bp), NCU06679 (Fig. 12C, fragmento de 1695 bp) e NCU01021 (Fig. 12D, fragmento de 1110 bp).

Os fragmentos foram removidos do gel de agarose e purificados. Uma análise de restrição foi realizada utilizando enzimas com sítios localizados ao longo das seqüências nucleotídicas das ORFs. O objetivo dessa análise foi verificar se tais fragmentos eram verdadeiramente correspondentes às ORFs. Para isso, os fragmentos foram digeridos com as enzimas citadas na Tabela 5 e os resultados obtidos estão mostrados na Figura 13. Como observado, as análises mostraram que os fragmentos foram digeridos com as enzimas citadas na Tabela 5 e liberaram fragmentos de tamanhos esperados, indicando que são verdadeiramente aqueles esperados para as respectivas ORFs. Apenas o fragmento correspondente à ORF NCU01021 provavelmente não é o esperado uma vez não foi digerido com a enzima utilizada. Digestões enzimáticas com outras enzimas de restrição foram realizadas confirmando que o fragmento amplificado não é o esperado para esta ORF. Experimentos posteriores deverão ser realizados para a clonagem desta ORF.

Após comprovação de que quatro dos fragmentos correspondiam às ORFs, estes foram purificados, ligados ao vetor de clonagem pMOS e os produtos de ligação foram usados para transformar células bacterianas da linhagem DH10B. As colônias isoladas foram usadas para a extração de DNA plasmidial e análise dos plasmídeos recombinantes.

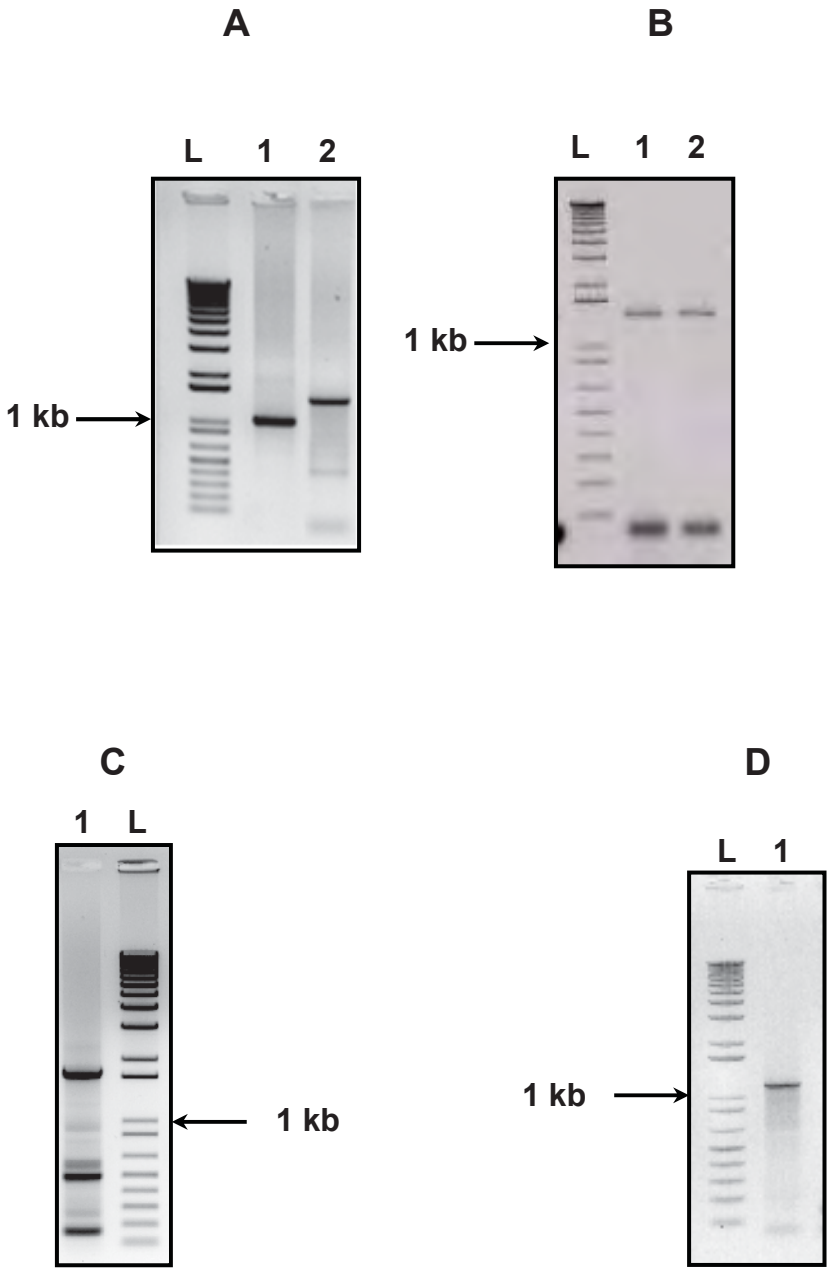


Figura 12- Amplificação dos fragmentos de DNA correspondentes às diferentes ORFs. **A**, amplificação das ORFs **NCU03876** (linha 1) e **NCU02424** (linha 2) a partir da biblioteca plasmidial pYADE5. **B**, amplificação da ORF **NCU03482** (linhas 1 e 2). **C**, amplificação da ORF **NCU06679** por RT-PCR. **D**, amplificação da ORF **NCU01021** a partir da biblioteca plasmidial pYADE5. Eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose 1,0% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). **L** representa o *ladder* de DNA de 1 kb (Invitrogen).

Tabela 5: Enzimas utilizadas nas análises de restrição e tamanho dos fragmentos esperados.

ORF	ENZIMA USADA (sítio de restrição)	FRAGMENTOS ESPERADOS
NCU03482	*Eco*RV(768 pb)	768 e 609 pb
NCU03876	*Bgl*II (824 pb)	824 e 217 pb
	*Sac*I (569 pb)	569 e 472 pb
NCU02424	*Bam*HI (702 pb)	702 e 852 pb
	*Nhe*I (1005 pb)	549 e 1005 pb
NCU01021	*Sac*I (603 pb)	507 e 603 pb
NCU06679	*Sac*II (1382 pb)	1382 e 313 pb
	*Xho*I (1449 pb)	1449 e 246 pb

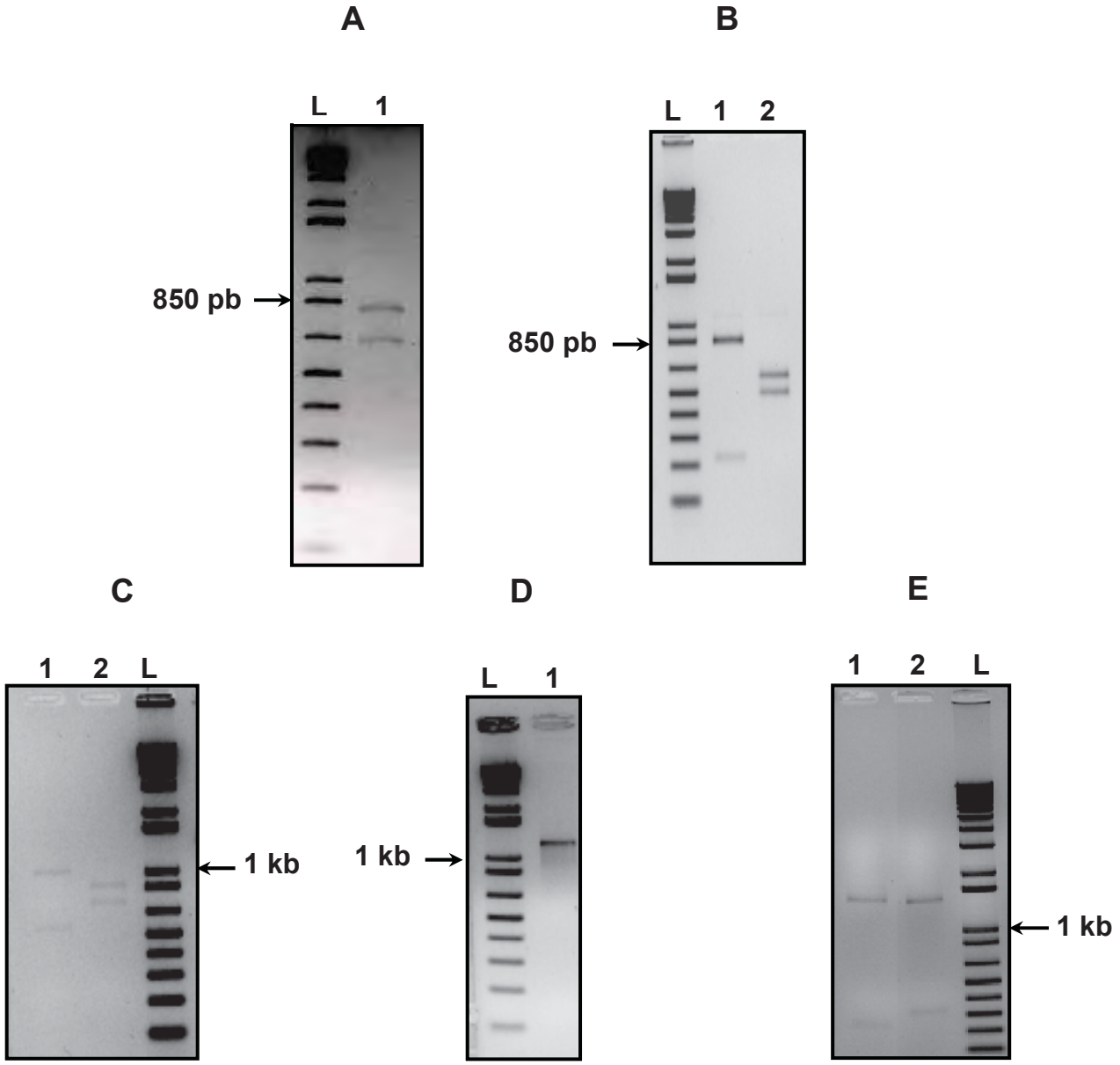


Figura 13- Análises de restrição dos fragmentos de DNA amplificados. **A**, NCU03482 digerido com *Eco*RV. **B**, NCU03876 digerido com *Bgl*I (linha1) e *Sac*I (linha 2). **C**, NCU02424 digerido com *Nhe*I (linha1) e *Bam*HI (linha 2). **D**, NCU01021 digerido com *Sac*I (linha 1). **E**, NCUO6679 digerido com *Xho*I (linha 1) e *Sac*II (linha 2). Eletroforese dos produtos de amplificação em gel de agarose 1,0% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL). **L** representa o *ladder* de DNA de 1 kb.

