

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Stela Virgilio

**Metabolismo de glicogênio e relógio biológico em
Neurospora crassa. Fatores e cofatores de transcrição
envolvidos nos processos**

ARARAQUARA

2012

STELA VIRGILIO

Metabolismo de glicogênio e relógio biológico em
Neurospora crassa. Fatores e cofatores de transcrição
envolvidos nos processos

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 Dr. Maria Célia Bertolini

ARARAQUARA

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

V816m Virgilio, Stela
Metabolismo de glicogênio e relógio biológico em
Neurospora crassa. Fatores e cofatores de transcrição
envolvidos nos processos / Stela Virgilio. –
Araraquara : [s.n], 2012
138 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Maria Célia Bertolini

1. Bioquímica. 2. Glicogênio. 3. Relógio biológico.
4. Expressão gênica. 5. Proteínas. I. Título.

DADOS CURRICULARES

Stela Virgilio

1. Dados pessoais

Filiação: Celso José Virgilio e Rita de Cássia Rampani Virgilio

Nascimento: 05 de janeiro de 1988 - Araraquara-SP, Brasil

Endereço Pessoal: Avenida Marzio Munhoz Garcia Perez, 53 - Vila Xavier
CEP: 14810-152 - Araraquara - SP

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Rua Prof. Francisco Degni, 55 - Quitandinha
CEP: 14800-900 - Araraquara - SP

Profissão: Bacharel em Biotecnologia

2. Formação acadêmica

2010-2012: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Título: Metabolismo de glicogênio e relógio biológico em *Neurospora crassa*. Fatores e cofatores de transcrição envolvidos nos processos. Orientadora: Dr. Maria Célia Bertolini, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil

2006-2010: Graduação Bacharelado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, Araras, São Paulo, Brasil

3. Atividades de pesquisa

3.1 Resumos apresentados em congressos

VIRGILIO, S.; CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. The *Neurospora crassa* RCO-1/RCM-1 Corepressor Complex, the *Saccharomyces cerevisiae* Tup1-Ssn6 Ortholog, Regulates Glycogen Metabolism. In: XLI Annual Meeting of The Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (Sbbq), 2012, Foz do Iguaçu. XLI Annual Meeting of Sbbq, 2012.

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

CUPERTINO, F. B.; VIRGILIO, S.; FREITAS, F. Z.; PAULA, R. M. de; BERTOLINI, M. C. In *Neurospora crassa* the PACC pH regulator transcription factor has a role in growth, development and glycogen metabolism regulation. In: 26º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2011, Foz do Iguaçu, PR. Microbiologia in foco. São Paulo: SBM, 2011. v. 16, p. 175.

VIRGILIO, S.; TAKITA, M. A. Clonagem e expressão de uma enzima de restrição tipo II de *Xylella fastidiosa*. In: 56º Congresso Brasileiro de Genética, 2010, Guarujá, SP. Anais do 56º Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2010. p. 55.

VIRGILIO, S.; TAKITA, M. A. Expression of a type II restriction enzyme of *Xylella fastidiosa* in *Escherichia coli*. In: XVIII Conference of the International Organization of Citrus Virologists (IOCV), 2010, Campinas, SP. Citrus Research & Technology - Suplemento. Cordeirópolis: Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio de Citros Sylvio Moreira, 2010. v. 31, p. 118.

TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; MACHADO, M. A.; VIRGILIO, S. Expression Pattern Of Some Terpene Synthase Encoding Genes In Sweet Orange Fruit Development.

In: International Plant & Animal Genomes XVIII Conference, 2010, San Diego. PAG-XVIII Resumes, 2010. p. 769.

VIRGILIO, S.; TAKITA, M. A. Análise *in silico* do sistema de restrição-modificação do Tipo II da bactéria *Xylella fastidiosa*. In: 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009, Águas de Lindóia, SP. Anais do 55º Congresso Brasileiro de Genética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2009. p. 54.

VIRGILIO, S.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; RADAIC, A.; SERRACCHIANI, M. M. Influência dos atributos sensoriais na preferência de seis marcas de leite fermentado. In: XVII Congresso de Iniciação Científica - 8ª Jornada Científica e Tecnológica da UFSCar, 2009, São Carlos, SP. Anais de Eventos da UFSCar, 2009. v. 5, p. 86.

VIRGILIO, S.; VERRUMA-BERNARDI, M. R.; RADAIC, A.; SERRACCHIANI, M. M. Aceitabilidade de leites fermentados: com e sem presença da embalagem. In: XVII Congresso de Iniciação Científica - 8ª Jornada Científica e Tecnológica da UFSCar, 2009, São Carlos, SP. Anais de Eventos da UFSCar, 2009. v. 5, p. 87.

VIRGILIO, S.; TAKITA, M. A. Análisis del Sistema de Restricción Modificación y Metilación de la Bacteria *Xylella fastidiosa*. In: IX Jornadas Científicas y Encuentro de Jovenes Investigadores Augusto Palavecino, 2008, San Miguel de Tucumán, Argentina. Libro de Resúmenes - IX Jornadas Científicas y Encuentro de Jovenes Investigadores "Augusto Palavecino", 2008. p. 12.

3.2 Apresentação de trabalho

VIRGILIO, S. Correlação entre metabolismo de glicogênio e relógio biológico em *Neurospora crassa*. In: Sex, Light, and Carotenes: The Development of Fungi, 2012, São José dos Campos, SP.

3.3 Cursos frequentados durante o Mestrado

2012 - Citometria de Fluxo

BD - Biosciences, Brasil

2012 - Sex, Light and Carotenes: The Development of Fungi (Carga horária: 20 h)

Universidade do Vale do Paraíba, Brasil

2012 - Proteínas de Fusão

GE Healthcare Life Sciences, Brasil

2011 - Aplicações e Fundamentos da PCR Quantitativa em Tempo Real (Carga horária: 32 h)

Applied Biosystems do Brasil, part of Life Technologies

Dedico este trabalho
primeiramente a Deus,
aos meus pais Celso e Rita,
a minha irmã Leticia e
ao meu namorado Alisson,
pessoas que amo muito.

AGRADECIMENTOS

Neste espaço gostaria de agradecer a todas as pessoas que me auxiliaram e que tornaram possível mais esta conquista. Primeiramente agradeço à minha orientadora profa. Maria Célia Bertolini pela oportunidade concedida, pelos ensinamentos e por toda dedicação.

Aos colegas de laboratório: Fernandas, Flávia, Eliane, Ana Paula, Susi, Carol, Heloisy, Thiago, Rodrigo, Erick e Messias, pelo companheirismo, amizade e por poder passar os dias com vocês dando muita risada. Aos meus amigos de departamento que também me apoiaram: Maira, Mariana, Marina, Natália e Mauro.

Em especial gostaria de agradecer à Fernanda Cupertino e Fernanda Zanolli, que sempre me ensinaram e me ajudaram na teoria e na prática.

Ao técnico Tarcísio, por me ajudar todos os dias no laboratório e fazer aquele churrasco maravilhoso.

Aos meus pais Celso e Rita, à minha irmã Letícia, ao meu namorado Alisson e à todos os familiares: Marli, Sérgio, Alex e André; Raquel, Laerte e Lara; Renata, Rogério, Michele, Duda e Arthur. Aos meus amigos Giovana, Lívia, Heitor, Sarah, Maria, Maurício, Bete e Paulo, e a todos que prestigiaram a apresentação do trabalho de Mestrado, sempre incentivando meus estudos, e por todo amor recebido.

Aos funcionários da Biblioteca e professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Ao Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Instituto de Química da UNESP Araraquara pela oportunidade em realizar o Mestrado.

Ao prof. Dr. Flávio Henrique da Silva e ao Dr. Marco Aurélio Takita por participarem no Exame Geral de Qualificação e pelas sugestões.

Aos professores Dr. Iran Malavazi e Dr. Sérgio Akira Uyemura pelos conselhos dados durante a Dissertação.

E finalmente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro concedido.

“O mais importante de tudo é nunca deixar de questionar.
A curiosidade tem sua própria razão de existir.” (EINSTEIN)

“As grandes idéias surgem da observação dos pequenos detalhes.”
(CURY, 2005, p. 12)

RESUMO

O fungo filamentosso *Neurospora crassa* é um organismo modelo utilizado na compreensão de diversos aspectos da biologia dos eucariotos, e tem sido usado, em nosso laboratório, para estudos celulares básicos, como os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio. Uma análise sistemática realizada com uma coleção de linhagens mutantes em genes codificadores de fatores de transcrição permitiu identificar várias proteínas potencialmente envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio neste organismo. Algumas linhagens mutantes apresentaram alterações no perfil de acúmulo de glicogênio e na expressão dos genes que codificam as enzimas glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*) quando comparadas à linhagem selvagem. Dentre estas, duas linhagens mutantes em genes que codificam para a proteína RCO-1 (*regulator of conidiation-1*) e para uma proteína hipotética foram selecionadas para o presente estudo, levando em consideração que ambas linhagens também apresentaram variações na progressão do ciclo celular quando analisadas por citometria de fluxo. Como a proteína RCO-1 é uma provável parceira da proteína RCM-1 (*regulator of conidiation and morphology-1*), então a linhagem mutante no gene codificador de RCM-1 foi incluída neste trabalho. Portanto, foi feita a caracterização de um fator de transcrição anotado como proteína hipotética e de dois cofatores transcricionais RCO-1 e RCM-1, ortólogos ao complexo corepressor Tup1-Ssn6 de *Saccharomyces cerevisiae*. As proteínas RCO-1, RCM-1 e a codificada pela ORF NCU09739 estão envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio, atuando na regulação da expressão dos genes *gsn* e/ou *gpn*. Estas mesmas proteínas também são necessárias para o crescimento e desenvolvimento normal do fungo, uma vez que as linhagens mutantes apresentaram alterações na extensão das hifas, pigmentação e conidiação. Análise da expressão gênica mostrou que o gene NCU09739 foi altamente expresso no início da germinação dos conídios, mostrando a importância da proteína para o crescimento vegetativo do fungo. Esta proteína hipotética foi produzida na forma recombinante para futuros ensaios. Experimentos com diferentes fontes de carbono revelaram que o fator de transcrição CRE-1 atua como um repressor do acúmulo de glicogênio, entretanto as proteínas RCO-1 e RCM-1 parecem não fazer parte do complexo repressor no metabolismo deste carboidrato. Além disto, as proteínas recombinantes RCO-1 e RCM-1, juntamente com a proteína CRE-1, foram utilizadas em ensaios de ligação DNA-proteína, porém não foram observados complexos DNA-proteína utilizando um fragmento do promotor *gsn* contendo *motifs* de CreA/Mig1. Um fato interessante é que alguns fatores e cofatores de transcrição identificados como envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio também respondem à luz e/ou relógio biológico, então iniciamos uma investigação a fim de verificar se o acúmulo de glicogênio segue o ritmo circadiano em *N. crassa*. O relógio biológico afetou o crescimento linear das linhagens *rco-1^{KO}* e *rcm-1^{RIP}* e o acúmulo de glicogênio e a expressão dos genes *gsn* e *gpn* parecem seguir o ritmo circadiano. Em ensaios de indução por luz, o acúmulo de glicogênio não se alterou durante os diferentes tempos de exposição à luz, mas a expressão dos genes *gsn* e *gpn* mostrou ser induzida tardiamente por luz.

Palavras-chave: *Neurospora crassa*, glicogênio, expressão gênica, proteínas RCO-1 e RCM-1, relógio biológico

ABSTRACT

The filamentous fungus *Neurospora crassa* is a model organism used to understand various aspects of eukaryotic biology. It has been used, in our laboratory, in basic cellular studies, such as the biochemical and molecular mechanisms involved in the regulation of glycogen metabolism. A systematic analysis performed with a collection of mutant strains in genes encoding transcription factors led to the identification of proteins likely involved in the regulation of glycogen metabolism in this organism. Some mutant strains showed changes in the glycogen accumulation profile and in the expression of the genes encoding the enzymes glycogen synthase (*gsn*) and glycogen phosphorylase (*gpn*) when compared to the wild-type strain. Among these, two mutant strains in the genes encoding RCO-1 (*regulator of conidiation-1*) and a hypothetical proteins were selected for the present study. Both strains presented variations in cell cycle progression when analyzed by flow cytometry. RCO-1 protein is likely a partner of RCM-1 (*regulator of conidiation and morphology-1*) protein, thus the mutant strain in the gene encoding RCM-1 was included in this work. Therefore, we performed the characterization of a transcription factor annotated as a hypothetical protein and the two transcriptional cofactors RCO-1 and RCM-1, orthologs of the *Saccharomyces cerevisiae* corepressor complex Tup1-Ssn6. RCO-1, RCM-1 and the product of the ORF NCU09739 are involved in the regulation of glycogen metabolism, acting in the regulation of *gsn* and/or *gpn* gene expression. The same proteins are necessary for growth and normal development of the fungus, since the mutant strains showed changes in hyphae length, pigmentation and conidiation. Gene expression analysis showed that the NCU09739 gene was highly expressed at the beginning of the conidia germination, showing the importance of the protein for the vegetative growth of the fungus. This hypothetical protein was produced as a recombinant protein for further assays. Experiments with different carbon sources revealed that the transcription factor CRE-1 acts as a repressor of glycogen accumulation, however RCO-1 and RCM-1 proteins does not seem to be part of the repressor complex in the metabolism of carbohydrate in *N. crassa*. Moreover, recombinant RCO-1 and RCM-1 proteins, together with CRE-1 protein, were used in DNA-binding assays, however DNA-protein complexes were not observed using a *gsn* promoter fragment containing CreA/Mig1 motifs. An interesting result is that some transcription factors identified as involved in the regulation of glycogen metabolism respond to light and/or circadian clock. We started an investigation to determine whether the glycogen accumulation follows the circadian rhythm in *N. crassa*. The biological clock affected the linear growth of the *rco-1*^{KO} and *rcm-1*^{RIP} strains and the glycogen accumulation and the *gsn* and *gpn* gene expression may follow the circadian rhythm. In light-induced experiments, the accumulation of glycogen did not change during different times of exposure to light, however the expression of genes *gsn* and *gpn* showed to be delayed light-induced.

Keywords: *Neurospora crassa*, glycogen, gene expression, RCO-1 and RCM-1 proteins, circadian clock

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	24
Figura 02 - Representação esquemática da síntese e degradação do glicogênio em <i>N. crassa</i>	30
Figura 03 - Interação entre as proteínas Tup1-Ssn6 de <i>S. cerevisiae</i> e seus mecanismos de repressão	39
Figura 04 - Respostas à luz em <i>N. crassa</i>	43
Figura 05 - Amplificação de fragmentos correspondentes às ORFs a partir do DNA genômico das linhagens mutantes e selvagem	74
Figura 06 - Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutantes em meio sólido	76
Figura 07 - Análise da morfologia da colônia e crescimento radial e da extremidade das hifas nas linhagens selvagem e mutantes	78
Figura 08 - Acúmulo de glicogênio e expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> antes e depois do choque térmico	81
Figura 09 - Representação esquemática do fator de transcrição hipotético	83
Figura 10 - Expressão do gene correspondente à ORF NCU09739 durante o crescimento vegetativo na linhagem selvagem	85
Figura 11 - Representação esquemática das ORFs NCU09740, NCU09739 e NCU09738 e das regiões intergênicas	85
Figura 12 - Amplificação da ORF NCU09739	86
Figura 13 - Análise da expressão em <i>E. coli</i> da proteína His::9739	88
Figura 14 - Purificação da proteína His::9739 produzida em <i>E. coli</i> ArcticExpress(DE3)	89
Figura 15 - Representação esquemática dos cofatores de transcrição	91
Figura 16 - Alinhamento múltiplo da sequência polipeptídica da proteína RCO-1 de <i>N. crassa</i> com proteínas ortólogas de outros fungos	94
Figura 17 - Alinhamento múltiplo da sequência polipeptídica da proteína RCM-1 de <i>N. crassa</i> com proteínas ortólogas funcionais	96
Figura 18 - Amplificação dos genes <i>rco-1</i> e <i>rcm-1</i>	98
Figura 19 - Análise da expressão em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLys-S das proteínas His::RCO1 e His::RCM1	100

Figura 20 - Purificação em pequena escala da proteína His::RCO1	102
Figura 21 - Purificação da proteína His::RCO1 produzida em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLys-S em maior escala	103
Figura 22 - Purificação da proteína His::RCM1 produzida em <i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLys-S em maior escala	105
Figura 23 - Acúmulo de glicogênio e expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> em ensaio com diferentes fontes de carbono utilizando as linhagens selvagem, <i>cre-1^{KO}</i> , <i>rco-1^{KO}</i> e <i>rcm-1^{RIP}</i>	107
Figura 24 - Análise do crescimento linear das linhagens selvagem (FGSC#9718) e mutantes (<i>9739^{KO}</i> , <i>rco-1^{KO}</i> e <i>rcm-1^{RIP}</i>) em <i>race tubes</i>	112
Figura 25 - Acúmulo de glicogênio em resposta ao relógio biológico	117
Figura 26 - Análise da expressão dos genes <i>gsn</i> , <i>gpn</i> e <i>ccg-1</i> na linhagem selvagem FGSC#2489 em resposta ao relógio biológico	118
Figura 27 - Determinação do acúmulo de glicogênio e da expressão dos genes <i>gsn</i> , <i>gpn</i> e <i>ccg-1</i> na linhagem selvagem FGSC#2489 em resposta à indução por luz	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Oligonucleotídeos usados para a confirmação dos nocautes gênicos e para a clonagem molecular	57
Quadro 2 - Taxa de crescimento radial da linhagem selvagem e dos mutantes	77
Quadro 3 - Dados bioquímicos do fator de transcrição codificado pela ORF NCU09739	83
Quadro 4 - Dados bioquímicos dos cofatores transcricionais estudados	91
Quadro 5 - Esquema da transferência do claro para o escuro no ensaio de relógio biológico	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2YT	meio de cultura com extrato de levedo e triptona
AA	aminoácidos
AMP	adenosina monofosfato
ATP	adenosina trifosfato
<i>bar</i> ^r	resistência à fosfotricina/basta
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina
BSA	soroalbumina bovina
C-terminal	região carboxi-terminal
<i>ccg-1</i>	gene <i>clock controlled gene-1</i>
cDNA	DNA complementar
cm	centímetro
cpm	cintilações por minuto
DEPC	dietil pirocarbonato
DMF	dimetilformamida
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
D.O.	densidade óptica
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
FAD	flavina-adenina dinucleótido
FGSC	<i>Fungal Genetics Stock Center</i>
FT	<i>flow through</i>
<i>g</i>	gravidade
G1P	glicose-1-fosfato
G6P	glicose-6-fosfato
GNN	enzima glicogenina do fungo <i>N. crassa</i>
GPN	enzima glicogênio fosforilase do fungo <i>N. crassa</i>
<i>gpn</i>	gene da glicogênio fosforilase de <i>N. crassa</i>
GS	glicogênio sintase
GSN	enzima glicogênio sintase do fungo <i>N. crassa</i>
<i>gsn</i>	gene da glicogênio sintase de <i>N. crassa</i>