As clonagens foram realizadas com os fragmentos das ORFs NCU02424, NCU03482, NCU03876 e NCU06679 e os DNAs plasmidiais dos clones transformantes foram digeridos com as enzimas *Eco*RI e *Nde*I, as quais possuem sítios nas extremidades dos insertos, para verificar se os fragmentos liberados correspondiam aos insertos clonados no vetor. Os resultados estão mostrados na Figura 14. Vários clones transformantes com a ORF NCU03482 foram analisados e um clone mostrou ser clone positivo (Fig.14A), uma vez que a digestão liberou o fragmento com o tamanho esperado (1377 pb). Da mesma maneira, os clones transformantes das ORFs NCU02424, NCU03876 e NCU06679 foram analisados e apresentaram, respectivamente, três clones positivos (Fig. 14B, linhas 1, 2 e 4, fragmento esperado de 1554 pb), dois clones positivos (Figura 14C, linhas 2 e 3, fragmento esperado de 1041 pb) e seis clones positivos (Fig. 14D, linhas 1, 2, 3, 4, 5 e 6, fragmento esperado de 1695 pb). Estes clones foram estocados a -80ºC como culturas permanentes.

7- Análise morfológica das linhagens por citometria de fluxo

As análises de citometria de fluxo foram realizadas com objetivo de obter alguma informação a respeito das características morfológicas dos conídios das linhagens estudadas em comparação à linhagem selvagem. Conídios foram coletados, marcados com o iodeto de propídeo (PI) e analisados em um citometro de fluxo no comprimento de onda de 488 nm. Os dados coletados foram, posteriormente, analisados em software BD FACSDiva e os resultados estão apresentados na Figura 15.

A citometria de fluxo é uma tecnologia, baseada no emprego de radiação laser, utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Os citômetros de fluxo têm como princípio básico aspirar as células de uma suspensão previamente preparada e forçá-las a passar por uma câmara especial que faz com que as células fiquem envolvidas e centralizadas num fluxo contínuo de líquido e saiam desta câmara uma atrás da outra de modo que uma única célula seja interceptada pelo laser. Uma vez interceptada pelo laser, informações acerca da célula podem ser obtidas. A luz é espalhada (*scatter*) de acordo com as características morfológicas e estruturais da célula e os resultados são apresentados com dois parâmetros, o F*orward Scatter* (FSC) que relaciona com o tamanho e o *Side Scatter* (SSC) com a granularidade da célula ou partícula (MACKLIS; MADISON, 1990; NEBE-VON CARON et al., 1995, 2000).

Os resultados apresentados na Figura 15 sugerem que as linhagens mutantes têm um comportamento bastante semelhante ao apresentado pela linhagem selvagem, com relação à dispersão (SSC) e tamanho (FSC) das células, com exceção da linhagem mutante na ORF NCU06679, na qual foi possível observar a presença de populações de células com morfologias distintas.

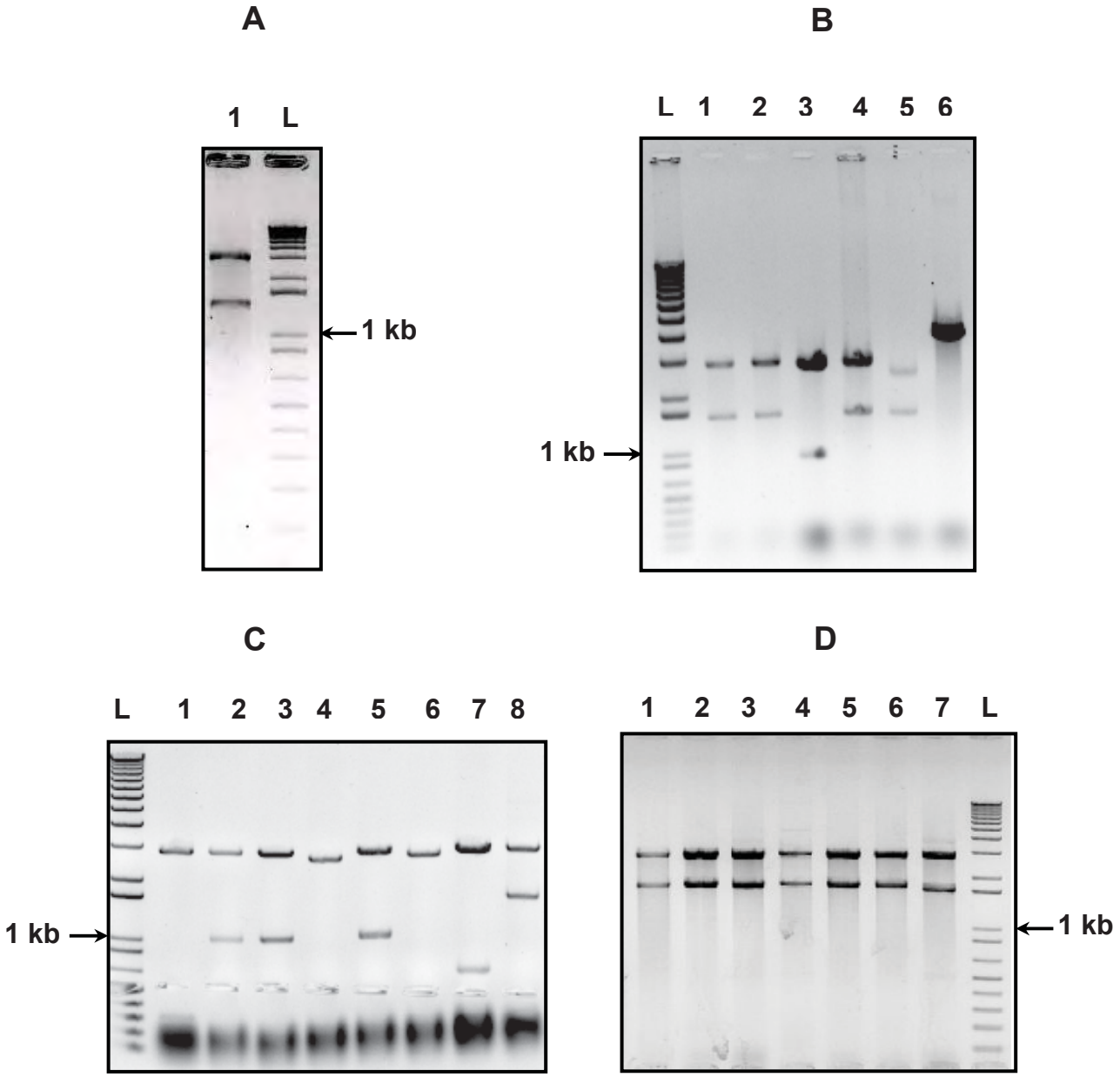


Figura 14- Análise de restrição dos DNAs plasmidiais contendo as ORFs NCU03482 (**A**), NCU02424 (**B**), NCU03876 (**C**) e NCU06679 (**D**) no vetor pMOS. Eletroforese em gel agarose 1,0% dos produtos de digestão com as enzimas de restrição *Nde*I e *Eco*RI. **L** representa o *ladder* de DNA de 1 kb.

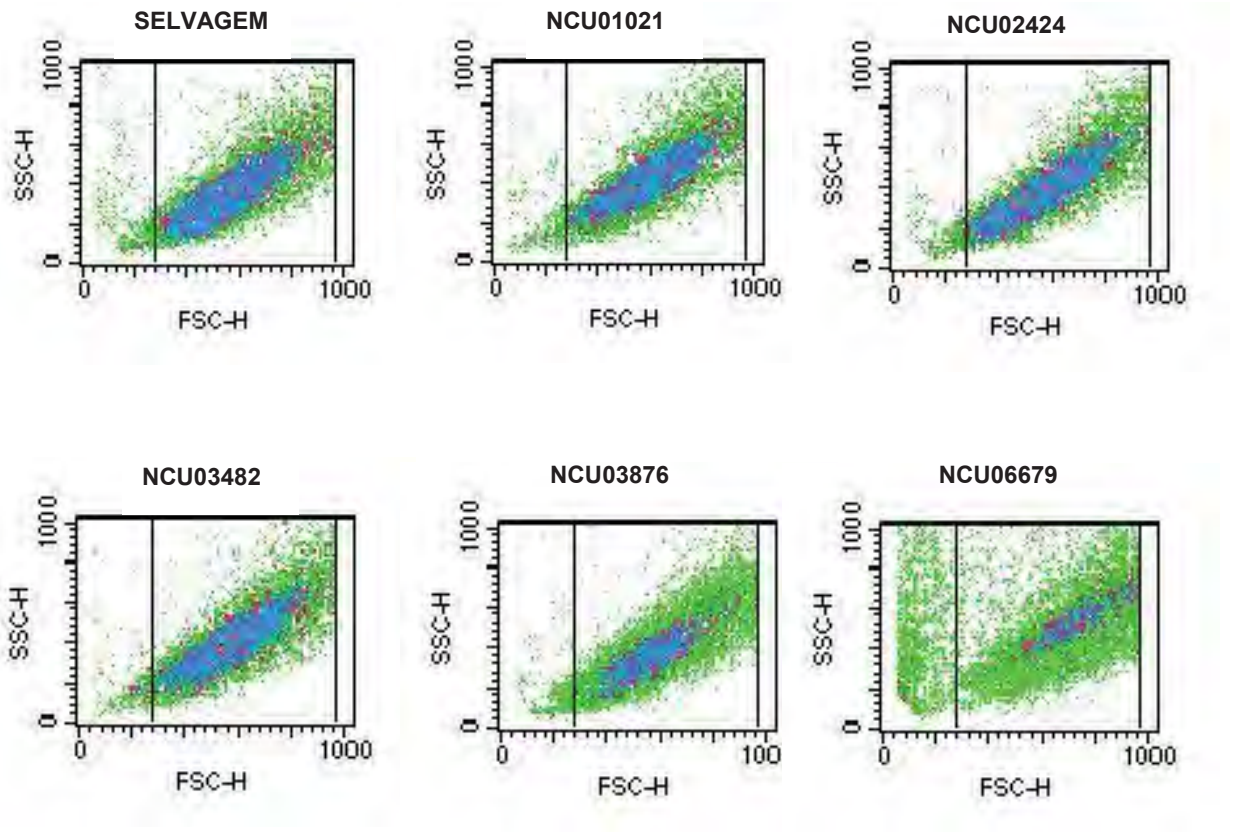


Figura 15- Análise morfológica das linhagens mutantes por citometria de fluxo. O resultado está expresso em função do tamanho celular (FSC-H) e complexidade celular (SSC-H). Cerca de 10.000 células foram contadas para cada linhagem. Este é o resultado típico de no mínimo três experimentos realizados. Os dados foram obtidos através do software BD FACSDiva.

Em relação à incorporação de PI, todas as linhagens mutantes apresentaram um padrão de incorporação semelhante ao observado para a linhagem selvagem, com exceção da linhagem mutante na ORF NCU06679, que apresenta uma grande incorporação do fluorocromo.

Como a incorporação de PI pode estar relacionada à viabilidade celular, ensaios de sucessivas diluições das suspensões conidiais dessas linhagens foram realizados, e a análise foi feita em função da comparação do crescimento das linhagens mutantes em relação ao da linhagem selvagem, nas respectivas diluições. O crescimento em meio sólido (VM e VM+YE) contendo sorbose para indução do crescimento colonial, foi avaliado nas concentrações variando de 10^8 a 10^1 conídios/mL e os resultados estão apresentados na Figura 16. Os resultados obtidos mostraram que o crescimento das linhagens mutantes não diferenciou em relação ao da linhagem selvagem, exceto para a linhagem mutante na ORF NCU06679, a qual mostrou um crescimento diminuído nas ultimas diluições utilizadas em meio VM. Em meio VM+ YE (meio mais rico) esta diferença não foi observada.

8- Análise do ciclo celular das linhagens por citometria de fluxo

A análise de ciclo celular utilizando a técnica de citometria de fluxo também foi realizada nas linhagens mutantes e os resultados estão mostrados na Figura 17. Esta análise foi realizada, pois uma das maneiras para avaliar se uma proteína participa no controle do ciclo celular é ter células mutantes na referida proteína. Basicamente todas as linhagens mutantes apresentaram um perfil semelhante ao observado na linhagem selvagem, com exceção da linhagem mutante na ORF NCU06679. A curva obtida para a linhagem selvagem foi sobreposta sobre os resultados das análises nas linhagens mutantes e está representada nos gráficos à direita na figura. Apenas a linhagem mutante na ORF NCU06679 apresentou um perfil distinto da linhagem selvagem, o que pode ser um indicativo de que a ausência de tal proteína afeta o desenvolvimento celular da linhagem mutante.

9- Subclonagem dos cDNAs em vetor de expressão em *E. coli*

O sistema de expressão baseado em vetores da família pET é o mais utilizado para a expressão de proteínas recombinantes em *E. coli.* O vetor pET-28a permite a expressão da proteína recombinante fusionada à seis resíduos de histidina na extremidade amino (N-terminal) ou carboxi-terminal (C-terminal), o que facilita a purificação por técnicas de cromatografia de afinidade, com resinas de sefarose combinadas com o níquel. Além disso, a expressão do gene está sob o controle do promotor do fago T7, que promove a expressão gênica pela indução com IPTG em algumas linhagens de *E. coli.* Os vetores da família pET utilizam um promotor do fago T7 que é reconhecido pela RNA polimerase do fago (T7 RNA polimerase), mas não pela RNA

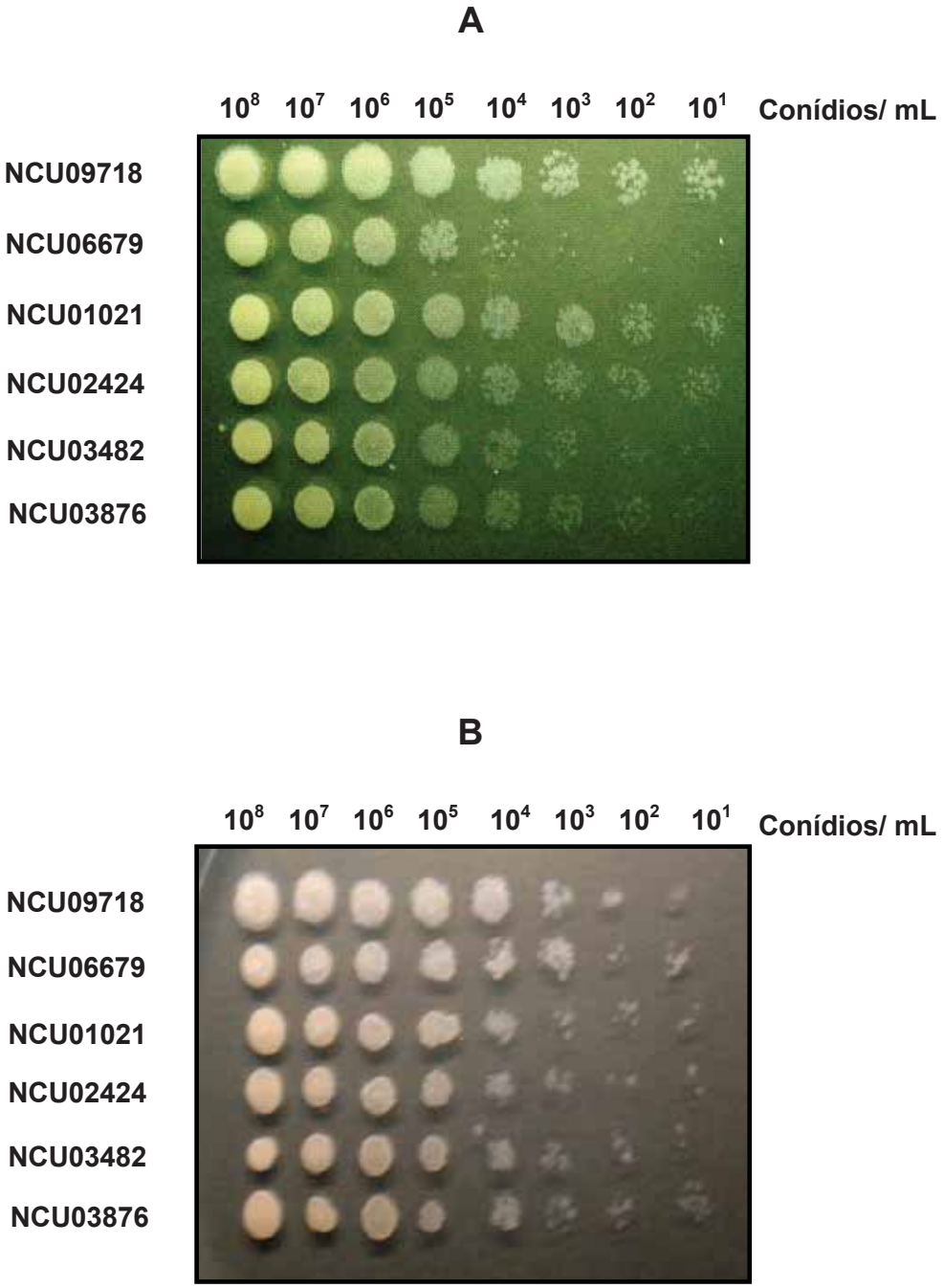


Figura 16: Análise de viabilidade celular nas linhagens mutantes de *N. crassa.* **A**, crescimento das colônias em meio VM. **B,** crescimento das colônias em meio VM + YE. Os meios foram acrescidos de sorbose para crescimento colonial.