Gsy1p	enzima glicogênio sintase isoforma 1 de <i>S. cerevisiae</i>
Gsy2p	enzima glicogênio sintase isoforma 2 de <i>S. cerevisiae</i>
h	hora(s)
HAT	histona acetiltransferase
HDAC	histona deacetilase
HEPES	ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico
<i>hph</i>	gene que codifica para higromicina B fosfotransferase
HGV	<i>High Glucose Vogels</i>
IPTG	isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kb	kilobase
kDa	kilodalton
KO	<i>knockout</i>
M	molar
Mb	mega base
mg	miligrama
min	minuto(s)
mM	milimolar
MM	massa molecular
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NSL	sinal de localização nuclear
N-terminal	região amino terminal da proteína
NBT	cloreto p-nitroazul de tetrazólio
nm	nanômetro
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	pares de base
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PI	ponto isoelétrico
PMSF	fluoreto de metilfenilssulfonil
RIP	<i>Repeat Induced Point mutation</i>
RNA	ácido ribonucléico
rpm	rotação por minuto
seg	segundo(s)
SSC	solução salina de citrato de sódio
SDS	duodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SSPE	solução salina fosfato-EDTA
STET	sacarose Tris triton X-100 EDTA
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-Borato-EDTA
TBS	tampão Tris-salina
TBST	tampão TBS acrescido de Tween 20
TCA	ácido tricloroacético
TLCK	N α -p-tosil-L-lisina-clorometilcetona hidrocloreto
TM	temperatura de <i>melting</i>
TPR	domínio tetratricopeptídeos repetidos de interação proteína-proteína
Tris	hidroximetilaminometano
UDP	uridina difosfato
UDPG	uridina difosfato glicose
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	luz ultravioleta
V	volts
VM	meio mínimo de Vogel
WCC	Complexo White Collor
WD40	domínio WD de interação proteína-proteína
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
YE	extrato de levedo
μ g	micrograma
μ L	microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O fungo modelo <i>Neurospora crassa</i>	21
1.1.1 Ciclo de vida	22
1.1.2 O sequenciamento do genoma do fungo	25
1.2 Metabolismo do glicogênio: aspectos bioquímicos e regulatórios	27
1.3 Fatores e cofatores de transcrição envolvidos no metabolismo do glicogênio	34
1.3.1 Os cofatores de transcrição RCO-1/RCM-1 ortólogos a Tup1-Ssn6 de <i>S. cerevisiae</i>	35
1.3.1.1 O complexo global corepressor Tup1-Ssn6 de levedura	37
1.4 Relógio biológico em <i>N. crassa</i>	41
2 OBJETIVOS	46
3 MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Linhagens utilizadas	49
3.1.1 <i>Neurospora crassa</i>	49
3.1.2 <i>Escherichia coli</i>	49
3.2 Meios de cultura	49
3.2.1 <i>N. crassa</i>	49
3.2.2 <i>E. coli</i>	50
3.3 Propagação das linhagens de <i>N. crassa</i> e obtenção dos conídios	51
3.4 Análise morfológica das linhagens mutantes e selvagem	51
3.4.1 Crescimento linear das hifas basais	51
3.4.2 Crescimento em meio sólido	52
3.4.3 Crescimento colonial e análise do crescimento radial	52
3.4.4 Visualização das extremidades das hifas	52
3.5 Ensaio de choque térmico	52
3.6 Ensaio utilizando diferentes fontes de carbono	53
3.7 Ensaio de relógio biológico (<i>time course</i>)	53
3.8 Ensaio de indução por luz	53
3.9 Preparo do extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio	54
3.10 Extração de RNA total e análise da expressão gênica por <i>Northern blot</i>	55

3.10.1 Extração RNA total	55
3.10.2 Ensaio de <i>Northern blot</i>	56
3.11 Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das ORFs	57
3.12 Extração de DNA genômico e confirmação dos nocautes gênicos	57
3.12.1 Extração de DNA genômico de <i>N. crassa</i>	57
3.12.2 Confirmação dos nocautes gênicos por PCR	58
3.13 Clonagem das ORFs por RT-PCR	59
3.14 Mini-extração de DNA plasmidial	60
3.15 Preparo e transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	61
3.16 Ensaio de produção e purificação das proteínas recombinantes	62
3.16.1 Subclonagem das ORFs em vetor de expressão	62
3.16.2 Ensaio de indução protéica e análise de solubilidade	63
3.16.3 Análise da expressão das proteínas por <i>Western Blot</i>	64
3.16.4 Produção e purificação das proteínas recombinantes em pequena escala	65
3.16.5 Purificação em escala maior	66
3.17 Análise da ligação DNA-proteína por EMSA	67
3.17.1 Preparo e marcação da sonda de DNA	67
3.17.2 Ensaio de mobilidade em gel	69
3.18 Análise computacional dos fatores/cofatores de transcrição	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
PARTE 1 – Caracterização dos fatores/cofatores de transcrição	72
4.1 Descrição das linhagens	72
4.2 Confirmação dos nocautes gênicos	72
4.3 Análises morfológicas das linhagens mutantes	75
4.3.1 Crescimento em meio sólido	75
4.3.2 Crescimento colonial e crescimento radial	76
4.4 Determinação do acúmulo de glicogênio e avaliação da expressão dos genes <i>gsn</i> e <i>gpn</i> nas linhagens	79
4.5 Características bioquímicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU09739	82
4.6 Análise da expressão do gene NCU09739	84
4.7 Clonagem da ORF NCU09739, ensaio de produção e purificação da	86

proteína recombinante	
4.8 Características bioquímicas dos cofatores de transcrição RCO-1 e RCM-1	90
4.9 Análises de similaridade e alinhamento das sequências das proteínas RCO-1 e RCM-1	92
4.10 Clonagem dos genes <i>rco-1</i> e <i>rcm-1</i> , ensaio de produção e purificação das proteínas recombinantes	98
4.11 Ensaio com diferentes fontes de carbono	104
4.12 Análise da ligação DNA-proteína por EMSA	109
PARTE 2 – Estudos de correlação entre metabolismo de glicogênio e relógio biológico em <i>N. crassa</i>	111
4.13 Linhagens utilizadas em ensaios de relógio biológico e indução por luz	111
4.14 Determinação da taxa de crescimento linear das linhagens mutantes em comparação à selvagem em experimentos de relógio biológico	111
4.15 Determinação do acúmulo de glicogênio e avaliação da expressão dos genes <i>gsn</i> , <i>gpn</i> e <i>ccg-1</i> em resposta ao relógio biológico	114
4.16 Determinação do acúmulo de glicogênio e avaliação dos genes <i>gsn</i> , <i>gpn</i> e <i>ccg-1</i> em ensaios de indução por luz	118
5 PRINCIPAIS CONCLUSÕES	121
REFERÊNCIAS	124

1. Introdução

1.1 O fungo modelo *Neurospora crassa*

Os fungos, plantas e animais representam os três reinos filogenéticos de eucariotos (citado em DUNLAP et al., 2007). Com somente 70 mil diferentes espécies de fungos descritas até o momento (BLACKWELL, 2011), cerca de 75% pertencem aos Ascomicetes (sendo 90% fungos filamentosos e o restante leveduras), 25% aos Basidiomicetes (DUNLAP et al., 2007) e os demais filos estão representados em menor quantidade. Porém se estima que o reino dos fungos possua 1,5 milhões de espécies (HAWKSWORTH, 2001) e estimativas mais recentes, baseadas em dados adquiridos de métodos moleculares, calculam um total de 5,1 milhões de espécies (O'BRIEN et al., 2005; TAYLOR et al., 2010).

O fungo filamentoso *Neurospora crassa* tem sido utilizado como sistema de modelo genético desde meados de 1930 (SHEAR; DODGE, 1927; LINDEGREN; BEANFIELD; BARBER, 1939) por causa de diversas vantagens: apresenta requerimento nutricional simples, cresce em meio de cultura quimicamente definido, tem uma fase vegetativa haplóide com um ciclo de vida de duas a três semanas, possui dois *mating type* (fator de acasalamento) distintos, produz ascósporos, apresenta facilidade nas análises genéticas (DAVIS; PERKINS, 2002) e tem o seu genoma sequenciado. Pertencente aos Ascomicetes, *N. crassa* foi rapidamente adotado por um grande número de laboratórios após Beadle e Tatum (1941) definirem o papel de genes envolvidos no metabolismo celular deste fungo, baseados na hipótese “um gene, uma enzima”. Estas descobertas permitiram que *N. crassa* se tornasse um modelo experimental bastante popular na época (DAVIS; PERKINS, 2002) para estudos bioquímicos, genéticos, fisiológicos e moleculares e, hoje, amplamente utilizado em estudos de expressão gênica, ritmo circadiano, fotobiologia, defesa do genoma, silenciamento gênico e reparo de DNA (DAVIS, 2000; DUNLAP et al., 2007). Devido a sua multicelularidade, é usado para elucidar processos celulares tais como desenvolvimento e diferenciação celular, bem como outros aspectos da biologia de eucariotos (DAVIS; PERKINS, 2002).

Em 1843, *N. crassa* foi descrito pela primeira vez como contaminante de pães e outras substâncias ricas em carboidratos e ficou conhecido como “bolor laranja” nas padarias francesas (PAYEN, 1843; PERKINS, 1991). No Brasil, *Neurospora* foi descrito como um fungo laranja que crescia após a vegetação ser submetida à queimada (MÖLLER, 1901). A associação de *Neurospora* com calor já é conhecido

a muito tempo. Sabe-se que os ascósporos são tolerantes às altas temperaturas e permanecem dormentes até que sejam expostos ao calor. A ativação dos ascósporos pelo calor explica a ocorrência do fungo *N. crassa*, tanto em infestações nas padarias como em vegetação após queimada (PERKINS, 1992).

Neurospora é um fungo cosmopolita e tem sido isolado de diversas localidades em todo o mundo (TURNER; PERKINS; FAIRFIELD, 2001). Apresenta nutrição simples, crescendo em meio contendo fonte de carbono, sais e alguns micronutrientes, sendo que o único requisito essencial é a biotina. Pode utilizar diversas fontes de carbono, como glicose, manose, frutose, xilose, sacarose, maltose, celobiose e trealose. Seu crescimento ótimo é em pH 5,4, mas é bastante tolerante e consegue se desenvolver em uma faixa de pH variando entre 4,0 e 7,5. Tem crescimento vegetativo em temperatura ótima de 30 a 35°C, embora possa crescer de 42°C a 5°C. Trata-se de um aeróbio restrito, não patogênico, como tempo de duplicação de aproximadamente 150 minutos (METZENBERG, 1979).

1.1.1 Ciclo de vida

O ciclo de vida de *N. crassa* (Figura 1) compreende duas fases: vegetativa, onde é possível observar estruturas de propagação do fungo denominadas conídios, e a sexual de reprodução, onde é possível verificar a presença dos corpos de frutificação. Sendo um fungo heterotálico, *N. crassa* possui dois tipos de indivíduos sexualmente compatíveis, designados A e a. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer das duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto outro pode se comportar como doador de núcleos ou receptor de núcleo (FINCHAM; DAY; RADFORD, 1979).

Durante a fase vegetativa de crescimento do fungo, o micélio é composto por hifas de núcleos haplóides e a reprodução se faz por meio dos conídios que podem ser produzidos por duas vias distintas, a macroconidiação e a microconidiação (Figura 1). Ambas as vias requerem interface água-ar e são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos (ADAMS; WIESER; YU, 1998; SPRINGER, 1993), localizados nas extremidades das hifas aéreas, os quais permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados (BORKOVICH et al., 2004). A macroconidiação pode

ser induzida por sinais ambientais como choque-térmico, dessecação e limitação nutricional (TURIAN; BIANCHI, 1972), e regulada pelo relógio biológico endógeno de *N. crassa* (LOROS; DUNLAP, 2001). Os macroconídios apresentam coloração laranja-rosado, produzem carotenóide (ZALOKAR, 1957a, 1957b) e se desenvolvem em condição de alta quantidade de açúcar e nitrogênio (PANDIT; MAHESHWARI, 1996). Na microconidiação, os esporos mononucleados são formados dentro das hifas basais e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa (PERKINS; TURNER; BARRY, 1976) ou então de microconidióforos (BISTIS; PERKINS; READ, 2003; MAHESHWARI, 1999; SPRINGER; YANOFSKY, 1989). Os microconídios apresentam coloração marrom-esverdeado, produzem melanina e carotenóide (TURIAN; OULEVEY; TISSOT, 1967) e se desenvolvem em condição de baixa quantidade de açúcar e nitrogênio (PANDIT; MAHESHWARI, 1996). Outra forma de propagação assexual é por meio dos artroconídios que são fragmentos de hifas multinucleadas, produzidos pela desarticulação de hifas aéreas ou disjunção de células (MAHESHWARI, 1999) e apresentam forma cilíndrica (SPRINGER; YANOFSKY, 1989).

A fase sexual acontece quando qualquer estrutura (A ou a) é submetida à condição limitante de nitrogênio. Em resposta à esta privação são originados corpos de frutificação denominados protoperitécio, adotado convencionalmente como órgão reprodutor feminino. O protoperitécio consiste de uma ascogônia e a partir desta, hifas especializadas chamadas tricógino projetam-se em direção ao ar por ação de feromônios. A fertilização ocorre quando uma célula de tipo de acasalamento oposto, que pode ser macroconídio, microconídio ou artroconídio, entra em contato com o tricógino. O doador de núcleo (macho) é conduzido para dentro do ascogônio, onde encontra o núcleo residente (fêmea) (METZENBERG, 1979). Neste estágio ocorre a plasmogamia, associação de núcleos aos pares, que começam a se dividir sincronicamente para a formação de numerosas hifas ascógenas. Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia começa a desenvolver uma espécie de parede originando uma estrutura denominada peritécio maduro. Há formação do asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haplóides. Em seguida, ocorre uma mitose resultando em oito núcleos haplóides dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada *mating type*. Estes núcleos originarão esporos (ascósporos), que sob eventuais

circunstâncias germinarão originando um novo micélio (Figura 1) (FINCHAM; DAY; RADFORD, 1979; BORKOVICH et al., 2004).

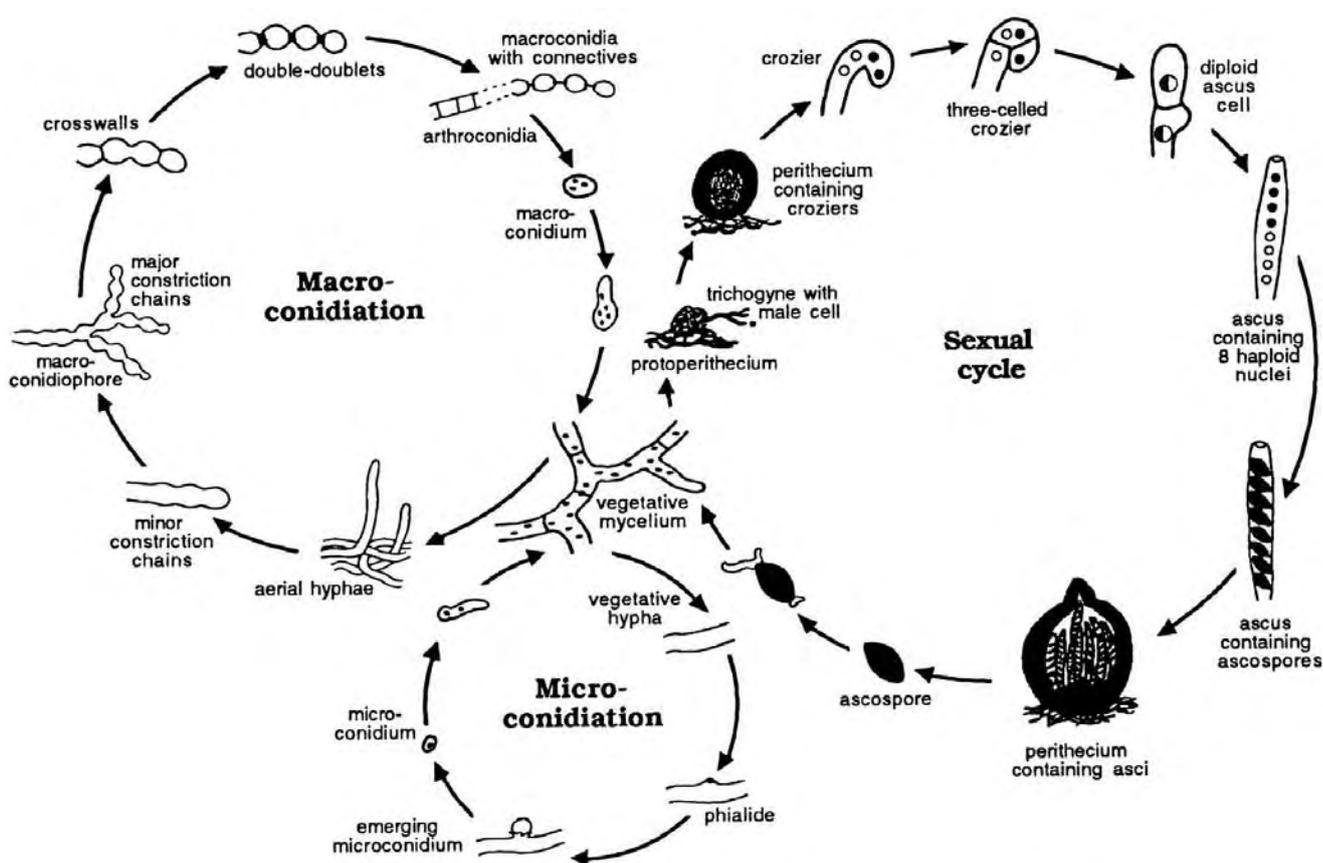


Figura 1- Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. O ciclo assexuado compreende as fases de macroconidiação e microconidiação e o ciclo sexual se inicia pela formação do protoperitécio em determinadas condições ambientais, que quando fertilizado se desenvolve, culminando na produção de ascósporos derivados de meiose (SPRINGER, 1993).

1.1.2 O sequenciamento do genoma do fungo

A sequência genômica do fungo foi determinada por Galagan et al. (2003) revelando ser constituída por cerca de 40 Mb, bem maior se comparado com outros fungos com genomas já conhecidos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Seu genoma está organizado em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb de tamanho (SCHULTE et al., 2002) e possui um total de 10.082 genes codificadores de proteínas que cobrem 44% do genoma. Na época do sequenciamento do genoma, somente 13% dos genes codificavam proteínas conhecidas em bancos de dados, 46% das ORFs codificavam proteínas hipotéticas, e 41% deles codificavam proteínas que não possuíam ortólogos funcionais conhecidos, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. Outro fato interessante é que cerca de 57% das proteínas não possuíam relação às proteínas conhecidas de leveduras e, quando comparado com genomas conhecidos de eucariotos, 1.421 genes de *N. crassa* apresentaram as melhores correlações em relação às proteínas de plantas ou animais (GALAGAN et al., 2003), o que sugere uma relação mais estreita entre fungos filamentosos e eucariotos superiores, se comparado com leveduras e eucariotos inferiores.

Em 2011, Wang et al. realizaram novas análises computacionais do genoma de *N. crassa*, na busca de interações proteína-proteína preditas. Estes pesquisadores mostraram que 40% dos genes codificam proteínas funcionalmente anotadas em bancos de dados e estimaram a ocorrência de 27.588 interações proteína-proteína entre 3.006 proteínas de *N. crassa*, ou seja, cada proteína tem, em média, 18,4 parceiros. Quase 10 anos após o término do sequenciamento do genoma de *N. crassa* e a presença de um grande número de genes ainda com funções desconhecidas aponta este organismo como um promissor modelo para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos, os quais podem possivelmente representar genes com novas funções ou novos genes desempenhando funções conhecidas de maneiras diferentes (DUNLAP et al., 2007).

Após o sequenciamento do genoma de *N. crassa* (GALAGAN et al., 2003), metodologias foram desenvolvidas para a inativação de genes específicos (NINOMIYA et al., 2004) e criação de um banco de linhagens mutantes (DUNLAP et al., 2007). Assim deram início às análises da genômica funcional do fungo,

buscando expandir o conhecimento por meio da comparação de importantes processos biológicos entre organismos modelos distintos.

Em *N. crassa* estão descritos dois processos de geração de linhagens mutantes: mutação por RIP (*Repeat Induced Point mutation*) e a técnica de nocaute por recombinação homóloga. *N. crassa* tem um sistema natural de defesa do genoma (processo de RIP) que foi descoberto em 1986, no qual o fungo detecta sequências duplicadas no genoma haplóide (SELKER et al., 1987) e induz mutações pontuais, normalmente trocando as bases GC por AT (CAMBARERI et al., 1989), em ambas sequências, resultando em um silenciamento gênico ou inativação parcial do gene. Baseado no processo natural de *N. crassa*, a inativação de genes para a construção de linhagens mutadas por RIP baseia-se na introdução de uma cópia extra do gene alvo no fungo. Os transformantes, contendo uma cópia adicional do gene, introduzem mutações pontuais na sequência genômica quando submetidos ao cruzamento seguido de meiose (SELKER, 1990). Esta técnica foi bastante utilizada para a construção de linhagens mutantes e, embora seja um método eficaz, demanda muito tempo para ser desenvolvido. Hoje, esta técnica é usada para a inativação parcial de genes essenciais.

O outro processo de geração de linhagens mutantes é pelo procedimento de nocaute, que é um mecanismo mais rápido e baseia-se na recombinação homóloga. Em eucariotos, existem dois mecanismos de recombinação gênica: a recombinação homóloga que envolve a quebra do DNA, seguida da troca entre sequências homólogas, e a recombinação não-homóloga, na qual o DNA exógeno é integrado em qualquer região do genoma, independente da homologia. A recombinação homóloga é o mecanismo predominante em *S. cerevisiae*, porém ocorre em raríssimas ocasiões tanto em *Neurospora* como nos demais eucariotos, dependendo do gene e do tamanho da região nucleotídica homóloga que flanqueia o gene de interesse (DUNLAP et al., 2007).

Já o mecanismo de recombinação gênica não-homóloga é conservado evolutivamente em todos os reinos, sendo o mecanismo predominante em eucariotos superiores, como humanos, plantas e insetos. Dentre as proteínas envolvidas neste mecanismo, destacam-se as proteínas Ku70 e Ku80, as quais formam um heterodímero que se liga nas extremidades do DNA, compondo um complexo de reparação das fitas (WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001). Com a identificação dos genes homólogos aos genes codificadores das proteínas Ku70 e

Ku80 no genoma do fungo *N. crassa*, *mus-51* e *mus-52*, respectivamente, Ninomiya et al. (2004) desenvolveram um procedimento, baseado em PCR, para inativação destes genes e, desta maneira, construir linhagens nas quais o processo de recombinação não-homóloga é inoperante, favorecendo a recombinação homóloga. A técnica de nocaute permitiu a construção de um banco de linhagens mutantes de *N. crassa* nos genes codificadores de proteínas e, assim, alavancar a genômica funcional. Dessa forma, linhagens contendo genes individualmente inativados começaram a se tornar disponíveis para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Em 2006, Colot et al. publicaram os primeiros resultados relacionados às linhagens nocauteadas em genes que codificam fatores de transcrição e a utilização de tais linhagens tornou-se um material interessante para o início dos estudos acerca dos mecanismos regulatórios das proteínas ausentes nas linhagens mutantes.

1.2 Metabolismo do glicogênio: aspectos bioquímicos e regulatórios

Nosso grupo de pesquisa utiliza o fungo *N. crassa* como organismo modelo para o estudo de mecanismos celulares básicos, como o metabolismo de glicogênio. O glicogênio é um polímero ramificado formado por moléculas de glicose, encontrado em células de diferentes organismos, com a função de reserva de carbono e energia para as células (HARRIS, 1997; NELSON; COX, 2008). O glicogênio é uma molécula uniforme e compacta, na qual os resíduos de glicose estão unidos covalentemente por ligações glicosídicas α -1,4, que são responsáveis pela formação das cadeias lineares, e ligações α -1,6, que ocorrem a cada 4 resíduos de glicose e são responsáveis pela ramificação da molécula (NELSON; COX, 2008).

A síntese e degradação deste polímero são processos conservados nos eucariotos, sendo que existem três proteínas envolvidas na biossíntese deste polissacarídeo: (i) a glicogenina, uma proteína autoglicosilável que funciona como uma molécula iniciadora para o início da biossíntese do glicogênio (FARKAS et al., 1991; CHENG et al., 1995); (ii) a glicogênio sintase que catalisa a extensão da cadeia pela formação das ligações α -1,4 lineares da molécula via transferência de resíduos de glicose a partir de UDP-glicose (UDPG) à extremidade não redutora da cadeia polissacarídica pré-existente (LELOIR, 1971; ALONSO et al., 1995) e (iii) a

glicosil-(4→6)-transferase (enzima ramificadora) que catalisa as ligações α -1,6 ramificadas (NELSON; COX, 2008).

A glicose entra na célula via transporte passivo e é mediado por proteínas transportadoras especializadas (OLSON; PESSIN, 1996; THORENS, 1996), sendo convertida em glicose-6-fosfato (G6P) em uma reação catalisada pela hexoquinase. A G6P pode participar da glicólise para a produção de energia via fermentação ou oxidação, também pode seguir para o ciclo das pentoses para produção de pentoses e equivalentes redutores, ou então ser convertida em glicogênio e servir como reserva de unidades de glicose. Na síntese do glicogênio, a G6P é primeiramente transformada em glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase, a qual deve servir como substrato para a produção de UDPG pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. Desta maneira, as moléculas de UDPG são as doadoras diretas de resíduos de glicose para a síntese do glicogênio (ROACH, 2002; NELSON; COX, 2008). Para que a glicogênio sintase (GS) estenda a molécula de glicogênio é necessária a presença de um oligossacarídeo contendo pelo menos oito resíduos de glicose, o qual é fornecido pela glicogenina autoglicosilada em seus resíduos de tirosina. A síntese se completa pela atuação da enzima ramificadora, a qual transfere um fragmento de seis a sete resíduos de glicose da cadeia nascente para os pontos de ramificação (ROACH, 2002). Estas ramificações ocorrem, equidistantemente, a cada 10-14 resíduos de glicose (citado por BERTOLINI et al., 2012). O efeito biológico da ramificação é deixar a molécula do glicogênio mais solúvel e aumentar o número de extremidades não-redutoras, o que torna o glicogênio mais acessível às enzimas glicogênio fosforilase e GS, já que ambas trabalham apenas com as extremidades não redutoras (NELSON; COX, 2008).

Na degradação do polissacarídeo, a enzima glicogênio fosforilase catalisa a liberação dos resíduos de G1P a partir das extremidades da cadeia polissacarídica, onde as ligações glicosídicas α -1,4 unindo dois resíduos de glicose são atacadas por fosfato inorgânico por meio de uma reação de fosforólise. Ela age repetitivamente sobre as extremidades não redutoras das ramificações da molécula de glicogênio até que restem apenas quatro resíduos de glicose distantes do ponto de ramificação. A etapa restante da degradação é controlada pela enzima oligo-(1,6)→(1,4)-glicotransferase (ou enzima desramificadora) que catalisa duas reações sucessivas: 1) transferência de três dos quatro resíduos de glicose restantes da ação da glicogênio fosforilase para a cadeia linear mais próxima através de sua atividade

transferase, e 2) remoção do resíduo de glicose α -1,6, resultando em um polímero linear que será novamente substrato para a enzima fosforilase. Resíduos de G1P, produtos finais da degradação do glicogênio, são novamente convertidos em G6P pela enzima fosfoglicomutase (NELSON; COX, 2008). Os processos de síntese e degradação do glicogênio em *N. crassa* podem ser observados na Figura 2.

As enzimas regulatórias glicogênio sintase e glicogênio fosforilase estão sujeitas a diferentes tipos de regulação: modulação alostérica e controle pós-traducional, por ação de proteínas quinases e fosfatases (FRANÇOIS; VILLANUEVA; HERS, 1988). A glicogênio sintase é regulada por alosterismo pela glicose-6-fosfato e Baskaran et al. (2010) determinaram a estrutura tridimensional de uma das isoformas da glicogênio sintase de levedura (Gsy2p) e foram os primeiros a elucidar o papel ativador da G6P. Além desta modulação, a GS também pode apresentar atividade alterada na presença dos inibidores ATP, UDP, fosfato inorgânico e outros intermediários metabólicos (PIRAS; ROTHMAN; CABIB, 1968).

O controle pós-traducional da GS é feita via fosforilação multisítios por meio da ação de proteínas quinases, causando uma relativa inativação da enzima. Através da ação de enzimas fosfatases, a GS apresenta-se na sua forma ativa e desfosforilada. Sendo assim esta enzima existe em duas formas distintas, diferindo entre si pelo estado de fosforilação e dependência do ativador alostérico G6P. A forma *a* (desfosforilada e ativa) apresenta atividade completa e pouca dependência de G6P. A forma *b* (fosforilada e pouco ativa) apresenta atividade somente na presença do modulador G6P. Deste modo, a razão entre a atividade GS na ausência/presença de G6P tem sido usada como índice cinético do grau de fosforilação da enzima (HARDY; ROACH, 1993; NELSON; COX, 2008).

A glicogênio fosforilase possui apenas um sítio de fosforilação, Ser14, que é modificada pela ação da proteína quinase fosforilase. Esta enzima está na sua forma ativa quando fosforilada, e relativamente inativa quando desfosforilada (NELSON; COX, 2008), e também está sujeita a complexa regulação alostérica, principalmente pelo AMP (TÉLLEZ-IÑÓN; TORRES, 1970; JOHNSON, 1992; JOHNSON; BARFORD, 1990; MADSEN, 1986).

Além dos mecanismos de regulação das enzimas glicogênio sintase e fosforilase, o metabolismo de glicogênio também pode ser regulado sob diferentes mecanismos, como consequência da regulação da expressão gênica em determinados genes dependendo das condições ambientais. Tanto microrganismos

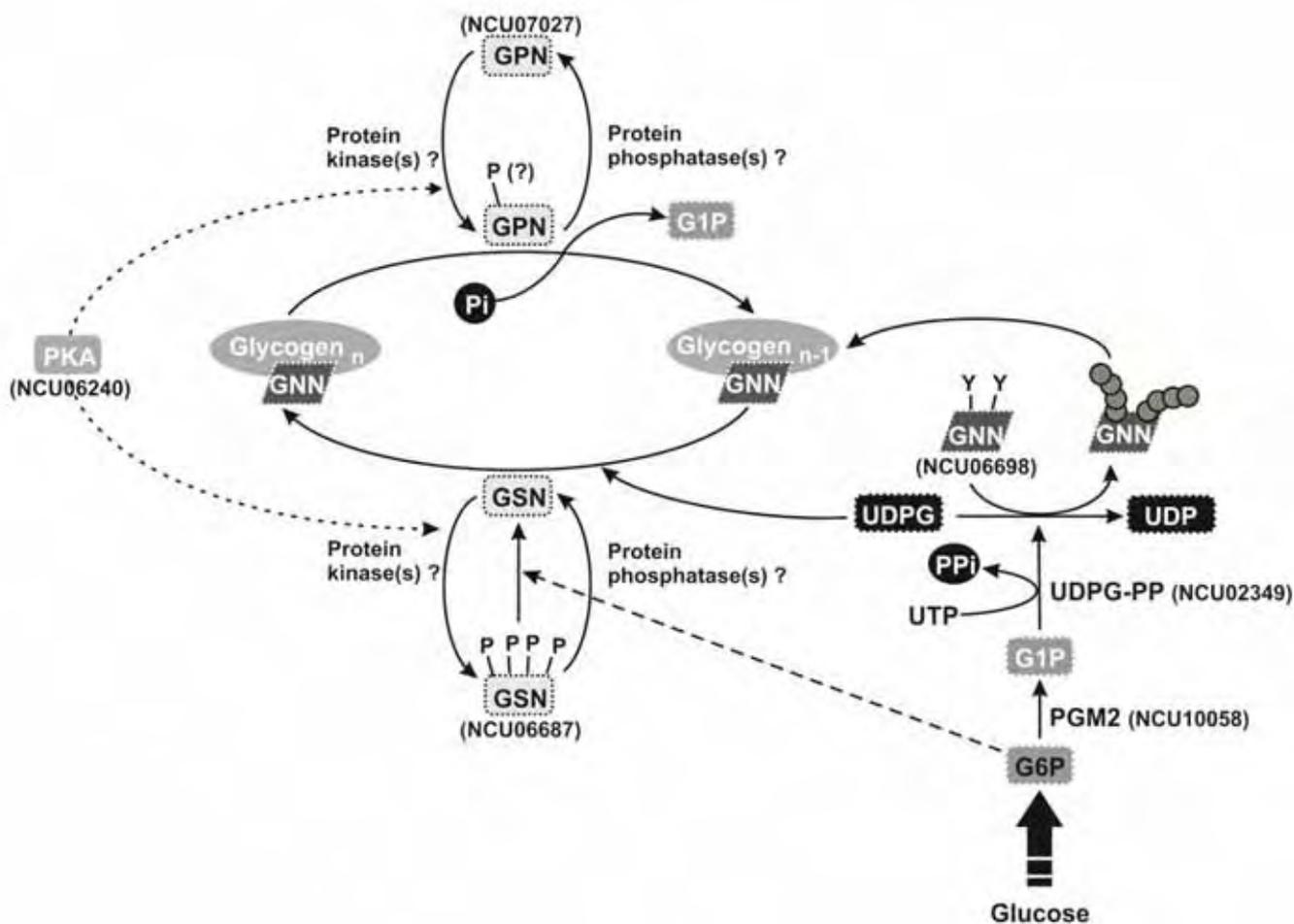


Figura 2- Representação esquemática da síntese e degradação do glicogênio em *N. crassa*. Glicose entra na célula e é convertida em UDPG, molécula doadora de glicose. A glicogenina (GNN), que é iniciadora da síntese de glicogênio, se autoglicosila, gerando extremidades não redutoras que permitem a elongação do glicogênio pela enzima glicogênio sintase (GSN), através de ligações glicosídicas α -1,4. A enzima glicogênio fosforilase (GPN) catalisa reações de fosforólise, liberando G1P. GSN e GPN são controladas por fosforilação reversível por meio da ação de proteínas quinases e fosfatases. Quatro putativos sítios de fosforilação são mostrados para GSN. As ORFs de *N. crassa* correspondentes aos produtos do metabolismo de glicogênio estão representadas entre parênteses. PGM2: fosfoglicomutase2, UDPG-PP: uridina 5'-difosfoglicose pirofosforilase, UDPG: uridina 5'-difosfoglicose, PKA: proteína quinase dependente de AMP cíclico (BERTOLINI et al., 2012).

quanto mamíferos sintetizam e acumulam glicogênio em períodos de abundância de nutrientes e o degradam quando as células enfrentam períodos de estresse, como escassez nutricional (HARRIS, 1997; LILLIE; PRINGLE, 1980). Células de *S. cerevisiae* acumulam glicogênio quando a cultura inicia sua fase de crescimento estacionário durante o crescimento vegetativo ou quando são submetidas a choque térmico (NI; LAPORTE, 1995) ou durante a indução à esporulação e germinação de esporos (THEVELEIN, 1984; COLONNA; MAGEE, 1978; KANE; ROTH, 1974). Assim, a variação do conteúdo de glicogênio celular em resposta a diversas situações ambientais indica que seu metabolismo é controlado por um complexo sistema regulatório.