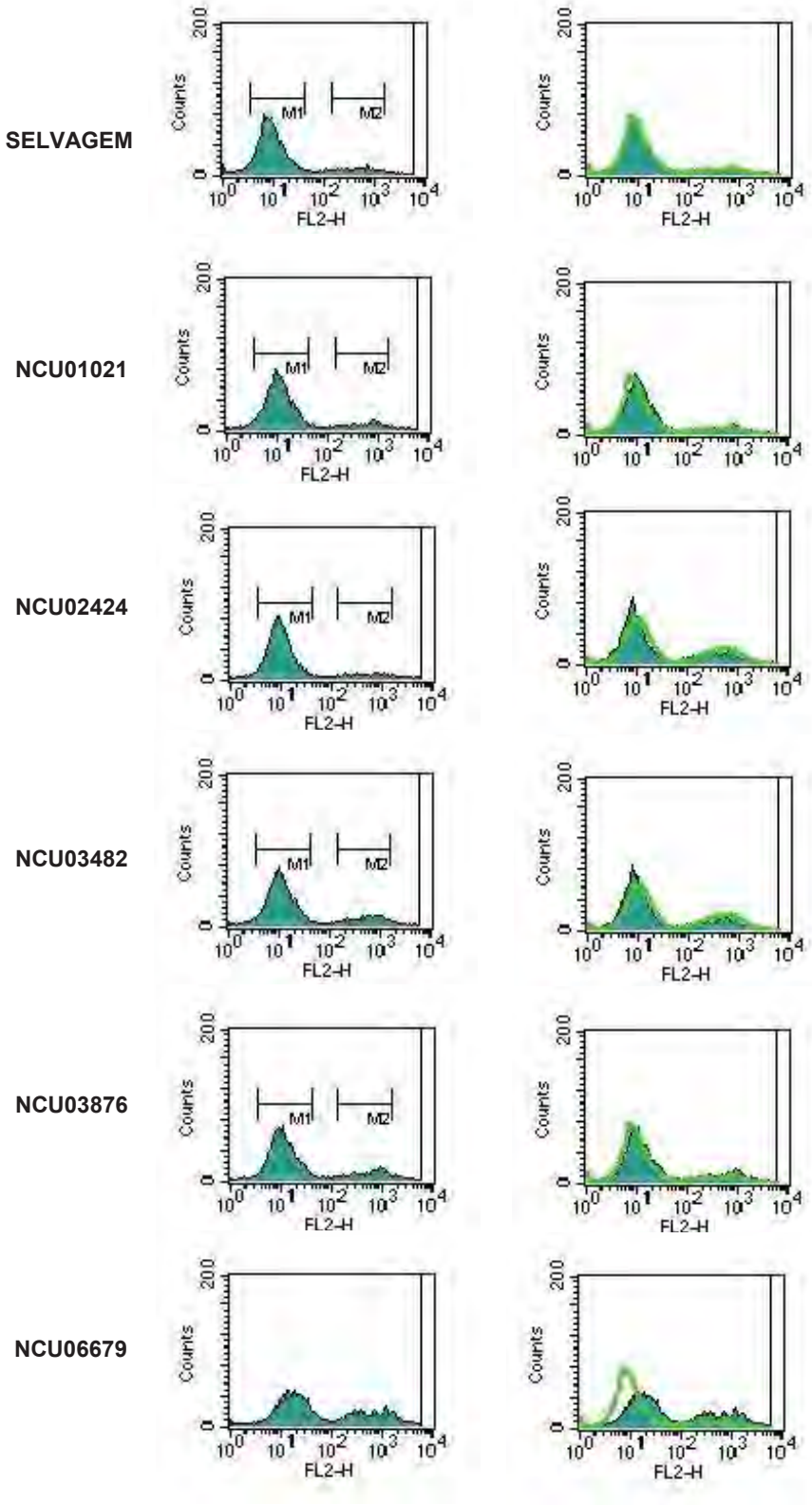


Figura 17- Análise de ciclo celular das linhagens mutantes. As áreas assinaladas como M1 e M2 revelam células nas transições G0/G1 e G2/M do ciclo celular, respectivamente. A área entre M1 e M2 corresponde à fase S do ciclo celular. A área Sub M1 é relacionada a células com baixa incorporação de PI. O resultado é típico de, no mínimo, três experimentos independentes. Na coluna à direita a curva da linhagem selvagem está salientada para mostrar as alterações existentes nas linhagens mutantes.

polimerase da *E. coli.* Assim, a transcrição do DNA clonado, necessária para a síntese da proteína, só ocorre após a expressão da T7 RNA polimerase na bactéria hospedeira. Além disso, velocidade de transcrição da T7 RNA polimerase é cinco vezes maior do que a da RNA polimerase de *E. coli*, conferindo ao sistema pET altos níveis de transcrição do DNA clonado.

Sendo assim, a digestão do vetor pET-28a com as enzimas *Nde*I e *EcoR*I resultou num vetor linearizado, o qual foi submetido à ligação com os fragmentos correspondentes às ORFs NCU02424 e NCU06679. Apenas os cDNAs correspondentes a estas ORFs foram subclonados no vetor pET-28a neste trabalho. Os produtos da reação de ligação foram usados para transformar células bacterianas da linhagem DH10B. As colônias isoladas foram usadas para a extração de DNA plasmidial e a análise dos plasmídeos recombinantes revelou que alguns clones obtidos poderiam ser positivos (Fig. 18), uma vez que a digestão com as enzimas *NdeI* e *EcoRI* liberou fragmentos com os tamanhos esperados para as respectivas ORFs. Uma análise de restrição foi realizada utilizando enzimas com sítios localizados ao longo das sequências nucleotídicas das ORFs e do vetor pET28a, as quais estão citadas na Tabela 6 e os resultados estão mostrados na Figura 18.

Como observado, os clones correspondentes aos plasmídeos pET-2424 (Figuras 18A e 18B), e pET-6679 (Figuras 18C e 18D) são positivos, uma vez que a digestão com as enzimas *EcoRI* e *NdeI*, as quais possuem sítios nas extremidades dos insertos, liberou fragmentos com tamanhos esperados para tais ORFs.

Para a construção pET-2424, a análise de restrição dos clones com as enzimas *Bam*HI e *Nde*I liberou fragmentos de 702 bp e 6,2 kb, o que era esperado pois a enzima *Bam*HI tem um sítio de restrição localizado na posição 702 ao longo da seqüência nucleotídica do inserto. Com as enzimas *Nhe*I e *Nde*I, os fragmentos liberados apresentaram os tamanhos de 1.005 pb e 5,9 kb, confirmando os resultados esperados para tal análise.

A análise de restrição dos clones da construção pET-6679 com a enzima *Bgl*II, a qual possui um sítio de clivagem ao longo da seqüência nucleotídica do vetor (posição 401) e do inserto (posição 1.244) liberou fragmentos de tamanhos 1.407 pb e 5,7 kb, também confirmando os resultados esperados para tal análise.

Após a análise de restrição, os clones positivos foram selecionados e enviados para análise de seqüenciamento. Em uma primeira análise foram utilizados oligonucleotídeos que hibridizam nas extremidades do vetor, portanto, apenas as junções dos fragmentos de DNA ao vetor foram confirmadas. Ambas construções plasmidiais foram confirmadas por sequenciamento de DNA.

Tabela 6: Enzimas utilizadas nas análises de restrição e tamanho dos fragmentos esperados

ORF	ENZIMA USADA	FRAGMENTOS ESPERADOS
NCU02424	*Bam*HI - *Nde*I	702 pb e 6,2 kb
	*Nhe*I-*Nde*I	1005 pb e 5,9 kb
	*EcoR*I- *Nde*I	1554pb e 5,4 kb
NCU06679	*Bgl*II	1407 pb e 5,7 kb
	*EcoR*I- *Nde*I	1695 pb e 5,4 kb

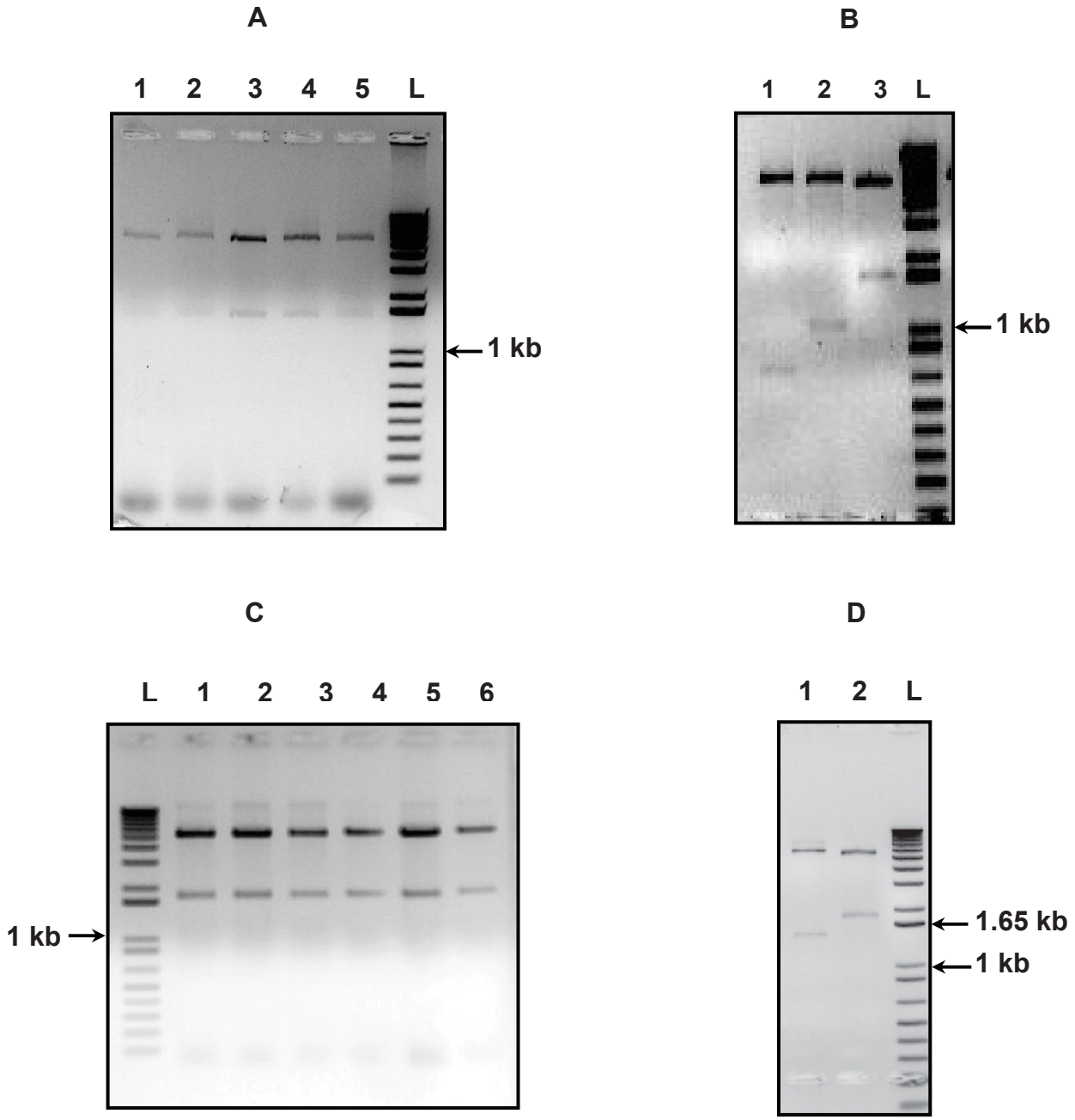


Figura 18- Análise de restrição dos DNAs plasmidiais contendo as ORFs NCU2424 (A) e (B) e NCU06679 (C) e (D) no vetor pET28a. **A**, digestão com *Eco*RI-*Nde*I; **B,** digestão com *Bam*HI-*Nde*I (linha 1), *Nhe*I-*Nde*I (linha 2) e *Eco*RI-*Nde*I (linha 3); **C,** digestão com *Sal*I; **D,** digestão com *Bgl*II (linha 1) e *Eco*RI-*Nde*I (linha 2). Eletroforese em gel agarose 1,0% dos produtos de digestão com as enzimas de restrição. **L** representa o *ladder* de DNA de 1 kb.

10- Análise da produção das proteínas recombinantes

Para a produção das proteínas recombinante, células da linhagem de *E. coli* BL21(DE3)pLysS competentes foram utilizadas para uma transformação com os plasmídeos pET-6679, pET-2424 e um plasmídeo controle pET-2369 expressando uma proteína de *X. citri* (controle positivo). As células transformadas foram crescidas e a síntese das proteínas recombinantes foi induzida com IPTG 0,4 ou 0,1 mM. A Figura 19 mostra a análise da expressão das proteínas recombinantes NCU02424 e NCU06679 em gel de poliacrilamida 12% (SDS- PAGE). Os experimentos de produção das proteínas recombinantes foram também analisados através do ensaio de *Western blot*, cujos resultados estão mostrados na Figura 20.

A Figura 19A mostra os resultados de indução, de uma das colônias analisadas, da proteína NCU02424 com um peso molecular esperado de aproximadamente 55 kD. O resultado obtido, na condição de indução acima citada (0,4 mM de IPTG) não mostrou a presença de nenhuma banda protéica correspondente ao peso molecular da proteína, mesmo no ensaio de *Western blot* (Fig. 20A). Os experimentos de indução desta proteína terão que ser posteriormente repetidos utilizando outras condições de indução e também diferentes construções plasmidiais.

A Figura 19B mostra os resultados obtidos de indução, de uma das colônias analisadas, da proteína NCU06679, a qual apresenta um peso molecular esperado de aproximadamente 64 kD. Os resultados revelaram a presença de uma banda forte na amostra do precipitado (P) e ausente na amostra correspondente ao controle negativo (pET vazio). O ensaio de *Western* blot confirmou a presença da proteína (Fig. 20B). Apenas uma banda de hibridização pode ser visualizada na figura, com o peso molecular esperado. Em ambas figuras, foi possível observar a banda da proteína XAC2369, com um peso molecular aproximado de 25 kD, o que mostra que as condições de indução empregadas estão corretas. Os resultados permitiram concluir que a proteína NCU06679 foi expressa, no entanto é uma proteína insolúvel, uma vez que sua obtenção ocorreu apenas na fração de precipitado. Para testar a solubilidade dessa proteína, novas condições de indução foram analisadas, tais como:

- 30ºC/0,4mM de IPTG/4h de indução
- 30ºC/0,1mM de IPTG/4h de indução
- 30ºC/0,1mM de IPTG/6h de indução

Os resultados obtidos nestas condições de indução estão mostrados na Figura 21. A figura mostra que a condição de 30ºC, 0,4 mM de IPTG e 4 h de indução foi a melhor condição para a produção desta proteína, uma vez que uma banda com intensidade razoável pode ser observada no sobrenadante. Os experimentos terão que ser posteriormente repetidos na melhor condição acima citada (30ºC, 0,4 mM de IPTG e 4 h de indução) para confirmar a presença ou não da produção da proteína na forma solúvel.

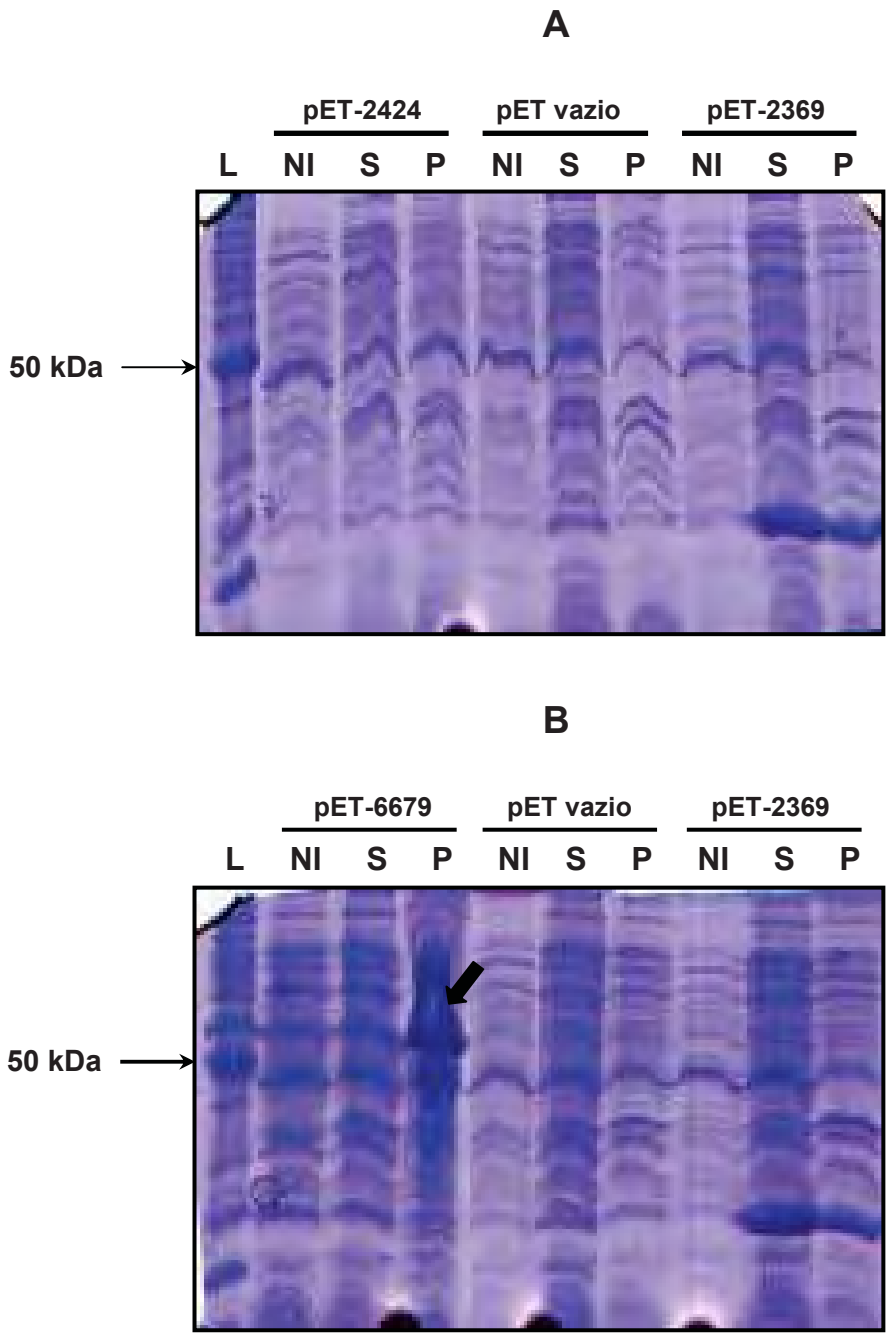


Figura 19- Análise da expressão das proteínas NCU02424 (A) e NCU06679 (B). Um volume de 16 µL de cada amostra foi utilizado. **NI** amostras não induzidas; **S**, amostras do sobrenadante e **P**, amostras do precipitado. Indução na presença de 0,4 mM de IPTG. Nas três primeiras canaletas de cada figura estão mostradas as amostras das proteínas NCU02424 (A) e NCU0 6679 (B), seguidas das amostras NI, S e P dos controles negativo (pET28 vazio) e positivo (pET-2369), respectivamente. O extrato protéico total foi fracionado em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, gel 12% corado com Coomassie Brilliant Blue.