Em *N. crassa* vários aspectos do metabolismo de glicogênio vêm sendo estudados dando ênfase às enzimas que participam da síntese do carboidrato. Estudos mostraram um acúmulo de glicogênio durante a fase exponencial de crescimento, o qual foi acompanhado por um aumento tanto da atividade glicogênio sintase quanto nos níveis de mensageiro *gsn*, e degradação do glicogênio quando cultura atinge a fase estacionária de crescimento (NOVENTA-JORDÃO et al., 1996; DE PAULA et al., 2002). Sob condição de choque térmico (transferência de 30 para 45°C), o nível do transcrito *gsn* e o conteúdo de glicogênio sofrem uma acentuada redução e retorna ao nível normal após o restabelecimento da temperatura fisiológica de crescimento da cultura (DE PAULA et al., 2002; FREITAS; BERTOLINI, 2004). Estes resultados mostraram que a regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* envolve mecanismos diferentes dos descritos em *S. cerevisiae*.

Estudos de caracterização bioquímica e molecular das proteínas glicogenina (GNN) e glicogênio sintase (GSN) foram realizados (DE PAULA et al., 2002, 2005a, 2005b). Somente uma isoforma da GNN foi identificado em *N. crassa* e a inativação deste gene por RIP aboliu completamente o acúmulo de glicogênio neste organismo (DE PAULA et al., 2005a). GNN tem dois sítios de glicosilação na porção N-terminal, sendo que cada resíduo contribui diferentemente para o processo de autoglicosilação, e a porção C-terminal parece ser importante para interação com a GSN (DE PAULA et al., 2005b). A enzima GSN de *N. crassa* possui alta identidade às proteínas Gsy1p e Gsy2p de *S. cerevisiae* e com as enzimas de músculo de coelho e de músculo humano. Em relação aos sítios de fosforilação da enzima GSN, 4 potenciais sítios na região C-terminal foram identificados através de reações de

fosforilação *in vitro*, entretanto a enzima parece apresentar um sítio adicional (BARBOSA, 2007).

Como mencionado, um consórcio de laboratórios foi organizado para a construção de linhagens mutantes de *N. crassa* em genes específicos que estão disponibilizadas pelo FGSC. Uma coleção de linhagens nocauteadas em ORFs codificadoras de fatores de transcrição se tornou disponível para a comunidade científica e foi adquirida com a intenção de realizar uma análise mais detalhada da participação destas proteínas nos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio.

Uma análise sistemática foi realizada com o objetivo de buscar linhagens mutantes que apresentassem um perfil de acúmulo de glicogênio distinto da linhagem selvagem em condições normais de crescimento e em situação de estresse, tal como o choque térmico. Foram identificados 17 fatores de transcrição (Tabela 1) possivelmente envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio (GONÇALVES et al., 2011). As proteínas identificadas estão classificadas em diferentes famílias de fatores de transcrição, algumas apresentam ortólogos funcionais depositados em banco de dados e a grande maioria corresponde a proteínas anotadas como hipotéticas. Algumas destas hipotéticas apresentam funções conhecidas e publicadas em trabalhos muito recentes (CHEN et al., 2009; SANCAR et al., 2011), porém suas anotações no banco de dados do fungo ainda não foram atualizadas.

A análise por *Northern blot* das linhagens mutantes selecionadas revelou que em algumas linhagens o perfil de transcrição dos genes *gsn* e *gpn* foi distinto daquele apresentado pela linhagem selvagem, tanto a 30°C como a 45°C. Desta forma, pode-se sugerir que estes fatores de transcrição estão envolvidos na regulação do metabolismo do carboidrato atuando diretamente na regulação da expressão dos genes (GONÇALVES et al., 2011; BERTOLINI et al., 2012). Considerando que muitos dos fatores de transcrição identificados foram anotados como proteínas hipotéticas ou proteínas com funções não muito definidas na literatura, seria importante a realização de estudos mais específicos da função destas proteínas dentro da regulação do metabolismo do carboidrato.

Portanto, o presente trabalho tem como objetivo estudar um fator de transcrição anotado como proteína hipotética, codificado pela ORF NCU09739 e sem nenhum estudo de caracterização funcional prévio, e outros dois cofatores de

Tabela 1 - Classificação das famílias de fatores de transcrição, anotação, características bioquímicas e estruturais das proteínas selecionadas

FGSC#	ORF	Transcription factor family	Theoretical MW/pi	cNLS	Annotation	Gene	Reference
11004	NCU08000	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	115.97/8.22	141-PKRKK (M) 706-KRHRR (M)	Cutinase factor 1 α	<i>cff-1α</i>	LI; KOLATTUKUDY, 1997
11039	NCU01097	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	90.23/6.34	36-KRVKAVTQACHTCRRYK (B)	Hypothetical protein	NI	-
11062	NCU09739	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	75.09/7.85	NI	Hypothetical protein	<i>ada-7</i>	-
11067	NCU06971	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	103.16/6.44	87-PIRRIS (M) 128-RKKR (M)	Transcriptional activator XlnR	<i>xlnR</i>	VAN PEIJ et al., 1998
11089	NCU04851	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	113.8/8.2	268-PKEKRW (M) 222-KRRNRPAVSCIPCRGRI (B)	Hypothetical protein	NI	-
11102	NCU01629	C ₂ H ₂ zinc finger	45.91/8.82	240-PRPKRQQ (M)	Hypothetical protein	NI	-
11123	NCU00808	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	61.87/5.97	147-PRIKTKK (M) 11-RKRLRTSHACDLRFRKI (B)	Hypothetical protein	NI	-
11126	NCU01154	GATA zinc finger	48.68/8.91	381-KKRR (M)	Hypothetical protein	<i>sub-1</i>	CHEN et al., 2009
11134	NCU04390	Zn ₂ Cys ₆ zinc finger	93.67/6.6	89-PQPPRRRKKK (M) 94-RRKKKPHERDLIDLKYY (B)	Fungal specific transcription factor	<i>col-22</i>	-
11139	NCU04731	bHLH	108.85/6.5	276-PNSRKRK (M)	HLH transcription factor	<i>sah-2</i>	-
11348	NCU02713	C ₂ H ₂ zinc finger	31.2/8.99	107-KRPR (M)	Hypothetical protein	<i>csp-1</i>	LAMBREGHTS et al., 2009; SANCAR et al., 2011
11355	NCU03043	C ₂ H ₂ zinc finger	39.45/ 8.79	293-KKHK (M) 341-RRHKK (M)	C ₂ H ₂ finger domain-containing protein FibC	NI	-
11397	NCU00090	C ₂ H ₂ zinc finger	67.3/7.19	280-PFDARKR (M) 285-KRQFDDLNDFFGSVKRR (B)	pH response transcription factor pacC/RIM101	<i>pacC-1</i>	LEAL et al., 2009
11437	NCU00019	Forkhead domain	74.61/7.86	33-PSKRRKK (M) 454-PASSRKRK (M)	FKH1	<i>fkh1</i>	-
11371	NCU06205	Tup-N-Terminal & WD repeats	66.08/6.42	NI	Transcriptional repressor	<i>rco-1</i>	LEE; EBBOLE, 1998
11392	NCU09068	GATA zinc finger	109.29/8.89	287-PIKARKD (M) 325-RKTSIDETSKRNPNRKR (B)	Nitrate catabolic enzyme regulatory protein	<i>nit-2</i>	FU; MARZLUF, 1987
11342	NCU01994	bZIP	36.01/5.26	140-PAQSRRK (M) 144-RRKAQNRAAQRAFRRERKE (B)	bZIP transcription factor	NI	-

Fonte: GONÇALVES et al. (2011).

transcrição, RCO-1 e RCM-1, ortólogos ao complexo corepressor Tup1-Ssn6 de *S. cerevisiae*. As linhagens mutantes nas proteínas RCO-1 e hipotética foram selecionadas por Gonçalves et al. (2011) (Tabela 1) e apresentaram níveis do carboidrato e expressão do gene *gsn* alterados quando comparados à linhagem selvagem. Outro fato bastante interessante é que as linhagens mutantes em ambas as proteínas apresentaram alterações no ciclo celular quando analisadas por citometria de fluxo. As células da linhagem *rco-1*^{KO} mostraram parada na fase S do ciclo celular, enquanto que os conídios da linhagem NCU09739^{KO} apresentaram parada na fase sub G1. Como a proteína RCO-1 é uma provável parceira da proteína RCM-1, seria interessante estudar a linhagem nocauteada no gene *rcm-1*, porém essa deleção não foi viável, sugerindo que a ausência da proteína seja letal para o fungo. Olmedo et al. (2010) inativaram o gene *rcm-1* por meio do processo de RIP, o qual promoveu a inserção de um códon de terminação da tradução no aminoácido 115 e gerou uma proteína truncada de 114 aminoácidos. Desta maneira, a linhagem *rcm-1*^{RIP} foi obtida pelo laboratório e incluída neste trabalho.

1.3 Fatores e cofatores de transcrição envolvidos no metabolismo do glicogênio

Os fatores de transcrição ou proteínas regulatórias modulam a atividade da RNA polimerase II, pois se associam e se ligam especificamente em sequências regulatórias dos genes (COOPER, 2000), e podem ser classificados em fatores gerais de transcrição e ativadores/repressores transcrpcionais. Os fatores gerais de transcrição são constituintes da maquinaria básica de transcrição, já os ativadores/repressores transcrpcionais são proteínas regulatórias específicas que modulam a expressão de determinados genes (ALBERTS et al., 2002).

As proteínas que são reguladoras transcrpcionais, mas não têm a capacidade de se ligar ao DNA por si só, são chamados de cofatores ou coreguladores transcrpcionais, e interagem com os fatores de transcrição para ativar (os coativadores) ou reprimir (os corepressores) a transcrição de genes específicos (GLASS; ROSENFELD, 2000). Os coativadores aumentam a expressão de genes por meio da interação com ativadores ou fatores gerais de transcrição, ou através da remodelagem de cromatina, por meio da interação com histonas acetiltransferases

(HAT). Estas transferem o grupo acetil para resíduos de lisina presente nas histonas, causando um maior “relaxamento” da cromatina e, conseqüentemente, menor interação histonas-DNA. Desta maneira, há um maior acesso da maquinaria de transcrição e de fatores de transcrição ao DNA (NÄÄR; LEMON; TJIAN, 2001; McKENNA; O’MALLEY, 2002; XU, 2005). Os corepressores também se ligam a fatores de transcrição e diminuem ou reprimem a transcrição de determinados genes. Este mecanismo repressor ocorre por competição com os coativadores pelos mesmos sítios de ligação aos fatores de transcrição ou através do recrutamento de histonas deacetilases (HDAC) que catalisam a remoção do grupamento acetil de resíduos de lisina das histonas, aumentando a atração histonas-DNA. Desta maneira, o DNA se torna menos acessível para os fatores de transcrição e para a maquinaria de transcrição (LAZAR, 2003; GOODSON; JONAS; PRIVALSKY, 2005).

A proteína hipotética NCU09739, incluída neste trabalho, é um fator de transcrição que apresenta um domínio clássico de ligação a DNA *zinc finger* do tipo Zn_2Cys_6 , também denominada *binuclear zinc cluster*, muito comum em leveduras e fungos, possuindo seis resíduos de cisteínas ligados a dois átomos de zinco ($Cys_2-Zn-Cys_2-Zn-Cys_2$). As cadeias laterais dos aminoácidos cisteínas coordenam em duas curtas α -hélices, unidas por uma volta oposta ao átomo de zinco. O dímero binuclear Zn reconhece 17 pares de bases no DNA (PABO; SAUER, 1992). Esta proteína hipotética não possui sinal de localização nuclear clássico e também não há trabalhos funcionais prévios que a caracterizem. Somente foi realizado uma caracterização morfológica da linhagem mutante NCU09739 por Colot et al. (2006), mostrando defeitos na conidiação, na extensão das hifas e na fertilidade feminina. Como a linhagem apresentou mais de três características morfológicas alteradas, ela foi anotada como *ada-7 (all development altered-7)*.

1.3.1 Os cofatores de transcrição RCO-1/RCM-1 ortólogos a Tup1-Ssn6 de *S. cerevisiae*

A proteína RCO-1 é um cofator de transcrição que apresenta dois domínios de interação proteína-proteína: o domínio Tup_N na porção N-terminal e sete domínios WD40 na porção C-terminal. O domínio Tup_N é responsável por interações com outras proteínas (TZAMARIAS; STRUHL, 1994) e os domínios WD40 estão presentes em proteínas de todas as espécies eucarióticas, exercendo

funções variadas que vão desde transdução de sinais até o controle do ciclo celular (LI; ROBERTS, 2001), e também são responsáveis pela interação direta com fatores de transcrição repressores, formando um complexo bem estável (MALAVÉ; DENT, 2006; SMITH; JOHNSON, 2000). Este domínio é conservado contendo de 44 a 60 resíduos de aminoácidos, sendo que na porção N-terminal, entre os resíduos de 11 a 24, normalmente contém o dipeptídeo glicina-histidina (GH), e o dipeptídeo triptofano-ácido aspártico (WD) na porção C-terminal, por isso são referidos como domínio WD40 ou GH-WD *repeats* (NEER et al., 1994). Entre os aminoácidos GH e WD existe uma sequência conservada. Nota-se que nem sempre os dipeptídeos GH e WD são absolutamente conservados (SMITH et al., 1999).

A proteína RCM-1 apresenta dez domínios repetidos de tetratricopeptídeos (TPR) de interação proteína-proteína e esse domínio foi encontrado em proteínas associadas a diversos processos, como mitose, regulação transcricional, *splicing* de RNA e neurogênese (SIKORSKI et al., 1990). Os domínios TPR podem conter de 3 a 16 repetições *in tandem* com aproximadamente 34 resíduos de aminoácidos, embora *motifs* TPR individuais possam estar dispersos na sequência de uma proteína. A sequência consenso de um domínio TPR é definida por um padrão de pequenos e grandes aminoácidos hidrofóbicos que se apresentam em uma estrutura em α -hélice antiparalela (DAS; COHEN; BARFORD, 1998; D'ANDREA; REGAN, 2003).

Estudos prévios com o fungo *N. crassa* mostraram que RCO-1, correspondente ao gene *rco-1* (*regulation of conidiation*), atua como um repressor transcricional da expressão de genes relacionados à conidiação e ortóloga à proteína Tup1 de *S. cerevisiae*. A linhagem mutante *rco-1* apresentou taxa de crescimento reduzida, morfologia das hifas alterada e ausência de conidiação (YAMASHIRO et al., 1996) e o gene *rco-1* é requerido para a fusão e morfologia normal das hifas (ALDABBOUS et al., 2010). Já a proteína RCM-1, produto do gene *rcm-1* (*regulation of conidiation and morphology*), é ortóloga à proteína Ssn6 de *S. cerevisiae* e o mutante *rcm-1^{RIP}* apresentou sérias alterações no desenvolvimento vegetativo e sexual (OLMEDO et al., 2010).

Olmedo et al. (2010) mostraram que RCO-1 e RCM-1 de *N. crassa* provavelmente formam um complexo corepressor como os ortólogos Tup1-Ssn6 de levedura, uma vez que essas proteínas participam na fotoadaptação de genes regulados por luz. Estes pesquisadores mostram que os mutantes *rco-1* e *rcm-1*

apresentaram aumento nos níveis do transcrito *con-10* (gene específico de conidiação) e de outros genes regulados por luz depois de um longo tempo de exposição à luz. Também mostraram que RCO-1 e RCM-1 estão localizadas no núcleo da célula onde regulam a transcrição de genes responsivos à luz.

1.3.1.1 O complexo global corepressor Tup1-Ssn6 de levedura

Estudos de *microarray* indicaram que o complexo global corepressor Tup1-Ssn6 é responsável pela repressão de mais de 180 genes em *S. cerevisiae* (GREEN; JOHNSON, 2004; SMITH; JOHNSON, 2000), sendo recrutados pelos fatores de transcrição e desenvolvendo suas funções repressoras por meio de interações com RNA polimerase II, histonas deacetilases e a maquinaria transcricional (MALAVÉ; DENT, 2006). O complexo Tup1-Ssn6 consiste de 3 a 4 moléculas de Tup1 e uma molécula de Ssn6 (REDD; ARNAUD; JOHNSON, 1997; VARANASI et al., 1996). A proteína Ssn6 contém 10 domínios TPR (SCHULTZ; MARSHALL-CARLSON; CARLSON, 1990) e a proteína Tup1 possui o domínio Tup_N na porção N-terminal e 7 domínios WD40 na porção C-terminal. Estudos de cristalografia mostraram que Tup_N forma uma hélice importante para a tetramerização e interação com os domínios TPR da proteína Ssn6, sendo que esta forma uma superhélice (Figura 3A) suficientemente grande capaz de acomodar Tup_N (JABET et al., 2000).