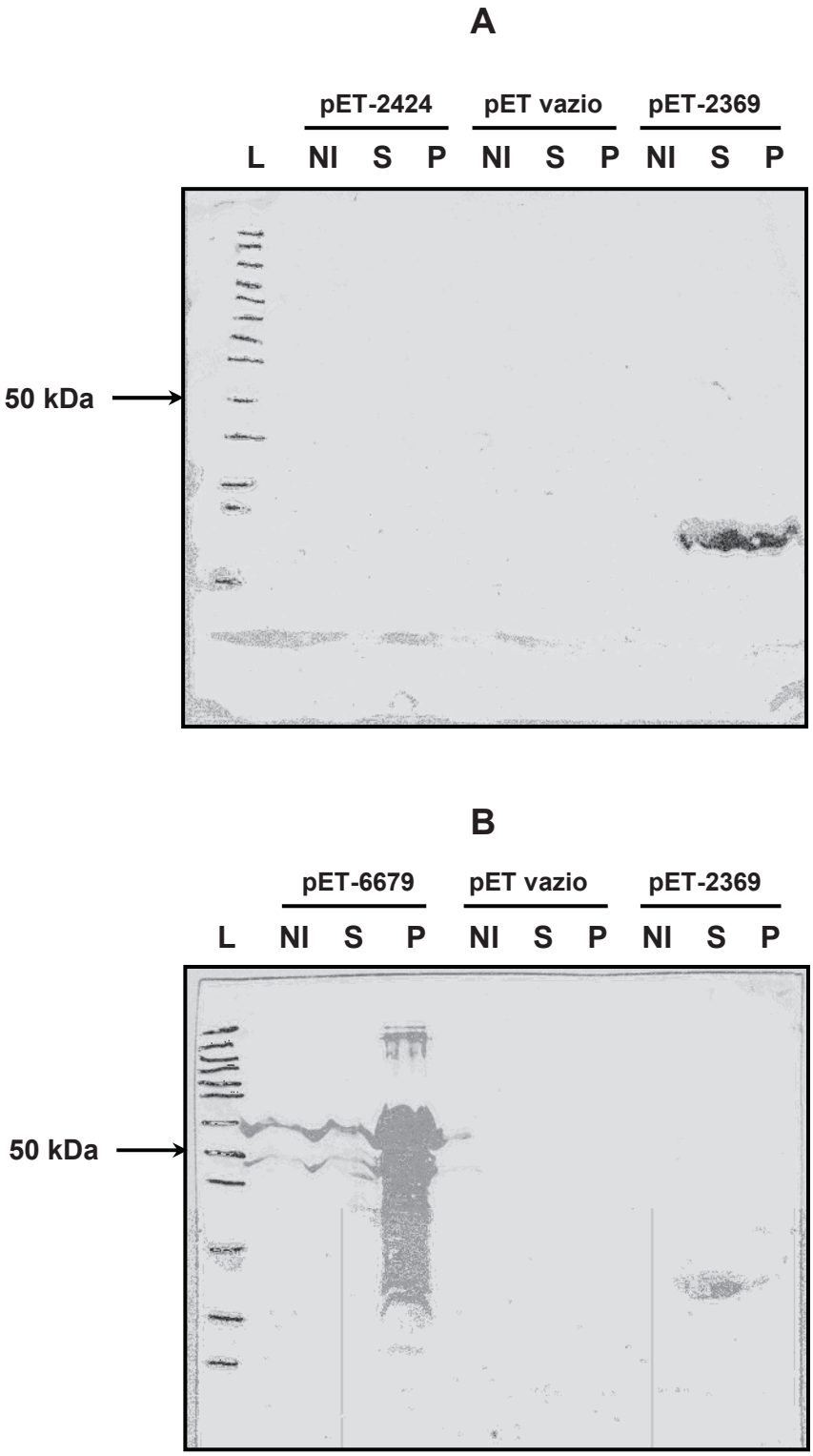


Figura 20- Análise da expressão das proteínas NCU02424 **(A)** e NCU06679 **(B)** por *Western Blot*. Um volume de 16 µL de amostra foi utilizado. As condições de indução foram de 37°C e 4 horas na presença de 0,4 mM de IPTG. As proteínas foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, gel 12% e transferidas para uma membrana de nitrocelulose. As condições utilizadas no ensaio de *Western blot* foram descritas em Materiais e Métodos.

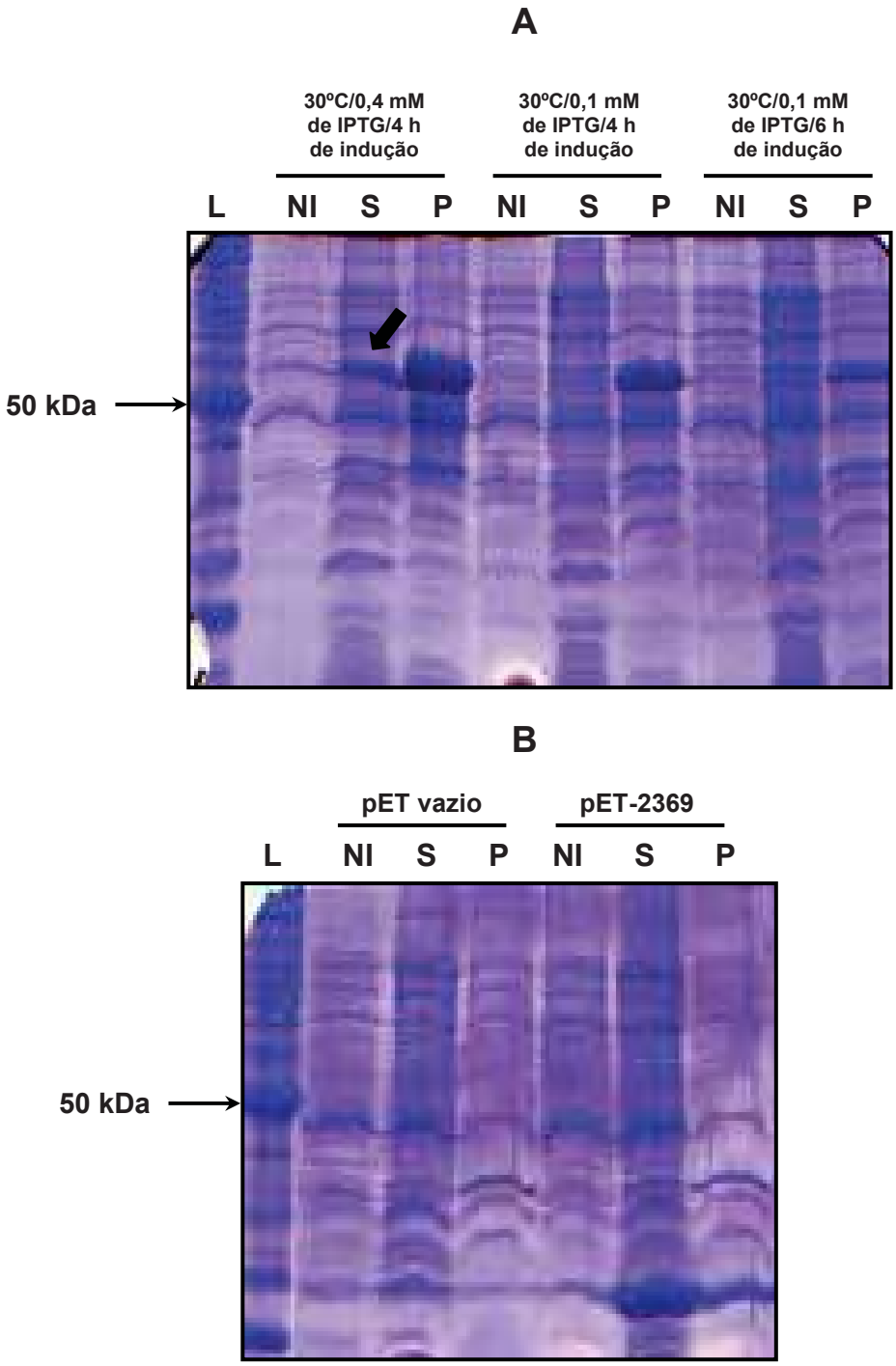


Figura 21- Análise da expressão da proteína recombinante NCU06679 em diferentes condições experimentais. Um volume de 16 µL de amostra foi usado. **NI** amostras não induzidas; **S**, amostras do sobrenadante e **P**, amostras do precipitado. A figura A apresenta as amostras NI, S e P do extrato protéico das células crescidas nas condições 30ºC/0,4 mM de IPTG/4 h de indução, 30ºC/0,1 mM de IPTG/4 h de indução e 30ºC/0,1 mM de IPTG/6 h de indução, respectivamente. A figura B apresenta as amostras NI, S e P dos controles negativo (pET vazio), seguidas do controle positivo (pET-2369). O extrato protéico total foi fracionado em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE, gel 12% corado com Coomassie Brilliant Blue.

DISCUSSÃO

A clonagem molecular do cDNA codificando para a enzima glicogênio sintase *(gsn)* no fungo *N. crassa*, realizada anteriormente em nosso laboratório (DE PAULA, 2002) permitiu que novos estudos enfocando aspectos moleculares e bioquímicos do metabolismo de glicogênio neste organismo modelo pudessem ser realizados. O uso do fungo *N. crassa* têm se mostrado bastante interessante uma vez que o genoma deste organismo modelo foi determinado (GALAGAN et al., 2003) e apontou para a presença de um grande número de genes, muitos deles faltando ortológos em outros organismos. O término do seqüenciamento do genoma do fungo *N. crassa*, juntamente com avanços na metodologia de inativação gênica, permitiram o início de estudos mais aprofundados da função e regulação de genes específicos, sob determinadas condições, iniciando análises da genômica funcional do fungo. O fato de que o genoma de *N. crassa* apresenta um grande número de genes sem ortológos em outros organismos parece indicar a existência de genes que apresentam novas funções ou novos genes desempenhando maneiras diferentes de realizar funções conhecidas (DUNLAP et al., 2007).

A regulação da transcrição é um dos principais pontos de controle da atividade gênica, a qual é responsável pelo controle dos processos biológicos nos organismos eucariotos. Embora a síntese protéica possa ser controlada na célula por meio de uma variedade de mecanismos, alteração do nível transcricional do gene é o processo celular mais direto e utilizado pela célula (WASSERMAN; FICKETT, 1998). Em eucariotos este processo é principalmente controlado por uma sofisticada interação de múltiplos fatores de transcrição, que se liga a elementos *cis* distribuídos ao longo de todo o genoma, fornecendo um aumento do controle específico dos genes. Os fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA em elementos *cis* regulatórios. Na era da genômica, a análise comparativa tem sido empregada para identificar os elementos *cis*, presentes entre duas ou mais seqüências de genes evolutivamente conservados entre espécies diferentes e a análise funcional tem permitido identificar genes que são co-expressos ou co-regulados. O conhecimento dos mecanismos regulatórios é essencial para uma compreensão profunda da maioria dos aspectos fundamentais da vida, ou seja, decifrar a linguagem dos elementos *cis* é descrever sua influência no fator de transcrição e no controle do gene alvo.