Em *S. cerevisiae* diversos fatores de transcrição recrutam o complexo Tup1-Ssn6, como a proteína Mig1 que se liga a genes reprimidos por glicose, tais como genes que codificam proteínas requeridas para o crescimento em fontes de carbono alternativo (NEHLIN; CARLBERG; RONNE, 1991), a proteína Crt1 que regula genes de resposta a danos ao DNA (HUANG; ZHOU; ELLEDGE, 1998) e a proteína Rox1 que regula genes de resposta a anaerobiose (BALASUBRAMANIAN; LOWRY; ZITOMER, 1993), dentre outros fatores de transcrição (SMITH; JOHNSON, 2000).

No caso de genes reprimidos em resposta a glicose extracelular, o fator de transcrição Mig1 se liga a promotores de determinados genes e recruta Tup1-Ssn6 para reprimir a transcrição (NEHLIN; CARLBERG; RONNE, 1991). Quando se tem uma fonte de carbono não preferencial, Mig1 é fosforilada pela proteína Snf1 no núcleo, a interação com Tup1-Ssn6 é rompida e Mig1 é translocada para o citoplasma (CHRONAKIS; GLIGORIS; TZAMARIAS, 2004). Os fatores

transcrpcionais CreA (*Aspergillus nidulans*), CRE-1 (*N. crassa*) e Mig1 (*S. cerevisiae*) vem sendo descritos como repressores transcrpcionais que agem em resposta ao mecanismo do catabolismo de carbono, conhecido como CCR (*c*arbon *c*atabolite *r*epression) (EBBOLE, 1998; SUN; GLASS, 2011). Através do sistema de duplo híbrido de levedura, foi confirmada a interação de Mig1 com Ssn6 por meio dos domínios TPR (TREITEL; CARLSON, 1995).

Vários modelos têm sido propostos para explicar como Tup1-Ssn6 poderia reprimir a transcrição de determinados genes. O primeiro modelo de mecanismo de repressão de Tup1-Ssn6 é pela interferência com o ativador (Figura 3B), porém nenhum dado experimental foi obtido em favor desta suposição e também não se sabe qual das proteínas faria interação com o ativador. O segundo mecanismo de repressão é pela interação direta com a maquinaria de transcrição geral (Figura 3C) e dois experimentos dão suporte a este modelo. Um dos experimentos mostrou a repressão da transcrição *in vitro* pela interação de Tup1-Ssn6 com a maquinaria de transcrição geral, sem a influência de um ativador, porém este experimento foi conduzido com extrato bruto de levedura, na qual pode haver participação de outras proteínas na reação de repressão. Outro experimento identificou vários produtos de genes (Srb8-11, Rgr1, Sin4, Rox3) associados quimicamente com a maquinaria de transcrição da RNA polimerase II e que são afetados pela repressão de Tup1-Ssn6 (CARLSON, 1997; MYER; YOUNG, 1998). Mutações individuais na maioria destes componentes resultaram em uma moderada redução na repressão por Tup1-Ssn6 (LEE; CHATTERJEE; STRUHL, 2000). No mutante *srb8* houve uma superexpressão de Tup1, sugerindo um envolvimento direto de Srb8 com a repressão por Tup1-Ssn6 (WAHI; KOMACHI; JOHNSON, 1998).

O último modelo proposto de repressão por Tup1-Ssn6 é pela alteração da estrutura da cromatina (Figura 3D). Este modelo é proposto com base em quatro evidências: 1) o posicionamento dos nucleossomos não permitiu a ligação de proteínas ao DNA quando genes a-específicos (genes envolvidos com *mating-type*) foram reprimidos por Tup1-Ssn6 (SHIMIZU et al., 1991; PATTERTON; SIMPSON, 1994); 2) Tup1 interage *in vitro* com a porção N-terminal das histonas H3 e H4 (EDMONDSON et al., 1996); 3) a deleção ou mutação nas caudas das histonas, em algumas condições, levaram à uma diminuição parcial da repressão de Tup1-Ssn6 *in vivo* (EDMONDSON et al., 1996); 4) linhagens mutantes de levedura em três genes de histonas deacetilases diminuíram parcialmente a repressão de Tup1-Ssn6

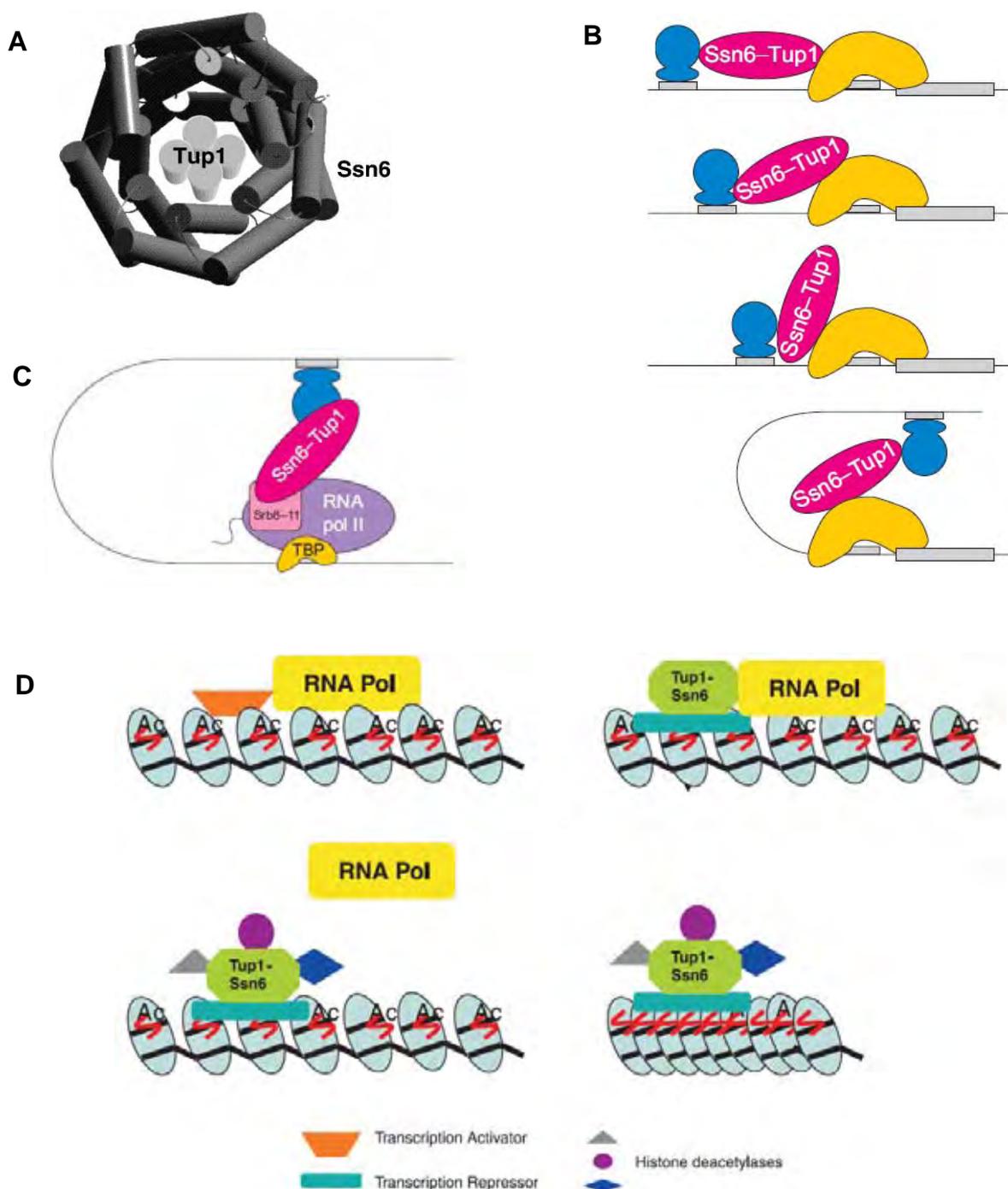


Figura 3- Interação entre as proteínas Tup1-Ssn6 de *S. cerevisiae* e seus mecanismos de repressão. (A) Modelo de interação entre Tup1 e Ssn6 por meio de seus domínios Tup_N e TPR, respectivamente (JABET et al., 2000). (B) Modelo de interação do complexo corepressor com o ativador. Tup1-Ssn6 interage com o fator de transcrição, em azul, e com o possível ativador, em amarelo, de diversas maneiras, mesmo que o sítio do operador esteja distante do sítio de início da transcrição (SMITH; JOHNSON, 2000). (C) Modelo de repressão de Tup1-Ssn6 pela interação direta com componentes da maquinaria de transcrição (SMITH; JOHNSON, 2000). (D) Modelo de repressão por alteração da estrutura da cromatina. Tup1-Ssn6 é recrutado pelo fator de transcrição repressor, em verde escuro, e interage com o complexo mediador da RNA polimerase II, desfazendo-se o complexo transcricional. O complexo corepressor recruta HDACs para acetilar histonas e, desta maneira, ocorre a compactação da cromatina (MALAVÉ; DENT, 2006).

(EDMONDSON et al., 1998). Para uma maior repressão, todos esses modelos podem ocorrer conjuntamente ou separadamente, e a interação com diferentes repressores, componentes mediadores ou HDACs seria possível devido a mudanças na estrutura conformacional do complexo Tup1-Ssn6, ou seja, o complexo corepressor teria uma certa flexibilidade para acomodar-se em diferentes lugares da região promotora (Figura 3B) (SMITH; JOHNSON, 2000).

Muitos genes reprimidos por Tup1-Ssn6 são essenciais para a sobrevivência da célula sob certas condições, e sua repressão é rapidamente aumentada em resposta a um determinado sinal. Por exemplo, alguns genes requeridos para o reparo do DNA são normalmente reprimidos por Tup1-Ssn6, mas devem ser desreprimidos quando o DNA está danificado. Não existe nenhum sinal ou combinação de sinais que inativam diretamente Tup1-Ssn6; o que ocorre é uma inativação do fator de transcrição ao qual o complexo esteja ligado (SMITH; JOHNSON, 2000). No caso de genes $\alpha 1$ ou $\alpha 2$, a desrepressão tipicamente ocorre quando *S. cerevisiae* muda de *mating-type*. Desta maneira ocorre ubiquitinação do fator de transcrição e este é destruído (SMITH; JOHNSON, 2000). O fator de transcrição Crt1, que regula genes de resposta a danos ao DNA, sofre hiperfosforilação e perde a capacidade de se ligar ao DNA (HUANG et al., 1998). Em baixos níveis de glicose, a proteína Mig1 é fosforilada e exportada do núcleo (DE VIT et al., 1997; TREITEL et al., 1998; OSTLING; RONNE, 1998).

As proteínas RCO-1 e RCM-1, além de terem sido identificadas como proteínas potencialmente relacionadas com a regulação do metabolismo de glicogênio também estão descritas como envolvidas em resposta à luz e/ou relógio biológico no fungo *N. crassa*. Outros fatores de transcrição identificados também estão envolvidas em ambos processos, como: CSP-1 (*conidial separation-1*), CTF-1 α (*cutinase transcription factor 1 alfa*), SAH-2 (*short aerial hyphae-2*) e SUB-1 (*submerged protoperithecia-1*). RCO-1/RCM-1 participam na fotoadaptação de genes regulados por luz (OLMEDO et al., 2010), RCO-1 é um possível efetor *downstream* e na sua ausência o mutante apresentou alterações no período circadiano (BRODY et al., 2010). O gene *csp-1* é regulado por luz (LAMBREGHTS et al., 2009) e a proteína CSP-1 regula genes envolvidos em metabolismo, controlando a síntese de ergosterol e ácido graxo (SANCAR et al., 2011). Genes controlados por CSP-1 são expressos ritmicamente e esta proteína atua como repressora quando

forma um complexo transiente com os corepressores RCO-1/RCM-1 (SANCAR et al., 2011). *sub-1* e *sah-2* são genes induzidos por luz (SMITH et al., 2010).

O fato de termos identificado fatores e cofatores de transcrição envolvidos em resposta à luz/relógio biológico e atuando como reguladores do metabolismo de glicogênio nos levou a iniciar uma investigação sobre a correlação entre metabolismo de glicogênio e relógio biológico neste fungo.

1.4 Relógio biológico em *N. crassa*

A luz ativa uma variedade de processos fisiológicos em *Neurospora*, incluindo a biossíntese de carotenóide (HARDING; TUNER, 1981), conidiação (KLEMM; NINNEMAN, 1978; LAUTER, 1996), desenvolvimento de protoperitécio (DEGLI-INNOCENTI; POHL; RUSSO, 1983) e ajuste (*resetting*) do relógio biológico (CHEN; LOROS, 2009). Mais de 5% dos genes de *N. crassa* são expressos em resposta ao estímulo da luz em uma cascata regulada temporalmente que inclui diversos fatores de transcrição (CHEN; LOROS, 2009). Estudos de *microarray* mostraram que 314 genes respondem ao estímulo da luz aumentando os níveis dos transcritos, e dos genes analisados 45% apresentaram rápida indução, com picos de expressão entre 15-30 minutos, e 55% apresentaram indução tardia, com picos de expressão entre 45 minutos a 2 horas depois da exposição a luz (CHEN et al., 2009). Genes envolvidos com a síntese de pigmentos, vitaminas, cofatores, metabolismo secundário, processamento de DNA e sinalização celular apresentam resposta rápida em função à luz. Em contraste, genes envolvidos no metabolismo de carboidrato e oxidação de ácidos graxos apresentam resposta tardia a luz (CHEN; LOROS, 2009).

N. crassa responde à luz estritamente perto do UV/luz azul, sugerindo a presença de um fotoreceptor de sinalização à luz azul e de transdução de sinal (CHEN; LOROS, 2009; LINDEN; BALLARIO; MACINO, 1997; SARGENT; BRIGGS, 1967). Foram isolados dois mutantes cegos *wc-1* e *wc-2* que apresentam conídios com pigmentação, enquanto os micélios são de coloração branca, mesmo na presença de luz, devido a uma deficiência específica na biossíntese de carotenóide no micélio (LINDEN; RODRIGUEZ-FRANCO; MACINO, 1997). Portanto, as proteínas codificadas por *wc-1* e *wc-2* são receptores de luz (LEE; DUNLAP; LOROS, 2003; COLLETT et al., 2002). WC-1 (White Collar-1) é um fator de

transcrição da família *zinc finger* que possui domínios PAS para interação proteína-proteína (BALLARIO et al., 1996) e um domínio LOV de ligação a cromóforo, na qual ocorre ligação de uma flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (Figura 4) permitindo que WC-1 atue como fotoreceptor de luz azul (FROEHLICH et al., 2002).

A proteína WC-2 (White Collar-2) contém um domínio *zinc finger* e um domínio PAS (LINDEN; MACINO, 1997), e obrigatoriamente interage com WC-1 para formar o Complexo White Collar (WCC). Esse complexo se liga a sequências específicas na região promotora (FROEHLICH; LOROS; DUNLAP, 2003), normalmente de genes de resposta rápida à luz (CHEN; LOROS, 2009), mas também alguns de resposta tardia (LINDEN; BALLARIO; MACINO, 1997). Um exemplo seria o gene *sub-1*, no qual WCC se liga ao seu promotor após 15 minutos de estímulo pela luz, ativando sua transcrição. O fator de transcrição SUB-1 tem função de regular alguns genes de expressão rápida e a maioria dos genes de expressão tardia em função da luz (CHEN et al., 2009) (Figura 4).

Outro fotoreceptor que tem sido intensamente estudado é VIVID (VVD) que atua como um repressor da expressão de genes induzidos por luz e controlados por WCC (CHEN et al., 2009; SCHWERDTFEGGER; LINDEN, 2003; SHRODE et al., 2001). VVD é uma proteína pequena, de 21 kDa, que possui apenas um domínio PAS e um domínio LOV, no qual FAD se liga sob ativação da luz (ZOLTOWSKI; CRANE, 2008). A ativação da transcrição pela luz de alguns genes de *Neurospora* é transiente, cessando depois de um longo tempo de exposição à luz (ARPAIA et al., 1999; LAUTER; YANOFSKY, 1993), e para que ocorra essa fotoadaptação é necessária a interação de VVD e WCC (Figura 4) (HEINTZEN et al., 2001; SCHAFMEIER; DIERNFELLNER, 2011).

A perda de resposta transcricional durante a fotoadaptação pode ser revertida pelo aumento da intensidade da luz (ARPAIA et al., 1999; SCHWERDTFEGGER; LINDEN, 2001). Os genes *con-10* e *con-6* (genes relacionados a conidiação) de *Neurospora* são regulados pela luz (CORROCHANO et al., 1995; LAUTER; RUSSO, 1991; OLMEDO et al., 2010). A ativação de ambos os genes é transiente, a máxima acumulação de mRNA ocorre em 0.5-1 hora de exposição à luz e depois é reduzida. Em micélio exposto por 4 horas não são detectados níveis de mRNA de *con-10* e *con-6*, indicando claramente a fotoadaptação (LAUTER; YANOFSKY, 1993).

A luz é importante para sincronizar o relógio biológico com o ciclo dia/noite ambiental (SCHAFMEIER; DIERNFELLNER, 2011). Sabe-se que diversos

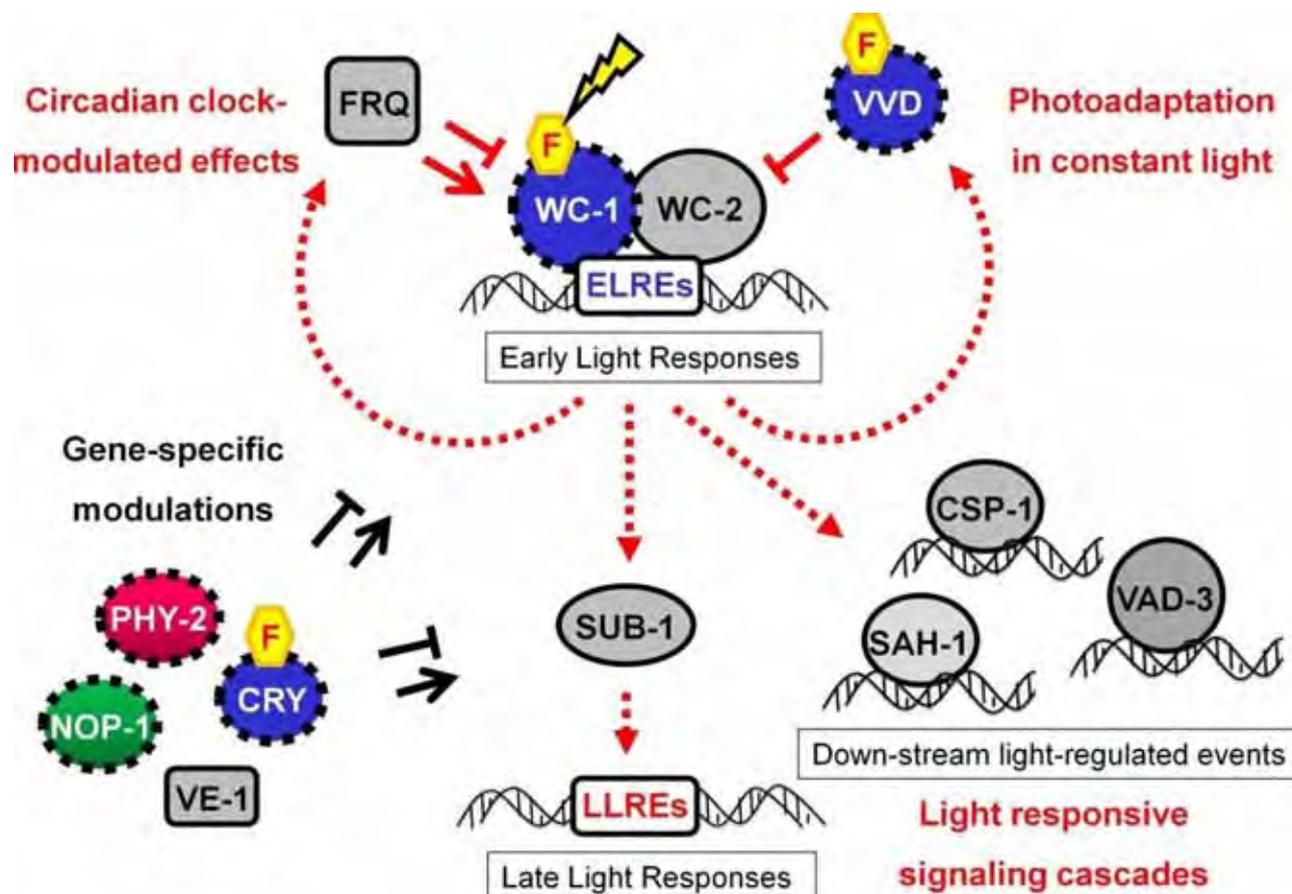


Figura 4- Respostas à luz em *N. crassa*. Na presença de luz, o complexo WCC se liga transientemente a elementos de resposta à rápida indução (ELREs) em promotores de genes de resposta rápida à luz, para ativar sua transcrição, incluindo a expressão de *frq*, que codifica para a proteína FRQ, o fotoadaptador VVD, o fator de transcrição SUB-1 e outros. A proteína FRQ modula a atividade de WCC de maneira circadiana, determinando a amplitude da resposta à luz. Em resposta à luz, a proteína VVD é altamente expressa e acumula no núcleo para reprimir a atividade transcritora por meio da interação física com WCC. A proteína SUB-1 é essencial para a maioria das respostas tardias, ligando-se a elementos de resposta à indução tardia (LLREs). Fotorreceptores secundários e outras proteínas podem afetar a resposta à luz, de maneira específica do gene ou específica à fase de crescimento, incluindo as proteínas CRY, PHY-2, NOP-1 e VE-1. Finalmente, alguns fatores de transcrição induzidos por luz, como CSP-1, SAH-1 e VAD-3, possuem funções *downstream* na cascata de sinalização (CHEN; DUNLAP; LOROS, 2010).

organismos, de bactérias até mamíferos, possuem um mecanismo endógeno que organiza as atividades bioquímicas, celulares e comportamentais. Esses ritmos diários são produzidos pelo relógio biológico e se manifestam pela expressão cíclica de genes e de produtos de genes controlados por uma ou mais vias de saída do relógio. Os ritmos circadianos são coordenados de acordo com ciclos ambientais exógenos que tem como objetivo limitar atividades em um determinado momento do dia, permitindo que a espécie organize seu metabolismo e comportamento de forma adequada (EDMUNDS, 1987). Um pequeno número de eucariotos pode ser usado como modelo para estudar as bases moleculares e bioquímicas do ritmo circadiano, dentre eles o fungo *N. crassa* (HEINTZEN; LIU, 2007). Em *N. crassa* a maioria dos genes regulados por luz também são regulados pelo relógio (SMITH et al., 2010) e os componentes centrais do oscilador circadiano foram identificados por abordagens bioquímicas e genéticas e incluem os fatores de transcrição WC-1 e WC-2, a proteína FRQ (frequency) e FRH (RNA helicase).

No sistema circadiano, a luz ajusta o relógio de *N. crassa* pela rápida ativação do complexo de proteínas WCC (BALLARIO et al., 1998; TALORA et al., 1999) e pela indução da transcrição de outros genes incluindo alguns *clock-controlled genes* (*ccg*) (HEINTZEN; LIU, 2007). No escuro, o complexo WCC forma um heterodímero (BALLARIO et al., 1998) que ativa a transcrição de *frequency* (*frq*) e esta regulação resulta na expressão rítmica do transcrito *frq* e da proteína FRQ (CROSTHWAITE et al., 1997). As proteínas FRQ são sintetizadas, se dimerizam (CHENG; YANG; LIU, 2001) e formam um complexo estável com a RNA-helicase (FRH) antes de entrarem no núcleo (CHENG et al., 2001). No núcleo FRQ-FRH interage com WCC, provavelmente bloqueando sua atividade (FROEHLICH; LOROS; DUNLAP, 2003). Portanto, FRQ funciona como um oscilador *feedback* negativo do relógio (CHENG et al., 2005; HE et al., 2006) (Figura 4).

A luz provavelmente influencia na estabilidade de WC-1 e WC-2, uma vez que ocorre fosforilação transitória destas proteínas como forma de adaptação à luz (ARPAIA et al., 1999), já no escuro, WCC é fosforilado causando sua inativação (BAKER; LOROS; DUNLAP, 2012). FRQ é progressivamente fosforilado por várias quinases e quando está completamente fosforilado é degradado, permitindo que o ciclo biológico se reinicie pela nova síntese de WCC ou pela reativação de WCC pela ação de proteínas fosfatases (BAKER; LOROS; DUNLAP, 2012; DUNLAP et al., 2007; LIU; LOROS; DUNLAP, 2000; SCHAFMEIER et al., 2008).

Dentre os genes controlados pelo relógio (*clock controlled genes, ccgs*), *ccg-9* codifica para a enzima trealose sintase que participa da síntese do dissacarídeo trealose, o qual tem função de proteção celular sob situações de estresse ambiental (SHINOHARA et al., 2002). Experimentos mostraram que *ccg-9* é requerido para a conidiação rítmica no escuro (SHINOHARA et al., 2002). A identificação destes componentes do relógio e os estudos de suas funções tornam o ritmo do fungo *N. crassa* um dos relógios circadianos mais bem entendidos entre os sistemas eucariotos estudados.

Recentemente vem surgindo na literatura trabalhos que relatam a conexão entre ritmo circadiano e metabolismo, ou seja, como os organismos conectam o *status* nutricional e metabólico aos seus relógios biológicos. Um destes trabalhos mostrou a ação do fator de transcrição CLOCK atuando diretamente na regulação do ritmo circadiano da enzima glicogênio sintase hepática (*Gys2*) por meio da ativação transcricional do gene *Gys2* (DOI; OISHI; ISHIDA, 2010). Especificamente, a mutação no gene *Clock* levou a uma diminuição na ritmicidade do conteúdo de glicogênio hepático, bem como uma redução na expressão circadiana do transcrito *Gys2* e da proteína *Gys2* (DOI; OISHI; ISHIDA, 2010). Outro trabalho mostrou a relação entre relógio biológico e diabetes, uma vez que mutantes em componentes do relógio apresentaram diminuição da oscilação rítmica de genes envolvidos com a sinalização de insulina e detecção de glicose (MARCHEVA et al., 2010). Portanto a ausência de componentes do relógio pancreático pode causar diabetes em consequência a defeitos na secreção de insulina (MARCHEVA et al., 2010). Em *N. crassa*, Correa et al. (2003) mostraram por análise de *microarray* que o gene que codifica para a enzima glicogênio fosforilase segue o ritmo do relógio biológico. Entretanto, experimentos que comprovam isto não estão disponíveis na literatura.

Portanto, pretendemos investigar mais profundamente o assunto, buscando entender se o metabolismo de glicogênio é sincronizado ao relógio biológico e desta maneira, como os dois processos podem estar conectados.

2. Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido com dois grandes objetivos:

1- Caracterizar fatores e cofatores de transcrição previamente identificados como envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio. Especificamente os objetivos foram:

- Avaliar o crescimento e morfologia das linhagens mutantes, para verificar se a ausência das proteínas pode afetar: crescimento, conidiação, produção de hifas aéreas e morfologia das hifas.
- Avaliar o conteúdo de glicogênio e a expressão dos genes que codificam as enzimas glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*) nas linhagens mutantes, com o intuito de verificar se o conteúdo de glicogênio é resultante de variações na expressão dos dois genes.
- Analisar a função de três proteínas em ensaios com diferentes fontes de carbono.
- Produzir as proteínas na forma recombinante, purificar e utilizar na produção de anticorpos.
- Analisar três proteínas em ensaios de retardamento em gel que avaliam a formação de complexos DNA-proteína.

2- Iniciar os estudos visando correlacionar metabolismo de glicogênio e relógio biológico em *N. crassa*. Alguns fatores de transcrição identificados também estão descritos como envolvidos em resposta à luz e/ou relógio biológico no fungo *N. crassa*. Desta maneira o objetivo foi iniciar alguns estudos na tentativa de correlacionar ambos processos:

- Avaliar o crescimento linear das linhagens mutantes em experimentos que mimetizam o relógio biológico do fungo.
- Avaliar o conteúdo de glicogênio e expressão dos genes *gsn* e *gpn* em experimentos de relógio biológico.
- Verificar se a expressão de genes codificadores de enzimas do metabolismo de glicogênio é induzida por luz.

3. Materiais e Métodos

3.1 Linhagens utilizadas

3.1.1 *Neurospora crassa*

- Linhagem: FGSC#2489 (A). Linhagem selvagem usada no sequenciamento do genoma do fungo.
- Linhagem: FGSC#9718 (a, *mus-51::bar^r*). Linhagem usada para a construção dos mutantes nocauteados.
- Linhagens mutantes:

Linhagem FGSC#11062 a, linhagem mutante na ORF NCU09739 (9739^{KO}).

Linhagem FGSC#11371 A, linhagem mutante na ORF NCU06205 (*rco-1^{KO}*).

Linhagem FGSC#10215, linhagem mutante na ORF NCU06842 (*rcm-1^{RIP}*).

Linhagem FGSC#10372 a, linhagem mutante na ORF NCU08807 (*cre-1^{KO}*).

As linhagens mutantes nas ORFs NCU09739, NCU06205 e NCU08807 foram obtidas através de nocaute pela inserção do gene de resistência à higromicina; e a linhagem FGSC#10215 sofreu processo de RIP na ORF NCU06842. Todas as linhagens foram disponibilizadas pelo FGSC, Kansas City, Missouri, USA.

3.1.2. *Escherichia coli*

- DH10B, F⁻ *endA1 recA1 galU galK deoR nupG rpsL ΔlacX74 Φ80/lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu) 7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ⁻* (CASADABAN; COHEN, 1980).
- BL21(DE3)pLys-S, *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysS Cam^r]* (Agilent Technologies).
- Rosetta(DE3)pLys-S, *E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal λ(DE3) [pLysSRARE Cam^r]* (Novagen).
- ArcticExpress(DE3), *E. coli* B F⁻ *ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁻ Tet^r gal λ(DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent^r]* (Agilent Technologies).

3.2 Meios de cultura

3.2.1 *N. crassa*

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens do fungo *N. crassa* foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956). Esse meio foi

preparado contendo sacarose, sais de Vogel e biotina. A solução de sais de Vogel foi preparada 50X concentrada, a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 mL de água destilada:

510 g de citrato de sódio.H₂O

250 g de KH₂PO₄

100 g de NH₄NO₃

10 g de MgSO₄.7H₂O

5 g de CaCl₂.2H₂O (pré-dissolvido em água destilada)

5 mL de solução de elementos traços

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

5 g de MgSO₄.7H₂O

5 g de ácido cítrico.H₂O

5 g de ZnSO₄.7H₂O

1 g de F(NH₄)₂.(SO₄)₂.6H₂O

0,25 g de CuSO₄.5H₂O

0,05 g de MnSO₄.H₂O

0,05 g de H₃BO₃

0,05 g de NaMoO₄.2H₂O

O meio mínimo de Vogel foi preparado contendo sacarose 2%, sais de Vogel 1X, biotina 0,1 mg/mL preparada em etanol 50% e ágar 2% para culturas de meio sólido. O pH do meio mínimo de Vogel é 5,8.

3.2.2 *E. coli*

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

Triptona 1,6%

Extrato de levedura 1,0%

NaCl 0,5%

Glicose 0,2%

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

3.3 Propagação das linhagens de *N. crassa* e obtenção dos conídios

As linhagens foram inoculadas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM sólido e crescidas inicialmente a 30°C durante 3 dias e, em seguida, expostas à luz até um total de 9 a 10 dias. Após esse período, a suspensão conidial foi coletada em aproximadamente 15 mL de água destilada estéril e filtrada com auxílio de uma gaze estéril para retenção das hifas. Os conídios foram contados em câmara de Neubauer e armazenados na temperatura de 4°C. A manutenção das linhagens nocauteadas foi realizada em VM sólido acrescido de sacarose 2% e de higromicina B 50 a 200 µg/mL.

3.4 Análise morfológica das linhagens mutantes e selvagem

A seguir, encontram-se descritas as análises fenotípicas realizadas nas linhagens mutantes analisadas. Todas as análises foram realizadas tendo como padrão o perfil apresentado pela linhagem selvagem do fungo, cultivada sob as mesmas condições. Estes experimentos tiveram como objetivo verificar se a ausência dos fatores/cofatores de transcrição afetaram o crescimento e o desenvolvimento do fungo.

3.4.1 Crescimento linear das hifas basais

A taxa de crescimento linear das hifas basais foi determinada através do crescimento em *race tubes*, os quais constituem de tubos de vidro (40 cm de comprimento x 2 cm de diâmetro) contendo as duas extremidades curvadas em um ângulo de aproximadamente 45°. Os tubos foram parcialmente preenchidos com meio VM sólido. As linhagens foram rejuvenescidas e 10^7 conídios/mL foram inoculados em uma das extremidades dos tubos, os quais foram incubados sob luz branca durante uma noite. Após este período a frente de crescimento foi marcada e denominada como tempo zero ($t=0$). A partir desta frente os tubos foram incubados no escuro (para zerar o relógio biológico) e as medidas do crescimento das extremidades das hifas foram realizadas a cada 12 h, em centímetros, até que a primeira linhagem atingisse a outra extremidade do tubo. As distâncias percorridas pelas hifas foram determinadas pela medida do espaço entre as frentes das hifas.

3.4.2 Crescimento em meio sólido

Para analisar a produção de hifas aéreas e pigmentação, as diferentes linhagens do fungo foram inoculadas em frascos *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 50 mL de meio VM sólido e incubadas a 30°C durante 3 dias. Em seguida, os frascos foram transferidos para a temperatura ambiente e luminosidade por mais 5 dias. Após 8 dias, o aspecto macroscópico das culturas foi analisado.

3.4.3 Crescimento colonial e análise do crescimento radial

Para este tipo de análise, 5 µL de suspensões conidiais (10^7 conídios/mL) foram inoculados no centro de placas contendo meio sólido VM suplementado com sacarose 2% e meio VM suplementado com sacarose 2% e extrato de levedo 2% (VM+YE). As culturas foram incubadas a 30°C (temperatura de crescimento experimental do fungo), durante 24 h. Após o período de incubação, os raios das colônias foram determinados e o crescimento radial foi obtido. Imagens digitais das colônias foram adquiridas com o auxílio de uma máquina fotográfica.

3.4.4 Visualização das extremidades das hifas

As imagens das extremidades das hifas das colônias crescidas nos meios acima mencionados foram adquiridas com auxílio do estereomicroscópio trinocular SteREO Discovery.V8 (Zeiss) com câmara fotográfica acoplada.

3.5 Ensaios de choque térmico

Para os experimentos de choque térmico, uma suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^7 células/mL foi inoculada em 30 mL de meio VM líquido e incubada a 30°C, 250 rpm por 24 h. Após esse período, os micélios foram coletados por filtração a vácuo em papel de filtro e as amostras foram rapidamente divididas em duas partes. Uma das partes foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra não submetida ao choque térmico; amostras ZERO) e a outra parte foi transferida para um frasco contendo meio VM líquido fresco, pré-aquecido a 45°C, e incubado nesta temperatura a 250 rpm, durante 30 min (amostra submetida ao choque térmico; amostra HS30). Após o choque térmico, as amostras foram coletadas por filtração, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. As amostras foram utilizadas para quantificação de glicogênio e estudos de expressão gênica.