Nosso laboratório vem estudando alguns aspectos da regulação do metabolismo de glicogênio no fungo *N. crassa*, pois foi previamente demonstrado que o conteúdo de glicogênio é diminuído quando o fungo é submetido a uma situação de estresse térmico, fato contrário ao apresentado pela levedura *S. cerevisiae*, portanto, a regulação do metabolismo deste carboidrato difere da existente em eucariotos inferiores e parece se aproximar mais de células de mamíferos. O gene que codifica a proteína glicogênio sintase (*gsn*) foi clonado em nosso laboratório e a região 5´-flanqueadora do gene *gsn* foi determinada, revelando a existência de elementos *cis* regulatórios envolvidos no controle transcricional de genes cuja transcrição é modulada sob situação de estresse térmico, como por exemplo, vários *Heat Shock Elements* (*HSE*) e *Stress*

Responsive Elements (*STRE*) contidos nesta região (FREITAS; BERTOLINI, 2004). Tentando compreender o modo pelo qual o processo de regulação do gene *gsn* é desencadeado no fungo *N. crassa,* experimentos foram iniciados com o objetivo de identificar proteínas (fatores de transcrição) que se ligam à região promotora do gene *gsn* e regulam a expressão do gene. A combinação de técnicas bioquímicas com espectrometria de massas permitiu a identificação de proteínas capazes de reconhecer e se ligar ao elemento STRE da região promotora do gene *gsn,* em situações estresse térmico. A análise das seqüências polipeptídicas revelou a presença de domínios comuns em proteínas envolvidas na regulação da transcrição (FREITAS et al*.,* 2008).

O presente trabalho teve como objetivo principal iniciar estudos com algumas das proteínas identificadas no trabalho desenvolvido anteriormente em nosso laboratório as quais são consideradas alvos promissores de estudos para a elucidação de mecanismos de regulação da expressão do gene *gsn*, uma vez que a maioria destas proteínas encontra-se anotada como hipotética.

Neste trabalho, técnicas de informática contribuíram bastante. O uso da ferramenta PSORTII permitiu detectar os sinais de localização nuclear (NLS), tanto monopartidos quanto bipartidos, nas proteínas selecionadas. Os NLSs apesar de não possuírem uma estrutura secundária organizada necessitam de uma grande quantidade de resíduos básicos e devem estar localizados *upstream* de um domínio R/K/H-$X_{(2-5)}$-P-Y (X representa qualquer resíduo de aminoácido) localizado na região C-terminal. Até o momento não existe nenhuma ferramenta de bioinformática capaz de localizar os NLS não clássicos.

Nas proteínas alvo de estudos deste trabalho, codificadas pelas ORFs NCU01021, NCU02424, NCU03482, NCU03876 e NCU06679, a bioinformática permitiu ainda observar a presença de inúmeros domínios determinados em *mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa* e representados em verde na representação esquemática apresentada na Figura 7.

A ORF NCU02424 codifica para uma proteína com um domínio DnaJ localizado na extremidade C-terminal e três domínios TPR localizados na extremidade N-terminal. O domínio DnaJ é bem conhecido por regular a função chaperona das proteínas da família Hsp 70, mediando interações diretas entre diferentes proteínas chaperonas Hsp70 e proteínas do tipo DnaJ (CYR et al*.,*1994). Os domínios TPR (tetratricopeptídicos) são estruturas presentes em uma variedade de proteínas, responsáveis por estabelecer interações proteína-proteína e a formação de multi-complexos protéicos (DAS et al*.,* 1998).

A ORF NCU01021 codifica uma proteína que se tornou um alvo de estudo interessante por apresentar um domínio Mov3/MPN/PAD-1 localizado na extremidade N-terminal da proteína, os quais são encontrados em subunidades regulatórios do proteossomo 26S, subunidades eIF3 e reguladores de transcrição (SHIMANUKI et al*.,* 1995; CLARET et al*.,* 1996). A ORF NCU03876 apresentou domínios WD40 os quais são conhecidos por pertencer a uma grande família de proteínas de eucariotos, envolvidas numa variedade de funções como transdução do sinal e

controle transcricional, além de também coordenar a formação de multi-complexos protéicos. Já a ORF NCU03482 apresentou a presença do domínio ATPase AAA associado a atividades celulares diversas e um domínio Tip-49 na extremidade C-terminal conhecido por interagir com vários tipos de fatores nucleares (BELLOSTA et al*.,* 2005).

A proteína codificada pela ORF NCU06679 correspondente ao gene *cac-3 (chromatin assembly-3),* um ortólogo do gene CAC-3 de *S. cerevisiae* também mostrou ser um alvo interessante de estudos não apenas por apresentar domínios WD40, mas também por apresentar seqüências ricas de aminoácidos básicos (Lys e Arg) caracterizadas por funcionar como sinais de localização nuclear (NLS).

A presença de domínios importantes nas proteínas alvo deste estudo é uma característica interessante, uma vez que tais domínios são conhecidos em outras proteínas muito bem estudadas. Em função disso, a caracterização morfológica foi realizada a fim de verificar se a ausência de uma determinada proteína afetaria o fenótipo das linhagens mutantes, e a linhagem mutante que mostrou comportamento mais discrepante em relação ao crescimento da selvagem foi a linhagem nocauteada na ORF NCU06679, indicando que esta proteína possivelmente atua nos mecanismos de propagação das hifas.

Para uma análise simplesmente morfológica, a técnica de citometria de fluxo foi também utilizada, uma vez que tem a vantagem de analisar células individualmente e consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermediários que realmente existem numa determinada população, descobrindo assim uma heterogeneidade nunca antes revelada (NEBE-VON CARON et al., 1995, 2000), enquanto que dados obtidos pela microbiologia clássica são relativos à cultura como um todo, e numa população microbiana, as células não se encontram todas no mesmo estado metabólico e fisiológico.

A viabilidade das linhagens mutantes foi verificada em função da comparação do crescimento das linhagens mutantes em relação ao da linhagem selvagem em variadas diluições das suspensões conidiais. Os resultados mostraram que o crescimento das linhagens mutantes não diferenciou muito em relação ao da linhagem selvagem, exceto pela linhagem NCU06679 que assim como nos ensaios de análise de crescimento em *race tubes* mostrou-se também mais reduzido. Isso permitiu concluir que as linhagens mutantes são nocauteadas em proteínas que possivelmente não afetam na vida de crescimento da linhagem e, portanto as mesmas são viáveis. A análise de viabilidade deste trabalho foi muito interessante, no entanto diluições seriadas da amostra e posterior inoculação do microrganismo para obter colônias contáveis em placas de *Petri,* permite retirar uma informação limitada sobre os estados fisiológicos das células a dois níveis extremos de atividade metabólica: o saudável, presente em células viáveis com capacidade para se dividirem, e o correspondente à morte celular. Contudo, a sensibilidade dos microrganismos ao ambiente em que se desenvolvem põe em causa a informação obtida através dos ensaios de viabilidade, pois células que se encontrarem num estado fisiológico intermediário

entre o metabolicamente ativo e o de morte celular podem não ser contabilizadas. Assim, uma nova análise utilizando a técnica de citometria de fluxo para a verificação de ciclo celular foi realizada, pois a citometria de fluxo é uma tecnologia, baseada no emprego de radiação laser, fluxo hidrodinâmico, ótica, substâncias fluorescentes (fluorocromos) e recursos de informática, utilizada para determinar algumas características estruturais e funcionais de partículas biológicas. Nesta técnica as células foram previamente coradas com iodeto de propídeo (PI) e expostas a um laser de 488 nm. O fluorocromo oferece um método sensível para obter informação acerca da estrutura, função e viabilidade das células, pois, como o PI, que se liga ao DNA, intercalando-se inespecificamente entre as bases, é um composto fluorescente pouco lipossolúvel e que normalmente não atravessa a membrana celular, o dano celular pode ser medido por análise da fluorescência emitida. O fluorocromo, no entanto, é excluído de células sadias, sendo capaz apenas de penetrar em membranas não íntegras e ligar em ácidos nucléicos, tornando-se fluorescente e podendo ser observado (MACKLIS; MADISON, 1990).

Desta maneira, a citometria de fluxo foi uma técnica que permitiu, além de uma simples análise morfológica, também uma análise da viabilidade da célula a qual pode ser julgada por mudanças morfológicas ou por mudanças de permeabilidade de membrana e/ou estado fisiológico inferidos pela exclusão de certas substâncias fluorescentes. É uma técnica consistente e confiável na detecção das verdadeiras porcentagens de células viáveis e mortas numa determinada população de microrganismos e, por vezes, em situações em que a microbiologia clássica não consegue dar qualquer resposta.

Resumidamente, nessas análises as linhagens mutantes apresentaram um comportamento bastante semelhante ao apresentado pela linhagem selvagem, com relação à dispersão (SSC) e tamanho (FSC) das células, assim como para a incorporação de PI em que todas as linhagens mutantes apresentaram um padrão de incorporação semelhante ao observado para a linhagem selvagem, exceto para a linhagem mutante na ORF NCU06679. O resultado obtido nesta análise permite concluir que possivelmente a proteína codificada pela ORF NCU06679 atua também no mecanismo de regulação de ciclo celular, visto que os resultados apresentados para tal linhagem foram os mais discrepantes em relação à linhagem selvagem.

Esse trabalho, assim como os outros antes desenvolvidos em nosso laboratório, permite dizer que o banco de linhagens nocauteadas em genes específicos e tem sido um material de suma importância para estudos da genômica funcional do fungo filamentoso *N. crassa* contribuindo, portanto, para obtenção de informações cada vez mais confiáveis para a melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos envolvidos no controle de diversas vias metabólicas do mesmo.