3.6 Ensaios utilizando diferentes fontes de carbono

Uma suspensão de conídios (10^9 conídios/mL) foi inoculada em 1 L de meio VM líquido acrescido de frutose 2% (fonte não repressora) e mantida a 30°C, 250 rpm, 24 h. Após este período, os micélios foram coletados por filtração a vácuo em papel de filtro e divididos em quatro partes. Uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, FRU) e as três outras partes foram transferidas para outros frascos contendo 250 mL de diferentes meios de cultura: VM líquido acrescido de glicose 2% (fonte repressora), VM acrescido de xilose 2% e VM acrescido de glicerol 2% (fontes não repressoras). As amostras foram mantidas a 30°C, 250 rpm e coletadas após 2, 4 e 8 h de incubação. Todas as amostras foram armazenadas a -80°C e utilizadas para quantificação de glicogênio e análises de expressão gênica.

3.7 Ensaios de relógio biológico (*time course*)

Para a realização destes experimentos, cerca de 10^8 conídios/mL das linhagens selvagens FGSC#2489 e FGCS#9718 foram inoculados em meio HGV líquido (VM contendo glicose 2%, arginina 0,5%, pH 6,0) em placa de Petri e mantidos por 2 dias em luz constante, para formar um “tapete micelial” consistente. Discos de 0,8 cm foram retirados com o auxílio de um cortador, transferidos para frascos *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 125 mL de meio HGV e expostos à luz, 100 rpm, 27°C. Em seguida, os frascos foram transferidos para constante escuro em tempos determinados, a fim de manter a cultura no escuro por 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48 e 52 horas (CORREA et al., 2003, protocolo obtido por Bell-Pedersen lab). A transferência luz-escuro sincroniza as células e regula o relógio ao tempo circadiano. A partir do tempo de transferência para uma condição constante (escuro) o relógio segue com seu ritmo endógeno, a menos que seja perturbado por algum estímulo de luz externo. Os micélios foram coletados sob luz vermelha, a qual não altera o ritmo do relógio em *N. crassa* (SARGENT; BRIGGS; WOODWARD, 1966) e armazenadas a -80°C. As amostras foram utilizadas para quantificação de glicogênio e estudos de expressão gênica.

3.8 Ensaios de indução por luz

Experimentos foram montados de maneira a obter micélios em diferentes tempos de exposição à luz. Conídios foram inoculados em meio VM acrescido de

sacarose 2% em placa de Petri e mantidos por 2 dias em constante escuro, para formar um “tapete micelial” consistente. Discos de 0,8 cm foram retirados com o auxílio de um cortador, transferidos para frascos de 125 mL contendo 50 mL meio de VM acrescido de sacarose 2% e mantidos no escuro, 100 rpm, 27°C, 24 h. Os frascos foram transferidas para a luz e coletados após 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min de exposição à luz. As amostras foram coletadas, armazenadas a -80°C e utilizadas para análise do conteúdo de glicogênio e estudos de expressão gênica.

3.9 Preparo do extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio

Para o preparo do extrato celular bruto, uma pequena quantidade de cada uma das amostras congeladas foi totalmente pulverizada em nitrogênio líquido, em gral de porcelana. Em seguida, aproximadamente 200 mg de cada uma das amostras pulverizadas foi transferida para um microtubo de 1,5 mL contendo 1 mL de um tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaF 50 mM, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, benzamidina 1 mM, TLCK 10 µg/mL, antipaína 50 µg/mL e pepstatina A 1 µg/mL) e homogeneizada em *vortex*. As frações sobrenadantes foram isoladas após centrifugação (10.000 x *g*, 10 min, 4°C), recolhidas em novos microtubos e usadas para a determinação do conteúdo de glicogênio e de proteínas totais pelo método de Hartree modificado utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (HARTREE, 1972).

O conteúdo de glicogênio foi determinado através da digestão do glicogênio com α -amilase e amiloglicosidase após precipitação com etanol, de acordo com o protocolo descrito por Hardy e Roach (1993), com algumas modificações. Para isto, as proteínas contidas em 100 µL de cada uma das amostras foram precipitadas com 25 µL de uma solução TCA 50% a 5.000 x *g*, 4°C, 10 min. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos, misturados com 4 volumes de etanol absoluto gelado durante 30 min a -80°C ou 2 h a -20°C e centrifugados a 10.000 x *g*, 15 min, 4°C. Os precipitados contendo glicogênio foram lavados duas vezes com 500 µL de etanol 66%, levemente seco ao ar, e ressuspensos em 400 µL de uma solução de acetato de sódio 50 mM pH 5,2 e CaCl₂ 5 mM contendo 1 µL de cada uma das enzimas amiloglicosidase (30 mg/mL, em acetato de sódio 50 mM pH 5,2, CaCl₂ 5 mM) e α -amilase (10 mg/mL, na mesma solução) e incubados a 37°C durante 16 h. Um volume de 12,5 µL de cada uma das amostras digeridas foi tomada para a

determinação do conteúdo de glicose livre, utilizando o *kit Glicose PAP Liquiform* (Labtest), segundo as instruções do fabricante. O conteúdo de glicogênio das amostras foi calculado de acordo com uma curva padrão de glicogênio e expresso em 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.

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

3.10.1 Extração RNA total

O RNA total foi extraído de micélio obtido a partir das linhagens selvagem e mutantes do fungo pelo método de cloreto de lítio (SOKOLOVSKY et al., 1990). Para isto, uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizado em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para microtubo contendo uma mistura de 750 μL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,6 M, EDTA 10 mM, SDS 4%) e 750 μL de fenol saturado em Tris-HCl, 100 mM, pH 8,0 e homogeneizado em *vortex* durante 5 min, em temperatura ambiente. A seguir, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 rpm, 10 min, 4°C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo igual volume de clorofórmio e agitado em *vortex* rapidamente para homogeneização. Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 rpm, 10 min, 4°C. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M, mantido a 4°C por 2 h e coletados a 10.000 rpm, 10 min, 4°C. Os precipitados contendo os ácidos nucleicos foram solubilizados em 300 μL de água tratada com DEPC e novamente precipitados com 30 μL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 750 μL de etanol absoluto gelado a 4°C, 5 min. Os RNAs totais foram coletados a 10.000 rpm, 10 min, 4°C, lavados duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a 10.000 rpm, 10 min, 4°C, secos, dissolvidos em 50 a 100 μL de água. Todas as soluções utilizadas foram preparadas com água previamente tratada com DEPC e todas as centrifugações foram feitas usando centrífuga de bancada. A concentração do RNA foi determinada por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640 e sua pureza analisada através da relação de absorvâncias 260/280 nm.

3.10.2 Ensaio de *Northern blot*

A análise por *Northern blot* foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Para isto, aproximadamente 15 µg de cada amostra de RNA total foi previamente desnaturada em tampão de desnaturação (formamida deionizada 50%, formaldeído 20%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,025%, brometo de etídeo 0,05 µg/mL) a 65°C durante 10 min. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído 0,6 M a 65 V por aproximadamente 4 h em tampão MOPS 1X (MOPS 20 mM, acetato de sódio 5 mM, 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, citrato de sódio 30 mM, pH 7,0) durante a noite. Após esta etapa, os RNAs foram fixados na membrana por *crosslinking* (Ultraviolet Crosslinker UVP mod. CL1000) durante 2 min e, em seguida, a membrana foi lavada três vezes por 20 min com solução tampão SSC 2X. Após as lavagens, a membrana foi pré-hibridizada a 42°C, por no mínimo 2 h com 6 mL da solução *ULTRAhyb*TM (Ambion) em forno de hibridização Hybaid contendo a sonda de DNA específica. As sondas foram marcadas radiativamente com α[³²P]dATP por *random priming* utilizando o kit *NEBlot*TM (Biolabs) e, em seguida, purificadas por filtração em resina Sephadex G-50 (Sigma) equilibrada em tampão NT (Tris-HCl 1 mM, pH 8,0, NaCl 1 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) a fim de eliminar os nucleotídeos não incorporados. Em seguida, as sondas foram desnaturadas a 100°C durante 10 min e aproximadamente 400 µL das sondas desnaturadas (cerca de 10⁷ cpm total) foi adicionado à solução de pré-hibridização *ULTRAhyb*TM (Ambion). A hibridização foi realizada a 42°C durante a noite. Após a hibridização, a membrana foi lavada em diferentes condições de estringência em solução SSPE (NaCl 0,3 M, NaH₂PO₄ 20 mM, EDTA 2 mM, pH 7,4) + SDS antes de ser exposta a filmes radiográficos (Kodak T-Mat G/RA).

Condições de lavagem:

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

3.11 Oligonucleotídeos utilizados para amplificação das ORFs

As sequências dos oligonucleotídeos foram desenhadas para a amplificação das ORFs NCU06205 (*rco-1*), NCU06842 (*rcm-1*) e NCU09739 baseadas nas sequências nucleotídicas das ORFs depositadas no banco de dados do genoma de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) e adicionados de sítios para as enzimas de restrição *NdeI*, *XhoI*, *NheI*, *EcoRI* e *BamHI* para posterior subclonagem das mesmas no vetor de expressão pET28a (Novagen). Estes mesmos primers foram usados no PCR para confirmação dos nocautes gênicos. Os pares de oligonucleotídeos utilizados estão representados no Quadro 1.

Quadro 1 - Oligonucleotídeos usados para a confirmação dos nocautes gênicos e para a clonagem molecular.

ORF	PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO
NCU06205 (<i>rco-1</i>)	Nc6205-F: 5'- CATATg TCCATgTATCCgCACCG-3'	<i>NdeI</i>
	Nc6205-R: 5'- CTCgAg CTATATCCgAgAgTAAgACC-3'	<i>XhoI</i>
NCU06842 (<i>rcm-1</i>)	**Nc6842-F: 5'- gCTAg CATggCAAACCACCACCCTTC-3'	<i>NheI</i>
	**Nc6842-R: 5'- CTCgAg TCAAgCgggACCACgAAAgggCTC-3'	<i>XhoI</i>
NCU09739	Nc9739-F: 5'- CATATg TCAgggCAggAAggC-3'	<i>NdeI</i>
	Nc9739-R: 5'- gAATTC CTACACCACAgCCTCCAAC-3'	<i>EcoRI</i>
	**Nc9739R: 5'- ggATCC CTACCAgTCATCgATCgATTTgg-3'	<i>BamHI</i>

**oligonucleotídeos desenhados para a produção da proteína truncada. Os códons de iniciação (AUG) e de término (UAG e UGA) da síntese proteica estão sublinhados nas sequências. Os sítios para as enzimas de restrição encontram-se em negrito.

3.12 Extração de DNA genômico e confirmação dos nocautes gênicos

3.12.1 Extração de DNA genômico de *N. crassa*

O DNA genômico foi extraído de micélio obtido a partir da linhagem selvagem e das linhagens mutantes do fungo, após crescimento vegetativo a 30°C, 250 rpm por 24 h, baseado no protocolo descrito por Weiland (1997). Para isto, uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizado em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para microtubo contendo uma

mistura de 500 μ L de tampão de extração de DNA genômico (Tris-HCl 200 mM, pH 8,0, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0, SDS 1%) e 500 μ L de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e homogeneizado em *vortex*. Foi feita uma centrifugação a 16.000 x g, 10 min, 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo 50 μ L de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 950 μ L de isopropanol, precipitado a -80°C por 30 min ou -20°C por 2 h e centrifugado a 16.000 x g, 10 min, 4°C. O precipitado foi ressuspenso em 100 μ L de água e digerido com uma solução contendo RNase A (10 mg/mL) a 37°C por 30 min. Uma nova extração foi realizada com 200 μ L de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, na proporção 25:24:1, homogeneizado em *vortex* e centrifugado a 16.000 x g, 10 min, 4°C. A fase aquosa foi recolhida em novo microtubo e uma precipitação foi realizada a baixa temperatura com 40 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 750 μ L de etanol absoluto gelado. O precipitado foi coletado por centrifugação a 16.000 x g, 10 min, 4°C, lavado três vezes com 700 μ L de etanol 70%, seco ao ar, e ressuspenso em 50 a 100 μ L de água. A pureza das amostras foi analisada em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640, através da relação das absorbâncias 260/280 nm.

3.12.2 Confirmação dos nocautes gênicos por PCR

A confirmação dos nocautes foi realizada devido ao fato de que as linhagens mutantes não foram construídas em nosso laboratório, portanto, tornou-se necessário confirmar o nocaute gênico somente nas linhagens *rco-1*^{KO} e NCU09739^{KO}, uma vez que a ORF NCU06842 foi inativada pelo processo de RIP.

Após extração do DNA genômico das linhagens mutantes e selvagem (FGSC#9718) foram realizadas PCRs utilizando combinações dos oligonucleotídeos F e R específico de cada ORF em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Para um volume final de 50 μ L de reação foi utilizado 1 μ L de DNA genômico (1 μ g/ μ L), 0,5 μ L (1,25 U) da enzima *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes), 1 μ L dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/ μ L), 10 μ L de 5x *Phusion Buffer GC*, 1 μ L de dNTP (10 mM cada) e 1,5 μ L de DMSO. A mistura foi homogeneizada e submetida a PCR, nos seguintes ciclos:

- *rco-1* - 98°C/30 seg; 98°C/10 seg, 61°C/30 seg, 72°C/1 min e 30 seg por 35 ciclos; 72°C por 10 min.

- ORF NCU09739 - 98°C/30 seg; 98°C/10 seg, 64 e 70°C/ 30 seg, 72°C/1 min e 30 seg por 35 ciclos; 72°C por 10 min.

As reações para cada ORF foram realizadas concomitantemente com os DNAs genômicos da linhagem selvagem e mutante. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris-HCl 400 mM, pH 8,0, ácido acético glacial 200 mM, EDTA 10 mM), contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL, e a imagem capturada pelo sistema de fotodocumentação.

3.13 Clonagem das ORFs por RT-PCR

O gene *rco-1* foi amplificado com o objetivo de produzir a proteína inteira com 604 resíduos de aminoácidos, contendo o domínio Tup_N na porção N-terminal e os sete domínios WD na porção C-terminal existentes na proteína. O gene *rcm-1* foi amplificado com o objetivo de produzir uma proteína na forma truncada na região C-terminal, contendo apenas os 504 resíduos de aminoácidos da região N-terminal, a qual contém o domínio TPR de interação proteína-proteína. A ORF NCU09739, que codifica uma proteína hipotética, foi amplificada para produzir uma proteína na forma truncada na região C-terminal, contendo apenas os 329 resíduos de aminoácidos da região N-terminal, contendo o domínio de ligação ao DNA.

O isolamento dos cDNAs correspondente aos genes *rco-1* e *rcm-1* e da ORF NCU09739 foi realizado por RT-PCR a partir do RNA total. Inicialmente, cerca de 6 µg do RNA total da linhagem selvagem do fungo foi tratado com a enzima DNase RQ1 RNase-Free DNase (Promega) conforme instruções do fabricante, a fim de eliminar contaminações por DNA genômico. Em seguida, a síntese da primeira fita de cDNA (sscDNA) foi efetuada utilizando o oligonucleotídeo oligo-dT (Invitrogen) e o kit comercial *Superscript® III First-strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas utilizando combinações dos oligonucleotídeos F e R em um volume final de 50 µL. Foi utilizado 2 µL de sscDNA, 0,5 µL (1,25 U) da Enzima *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 10 µL de *5x Phusion Buffer GC*, 1 µL de dNTP (10 mM cada) e 1,5 µL de DMSO. Os ciclos da PCR foram:

- *rco-1* - 98°C/30 seg; 98°C/10 seg, 61°C/30 seg, 72°C/1 min e 15 seg por 35 ciclos; 72°C por 10 min.
- *rcm-1* - 98°C/30 seg; 98°C/10 seg, 78,8°C/30 seg, 72°C/1 min e 25 seg por 35 ciclos; 72°C por 10 min.
- ORF NCU09739 - 98°C/30 seg; 98°C/10 seg, 62,5°C/30 seg, 72°C/1 min e 15 seg por 35 ciclos; 72°C por 10 min.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (Tris-HCl 400 mM, pH 8,0, ácido acético glacial 200 mM, EDTA 10 mM), contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL, e em seguida, os fragmentos de tamanhos esperados foram excisados do gel e purificados utilizando o kit GeneClean II (BioMP). Após purificação, foi feita a ligação dos fragmentos no vetor pMOS-Blue (*Blunt Ended PCR Cloning* kit, GE Healthcare), nas concentrações indicadas pelo kit, a uma temperatura de 22°C por 16 h e os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* DH10B. Após transformação, a seleção dos transformantes foi feita através do plaqueamento em meio de cultura 2YT sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, na presença de 40 µg de uma solução de X-GAL (40 mg/mL). As colônias brancas resultantes do crescimento foram inoculadas em meio 2YT líquido contendo glicose e submetidas à extração do DNA plasmidial. As diferentes construções plasmidiais foram confirmadas inicialmente por análise de restrição. Células dos clones positivos foram armazenadas à -80°C como cultura permanente em glicerol 16% estéril.

3.14 Mini-extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de *boilling prep* descrito por Holmes e Quigley (1981). As colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + glicose 0,2% e crescidas a 37°C durante uma noite, em seguida, cerca de 3 mL da cultura de células foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e coletadas duas vezes através de centrifugação a 13.000 rpm, 2 min. 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 seg, e em seguida, centrifugada a 13.000 rpm, 15 min, 4°C.

Com uso de palitos de dente, o precipitado foi retirado e descartado, sendo os ácidos nucleicos 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 13.000 rpm, 10 min, 4°C. O precipitado foi dissolvido em 100 μL de água pura e acrescentou-se 100 μL de fenol saturado com tampão. Esta mistura foi vigorosamente agitada em *vortex* e, posteriormente, centrifugada a 13.000 rpm, 10 min, 4°C. Um volume de 90 μL da fase aquosa foi transferido para um microtubo novo e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 μL de acetato de amônio 7,5 M e 300 μL de etanol absoluto gelado a -80°C por 15 min. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 800 μL de etanol 70% gelado (13.000 rpm, 5 min, 4°C). O DNA foi dissolvido em 20 μL de água após secagem por aproximadamente 15 min ao ar.