Neste trabalho, todas as linhagens mutantes do fungo *N. crassa,* adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC) foram submetidas a uma situação de estresse térmico (45ºC) após crescimento em condições normais. A dosagem de glicogênio antes e depois do choque térmico

nestas linhagens revelou que o conteúdo de glicogênio diminuiu em todas as linhagens mutantes, semelhante ao observado para a linhagem selvagem, exceto na linhagem nocauteada na ORF NCU06679 onde a diminuição foi maior. Os resultados obtidos na quantificação de glicogênio foram reafirmados pelos resultados obtidos nas análises de expressão do gene *gsn* nas mesmas linhagens em relação à redução após choque térmico e demonstraram que mudanças na síntese do carboidrato podem acontecer por alterações na expressão gênica.

Os experimentos de *Northern blot* realizados no presente trabalho permitiram observar que as proteínas em estudo podem atuar na regulação do metabolismo do carboidrato, uma vez que os conteúdos de glicogênio, assim como os níveis de expressão do gene *gsn* estão levemente alterados quando comparados aos obtidos para a linhagem selvagem nas duas situações estudadas e os resultados obtidos foram mais acentuados na linhagem mutante na proteína codificada pela ORF NCU06679. Estes resultados, juntamente com os obtidos pela análise de citometria de fluxo, permitem concluir a importância da proteína NCU06679 e uma investigação mais detalhada deverá ser conduzida para elucidar a sua participação nos mecanismos de regulação do metabolismo de glicogênio.

Em vista de todas estas proteínas constituírem alvos promissores para estudos, o presente trabalho realizou a clonagem dos cDNAs codificadores destas proteínas e produziu a proteína NCU06679 recombinante em *E. coli.* Esta proteína será utilizada na obtenção de anticorpos com o objetivo de realizar experimentos visando a localização celular desta proteína, uma vez que apresenta um sinal de localização nuclear e com o objetivo de determinar potenciais sítios de localização da proteína ao DNA genômico.

A proteína codificada pela ORF NCU06679, embora anotada como hipotética, é relacionada como ortóloga da proteína Cac3p de *S. cerevisiae.* Em *S. cerevisiae* os genes *CAC1*, *CAC2 e CAC3* codificam para três subunidades do complexo CAF-I (Chromatin assembly factor CAF-1). CAF-1 é um complexo protéico especializado em processos de organização da cromatina durante a etapa de replicação, por meio de sua atividade de remodelagem de cromatina dependente de ATP em que os nucleossomos são organizados ao longo do DNA no núcleo, mas também está envolvido na regulação de processos essenciais de DNA, como a expressão gênica, replicação, recombinação e reparo. Tendo em vista que a proteína NCU06679 apresenta sinal de localização nuclear, podendo migrar para o núcleo, um estudo mais detalhado torna-se necessário.

Os resultados obtidos nesse trabalho, embora preliminares, permitiram identificar quais das proteínas estudadas merecem uma investigação mais profunda e experimentos complementares serão propostos para uma investigação mais detalhada. Os resultados obtidos, juntamente com outros relacionados a fatores de transcrição que estão sendo estudados no laboratório, permitirão resultar no conhecimento de vias regulatórias existentes na regulação do metabolismo de celular em células eucarióticas utilizando o fungo como organismo modelo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ANDREW, J. R.; RUSSEL, L. C.; CHINKERS, M. C-terminal sequences of hsp70 and hsp90 as non-specific anchors for tetratricopeptide repeat (TPR) proteins. **Biochem. J.**, v. 423, p. 411-419, 2009.

BELLOSTA, P.; HULF, T.; BALLA-DIOP, S.; USSEGLIO, F.; PRADEL, J.; ARAGNOL, P.; GALLANT, P. Myc interacts genetically with Tip-48/Reptin and Tip-49/Pontin to control growth and proliferation during *Drosophila* development. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 33, p. 11799-11804, 2005.

BORKOVICH, K. A.; ALEX, L. A.; YARDEN, O.; FREITAG, M.; TURNER, G. E.; READ, N. D.; SEILER, S.; PEDERSEN, D. B.; PAIETTA, J.; PLESOFSKY, N.; PLAMANN, M.; TANRIKULU, M. G.; SCHULTE, U.; MANNHAUPT, G.; NARGANG, F. E.; RADFORD, A.; SELITRENNIKOFF, C.; GALAGAN, J. E.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; CATCHESIDE, D.; INOUE, H.; ARAMAYO, R.; POLYMENIS, M.; SELKER, E. U.; SACHS, M. S.; MARZLUF, G. A.; PAULSEN, I.; DAVIS, R.; EBBOLE, D. J.; ZELTER, A.; KALKMAN, E. R.; O'ROURKE, R.; BOWRING, F.; YEADON, J.; ISHII, C.; SUZUKI, K.; SAKAI, W.; PRATT, R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, p.1-108, 2004.

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

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

CODER, D. M. Assessment of cell viability In: ROBINSON, J. P. **Current protocols in cytometry**. New York: John Wiley and Sons, 1997. p. 9.2.1-9.2.14.

COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEISS, R.; BORKOVICH, K. A.; DUNLAP, J. C. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, p. 10352-10357, 2006.

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

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

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

DUNLAP, J. C.; BORKOVICH, K. A.; MATTHEW, R.; HENN, M. R.; TURNER, G. E.; SACHS, M. S.; GLASS, N. L.; McCLUSKEY, K.; PLAMANN, M.; GALAGAN, J. E.; BIRREN, B. W.; WEISS, R. L.; TOWNSEND, J. P.; LOROS, J. J.; NELSON, M. A.; 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.; BASTÜRKMEN, M.; ALTAMIRANO, L.; XU, J. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Adv. Gen.**, v. 57, p. 49-96, 2007.

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

FARKAS, I.; HARDY, T. A.; DE PAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Isolation of the GSY1 gene encoding glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 20879-20886, 1990.

FARKAS, I.; HARDY, T. A.; GOEBL, M. G.; ROACH, P. J. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 15602-15607, 1991.

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

FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces crevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 25, n. 1, p. 125-145, 2001.

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

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

FREITAS, F. Z. **Caracterização funcional dos elementos de transcrição do gene da glicogênio sintase (*gsn*) de *Neurospora crassa.*** 2007. 176 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Genomic organization of the *Neurospora crassa gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. **Mol. Gen. Genomics**, v. 272, p. 550-561, 2004.

FREITAS, F. Z.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; BERTOLINI, M. C. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa.* **Proteomics**, v. 8, p. 2052-2061, 2008.

GAILLARD, P. H.; MARTINI, E. M.; KAUFMAN, P. D.; STILLMAN, B.; MOUSTACCHI, E.; ALMOUZNI, G. Chromatin assembly coupled to DNA repair: a new role for chromatin assembly factor I. **Cell**, v. 86, p. 887-896, 1996.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L. J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNERWASHBURNE, 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.; STANGETHOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D. D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DESOUZA, C. P.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M. S.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa.* **Nature**, v. 422, p. 859-868, 2003.

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

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry mehod that givers a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, p. 422-427, 1972.

HOLMES, D. S.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal. Biochem.**, v. 114, n. 1, p. 193-197, 1981.

HUANG, J.; WANG, M. M.; BAO, Y. M.; SUN, S. J.; PAN, L. J.; ZHAN, H. S. SRWD: a novel WD40 protein subfamily regulated by salt stress in rice (*Oryza sativa L.*). **Gene**, v. 424, p. 71-79, 2008.

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

LAEMMLI, U. K.; MOLBERT, E.; SHOWE, M.; KELLENBERGER, E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. **J. Mol. Biol.**, v. 49, n. 1, p. 99-113, 1970.

LU, Z.; CYR, D. M. Protein folding activity of Hsp70 is modified differentially by the Hsp40 Co-chaperones Sis1 and Ydj1. **J. Biol.Chem.**, v. 273, n. 43, p. 27824–27830, 1998.

MacKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MARTINEZ-PASTOR, M.; MARCHLER, G.; SCHULLER, C.; MARCHLER, B. A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO J.**, v. 15, p. 2227-2235, 1996.

MAKINO, Y.; MIMORI, T.; KOIKE, C.; KANEMAKI, M.; KUROKAWA, Y.; INOUE, S.; KISHIMOTO, T.; TAMURA, T. TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.245, n. 3, p. 819-823, 1998.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P. J.; HEWITT, C. J.; POWELL, J. R.; BADLEY, R. A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **J. Microbiol. Methods**, v. 42, p. 97-114, 2000.

NELSON, D.; COX, M. M. Regulation of gene expression. In:_____. **Lehninger**: principles of biochemistry. 3rd ed. New York: Worth Publishers, 2000. p. 1072-1118.

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

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

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

PARROU, J. L.; TESTE, M. A.; FRANÇOIS, J. Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. **Microbiology**, v. 143, p. 1891-1900, 1997.

PAULA, R. de; PINHO, C. A. de; TERENZI, H. F.; BERTOLINI, M. C. Cloning and molecular characterization of the *gsn* cDNA encoding glycogen synthase in *Neurospora crassa.* **Mol. Genet. Genomics**, v. 267, p. 241-253, 2002.

PAULA, R. M. de. **Metabolismo do glicogênio em *Neurospora crassa***: um estudo molecular e bioquímico e análise de interação proteína-proteína. 2004. 166 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2004.

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

SHIMANUKI, M.; SAKA, Y.; YANAGIDA, M.; TODA, T. A novel essential fission yeast gene pad 1^+ positively regulates pap1^+ - dependent transcription and is implicated in the maintenance of chromosome structure. **J. Cell. Sci.**, v. 108, n. 2, p. 569-579, 1995.

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

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

SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Gen. Newsl.**, v. 67, p. 41-43, 1995.

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

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

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

WASSERMEN, W.; FICKETT, J. Identification of regulatory regions with confer muscle specific gene expression. **J. Mol. Biol.**, v. 278, p. 167-181, 1998.

WEILAND, J. J. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. **Fungal Gen. Newsl.**, v. 44, p. 60-63, 1997.