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

Para o preparo das células competentes da linhagem DH10B de *E. coli*, células não competentes foram rejuvenescidas em 5 mL de meio 2YT e incubadas a 37°C, 250 rpm, durante uma noite. Após a obtenção de células jovens, 500 μL deste crescimento foram inoculados em 100 mL de meio 2YT e a cultura incubada a 37°C, 250 rpm até uma densidade óptica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) estéreis a 700 x g, 4°C, 15 min, em microcentrífuga de mesa. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de 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. O preparo de células competentes produtoras de *E. coli* linhagens BL21(DE3)pLys-S, Rosetta(DE3)pLys-S e ArcticExpress(DE3) foi conduzido da mesma maneira.

Para a transformação, 5-10 μL da reação de ligação de cada uma das construções foram incubados em gelo por 30 min com 100 μL de células competentes. Em seguida, as suspensões foram submetidas ao choque térmico pela transferência para um banho a 42°C, 2 min. Após o choque térmico, 400 μL de meio 2YT foram adicionadas as suspensões e estas foram incubadas a 37°C, 60 min. Após este período as células foram plaqueadas em meio 2YT contendo o antibiótico específico.

3.16 Ensaios de produção e purificação das proteínas recombinantes

As proteínas RCO-1, RCM-1 e a truncada codificada pela ORF NCU09739 foram produzidas na forma recombinante, fusionadas a uma cauda de poli-His na região N-terminal e purificadas através de cromatografia de afinidade, utilizando Ni⁺² e/ou Co⁺². Para isto, as ORFs foram primeiramente subclonadas no vetor de expressão pET28a, as construções foram utilizadas para transformar células de *E. coli* produtoras competentes e as proteínas recombinantes foram induzidas na presença de IPTG.

3.16.1 Subclonagem das ORFs em vetor de expressão

O vetor de expressão utilizado foi o pET28a, o qual produz a proteína fusionada a uma cauda de seis resíduos de histidina. Os insertos existentes nas construções plasmidiais pMOS-*rco1*, pMOS-*rcm1* e pMOS-9739 foram transferidos para o vetor de expressão, conforme descrito abaixo.

O cassete de DNA do gene *rco-1* de 1.815 pb foi retirado da construção pMOS-*rco1* por digestão com as enzimas *NdeI* e *XhoI*. Como essa ORF possui um sítio de *NdeI* no meio da sequência, a transferência para o vetor de expressão pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas foi realizado em duas etapas. Primeiramente, isolou-se o fragmento maior contendo 1.400 pb usando as enzimas *NdeI* e *XhoI*, e este foi inserido no vetor de expressão pET28a. Em uma segunda etapa, o fragmento menor contendo 415 pb também foi retirado da construção pMOS-*rco1* usando apenas a enzima *NdeI* e inserido na construção pET28a contendo o fragmento de tamanho maior (1.400 pb) e aberto com a mesma enzima, resultando na construção pET28a-*rco1*. Todas as clonagens foram verificadas por análise de restrição.

O inserto *rcm-1* de 1.515 pb foi retirado da construção pMOS-*rcm1* por digestão com as enzimas *NheI* e *XhoI* e inserido no vetor de expressão pET28a digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pET28a-*rcm1*.

O inserto da ORF NCU09739 (990 pb) foi retirado da construção pMOS-9739 por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e transferido para o vetor de expressão pET28a, previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pET28a-9739.

Os produtos de ligação foram usados para transformar células de *E. coli* DH10B. A seleção dos transformantes foi realizada através do plaqueamento em

meio de cultura 2YT + glicose 0,2%, suplementado com canamicina 30 µg/mL (marca de seleção do plasmídeo pET28a). Após a extração do DNA plasmidial seguida de uma análise de restrição, os clones positivos foram confirmados por sequenciamento de DNA. Culturas permanentes dos clones positivos foram realizadas e armazenadas a -80°C.

3.16.2 Ensaio de indução protéica e análise de solubilidade

Os DNAs plasmidiais das construções pET28a-*rco1*, pET28a-*rcm1* e pET28a-9739 foram utilizados para transformar células competentes de três linhagens produtoras diferentes de *E. coli*: linhagem BL21(DE3)pLys-S, linhagem Rosetta(DE3)pLys-S e linhagem ArcticExpress(DE3). A seleção dos transformantes foi realizada em meio de cultura 2YT + glicose 0,2%, contendo canamicina 30 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL para as células produtoras BL21(DE3)pLys-S e Rosetta(DE3)pLys-S; e canamicina 30 µg/mL, gentamicina 20 µg/mL e espectinomicina 75 µg/mL para as células produtoras ArcticExpress(DE3).

Como controle negativo dos ensaios de expressão, as células competentes das diferentes linhagens foram transformadas com o vetor de expressão pET28a vazio. Como controle positivo dos ensaios de expressão utilizando a linhagem *E. coli* BL21(DE)pLys-S foi usada a construção plasmidial pET28a-XAC2369, a qual expressa uma proteína de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* com aproximadamente 24 kDa. Como controle positivo dos ensaios de expressão utilizando as linhagens produtoras *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S e *E. coli* ArcticExpress(DE3) foi usada a construção pET28a-CopB, a qual também codifica uma proteína de *X. citri* com aproximadamente 55 kDa. As amostras controles foram ensaiadas paralelamente aos transformantes pET28a-*rco1*, pET28a-*rcm1* e pET28a-9739.

Para a identificação dos melhores clones produtores das proteínas recombinantes, colônias isoladas de cada transformação com as linhagens BL21 e/ou Rosetta foram utilizadas nos ensaios de produção das proteínas recombinantes. Pré-inóculos dos transformantes foram realizados em 5 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% e dos antibióticos adequados para cada linhagem produtora. Um mL de cada pré-inóculo fresco foi adicionado em 50 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% e dos respectivos antibióticos, a 37°C, 250 rpm até uma D.O._{600nm} de 0,6-0,8. Alíquotas de 2 mL de cada cultura foram coletadas (amostras não induzidas; NI), as

células foram isoladas por centrifugação a 13.000 rpm, 2 min, 4°C, e armazenadas. Ao restante das culturas foi adicionado IPTG numa concentração final de 0,1 - 0,4 mM e as proteínas recombinantes foram induzidas a 250 rpm, em diferentes tempos e temperaturas. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (20.000 rpm, 5 min, 4 °C) e armazenadas.

Para a identificação dos clones produtores de proteínas recombinantes a partir da linhagem *E. coli* ArcticExpress(DE3), a preparação do pré-inóculo foi realizada como descrito acima. Um volume do pré-inóculo foi adicionado em 50 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% e dos respectivos antibióticos, a 37°C, 250 rpm até atingir uma DO_{600nm} de 0,4-0,6. Alíquotas de 2 mL de cada amostra não induzida foram removidas (amostras NI) e as células foram coletadas por centrifugação e armazenadas. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG em uma concentração final de 0,1 - 0,4 mM e as proteínas recombinantes foram induzidas a 12°C, 200 rpm, 24 h e ao final da indução as células foram coletadas por centrifugação (20.000 rpm, 5 min, 4 °C) e armazenadas. Também foram testadas temperaturas de indução de 30 e 37°C.

Os precipitados de células foram ressuspensos em 4 mL de tampão de lise (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 20 mM, glicerol 5%, tween-20 0,5%, triton x-100 0,5%, acrescido de PMSF 1mM e benzamidina 10 mM). Posteriormente as células foram lisadas em sonificador (SONICS, Vibra Cell) com 3 pulsos de 30 seg e intervalos de 30 seg no gelo (amplitude 30%). O lisado celular foi centrifugado a 20.000 rpm, 20 min, 4°C e o sobrenadante recolhido em tubo limpo. O precipitado foi ressuspense em 2 mL do mesmo tampão de lise, assim como também as células não-induzidas (NI) foram ressuspensas em 300 µL deste tampão.

Após a quantificação de proteínas, pelo método de Hartree (1972) ou Bradford (kit Bio-Rad), aproximadamente 20 µg de cada uma das amostras NI (não-induzida), S (sobrenadante), P (precipitado) e controles foram separados por SDS-PAGE 12% (LAEMMILI, 1970). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, 200 V, 50 min, no sistema de eletroforese vertical Mini-Protean III (Bio-Rad) e o gel corado com Coomassie-Blue Brilliant R-250.

3.16.3 Análise da expressão das proteínas por *Western Blot*

Para a confirmação da produção das proteínas recombinantes, ensaios de *Western blot* foram realizados. Após o fracionamento por eletroforese, as proteínas

foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um sistema Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell (BioRad) usando um tampão de transferência (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicina 150 mM, 200 mL/L de metanol) durante 2 h, 100 V, 250 mA. A membrana foi então incubada com uma solução de 6% de leite em pó desnatado em tampão 1X TBST (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 500 mM, tween-20 0,05%) com suave agitação durante 2-16 h para permitir o bloqueio da mesma. Após este período, a membrana foi lavada com 1X TBST (3 vezes, 5 min) e incubada com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1:10.000 em 1X TBST + 3% leite) por 2 h à temperatura ambiente com agitação, para a detecção de proteínas fusionadas à poli-His (construções baseadas no vetor pET28a). Em seguida, as membranas foram novamente lavadas três vezes com 1X TBST e procedeu-se a revelação em 10 mL de tampão bicarbonato (NaHCO₃ 100 mM, MgCl₂ 1 mM, pH 9,8) adicionado de 100 µL NBT (cloreto p-nitrozul de tetrazólio) (30 mg/mL em 70% DMF) e 100 µL BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina) (15 mg/mL em DMF).

3.16.4 Produção e purificação das proteínas recombinantes em pequena escala

Para a purificação em pequena escala, as melhores condições de produção das proteínas recombinantes padronizadas foram mantidas. A produção para todas as proteínas foi realizada em frascos *Erlenmeyers* de 1 L contendo 200 mL de meio de produção. Após o período de indução, as células foram coletadas a 10.000 rpm, 4°C, 10 min em centrífuga Beckman e suspensas em 2 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, Imidazol 20 mM, glicerol 10%, Triton X-100 0,01%) acrescido de uma mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,05 mM, benzamidina 1 mM, antipaína 5 µg/mL, pepstatina A 1 µg/mL e TLCK 10 µg/mL). As células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N₂ líquido e água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonicador, após 5 ciclos de 10 seg, com intervalos de 1 min em banho de gelo. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 14.000 rpm, 4°C, 20 min e o sobrenadante contendo a proteína recombinante na forma solúvel foi coletado e submetido a uma cromatografia de afinidade em bancada, usando resina de Ni⁺² ou Co⁺². Ao precipitado foi adicionado 1 mL do mesmo tampão de lise acrescido de

inibidores de protease, o qual foi reservado para análise de SDS-PAGE (amostra P). Antes de seguir com a purificação da proteína recombinante contida no sobrenadante, uma alíquota foi reservada para a análise por SDS-PAGE (amostra S).

As proteínas recombinantes contidas no sobrenadante (2 mL) foram inicialmente incubadas com 200 μ L da resina Ni²⁺-NTA-agarose (Qiagen), previamente condicionada em tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10% v/v) contendo os inibidores de proteases (PMSF 0,05 mM, benzamidina 1 mM, antipaína 5 μ g/mL, pepstatina A 1 μ g/mL e TLCK 10 μ g/mL) por 2 h, 4°C, suave agitação. Após o período de incubação, o sobrenadante (amostra FT1 – *flow through*) foi removido por centrifugação a 5000 x g, 2 min, 4°C. A resina contendo a proteína recombinante foi lavada 5 x com tampão de lavagem gelado acrescido de inibidores de proteases e todas as lavagens foram coletadas e combinadas em uma única fração (FT2 – *flow through*) para verificar uma possível perda da proteína recombinante durante a etapa de lavagem. Depois de lavada a resina, as proteínas foram eluídas 2 x em 300 μ L tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol 10%, PMSF 0,05 mM, benzamidina 1 mM, antipaína 5 μ g/mL, pepstatina A 1 μ g/mL e TLCK 10 μ g/mL) contendo 100, 200 e 300 mM de imidazol, respectivamente (frações E1, E2 e E3), totalizando 600 μ L para cada fração.

Células de *E. coli* transformadas com a construção pET28a-*rco1* também foram submetidas a uma cromatografia de afinidade em bancada utilizando 120 μ L da resina His-Select Cobalt Affinity Gel (Sigma). O procedimento da cromatografia com resina de Co⁺² foi o mesmo adotado para a resina contendo Ni⁺². Todas as frações foram quantificadas e analisadas em SDS-PAGE 12%.

3.16.5 Purificação em escala maior

As culturas celulares submetidas à purificação em escala maior foram crescidas em 500 mL a 1 L de meio 2YT + glicose 0,2%, contendo antibiótico apropriado. O precipitado das células foi ressuspenso em 50 mL de tampão de lise acrescentado de uma mistura de inibidores de protease (PMSF 1 mM e benzamidina 25 mM). O tampão Tris (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, imidazol 50-100 mM, glicerol 10%, triton X-100 0,5%, tween-20 0,5%) foi utilizado na purificação da proteína His::RCO1 e His::9739, e o tampão Hepes (Hepes 50 mM, pH 7,9, NaCl

500 mM, imidazol 150 mM, glicerol 10%, triton X-100 0,5%, tween-20 0,5%) na purificação da proteína His::RCM1. O rompimento celular foi realizado em sonicador (SONICS, Vibra Cell) com 10 pulsos de 30 seg e intervalos de 1 min no gelo (amplitude 50%) e o sobrenadante foi recolhido após centrifugação (20.000 rpm, 4°C, 20 min). As proteínas recombinantes contidas no sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel HisTrap (1 mL) (GE Healthcare) no aparelho de purificação Akta Prime (GE Healthcare).

As proteínas fusionadas a histidina foram eluídas em um gradiente linear de concentração de imidazol preparado no mesmo tampão de homogeneização sem os detergentes. A proteína His::RCO1 foi eluída em um gradiente linear de 100 mM a 1 M de imidazol, a proteína His::RCM1 em um gradiente 150 mM a 1 M e a proteína His::9739 em um gradiente 50 mM a 1 M. Os produtos purificados foram analisados em SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) e a eletroforese foi realizada à temperatura ambiente, 200 V, 1 h, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

Para a síntese de anticorpo, a proteína His::RCO1 foi diluída com tampão (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 300 mM, glicerol 10%), concentrada em Amicon Ultra Centrifugal Filters 30.000 MWCO (Millipore) e enviada para a produção de anticorpo. Para o ensaio de EMSA as proteínas recombinantes foram dialisadas em tampão de diálise (Tris 10 mM ou HEPES 15 mM, pH 7,9, KCl ou HCl 100 mM, EDTA 1mM, DTT 0,5 mM, glicerol 10%) por 16 h, com duas trocas deste tampão. As proteínas dialisadas foram centrifugadas (14.000 rpm, 4°C, 20 min) para a remoção de eventuais precipitados. Todas as frações foram quantificadas por Hartree (1972), aliqüotadas e armazenadas a -80°C.

3.17 Análise da ligação DNA-proteína por EMSA

Os ensaios de EMSA, também conhecido como ensaio de mobilidade em gel, foram realizados com as proteínas recombinantes (cofatores) His::RCO1 e His::RCM1, juntamente com a proteína fator de transcrição His::CRE1 (CUPERTINO, 2011) de *N. crassa*. Neste ensaio, fragmentos de DNA marcado (sonda) do promotor *gsn* foi testado quanto à capacidade de ligação das proteínas.

3.17.1 Preparo e marcação da sonda de DNA

A sonda radiativa correspondente ao fragmento de DNA a ser analisada foi obtida por PCR, utilizando os *primers* GSN-FP4 5'-CTgATTgggAAAggTCAgA-3' e

GSN-RP2 5'-gTTAACgCAggTCAACAg-3', os quais amplificam um fragmento de DNA de 377 pb do promotor *gsn* contendo dois *motifs* 5'-SYGGRG-3' correspondentes ao sítio de ligação do fator de transcrição CreA de *A. nidulans* e um *motif* 5'-GGGG-3' correspondente ao sítio de ligação do fator de transcrição Mig1 de *S. cerevisiae*. Esse fragmento amplificado foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI, liberando um fragmento de 134 pb, o qual foi utilizado como sonda.

Para a amplificação da sonda foi utilizado como molde o clone plasmidial IV9A-1 (*GenBank* # AF417205) que contém a sequência 5'-flanqueadora do gene *gsn*, disponível no laboratório. As reações de amplificação foram realizadas utilizando 1,0 µg DNA, 0,5 µL de enzima *Taq* Polimerase (Invitrogen), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão de PCR 10x, 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP (10 mM) e 0,5 µL de α-[³²P]dATP (10⁴ cpm). Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96°C/1 min), anelamento (52°C/1 min) e extensão (72°C/1 min), por 39 ciclos, em um volume final de 50 µL de reação. O fragmento de DNA amplificado foi inicialmente precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, 1/10 de glicogênio 20% e isopropanol e mantido a -80°C. Após centrifugação (14.000 rpm, 30 min, 4°C) e lavagem com etanol 70%, o precipitado foi ressuspenso em 50 µL de água e digerido com *Bam*HI.

Para a purificação da sonda, o fragmento digerido foi separado em *low melting point* (Sigma) agarose 2% em TAE 1X, excisado do gel e transferido para microtubo de 1,5 mL, o qual foi aquecido a 70°C, 15 min, para o derretimento do gel. Adicionou-se ao tubo 200 µL de fenol, o qual foi rapidamente homogeneizado em *vortex* por 30 seg. O tubo foi centrifugado a 13.000 rpm, 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e adicionado de 500 µL de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Foi feita uma nova centrifugação a 13.000 rpm, 5 min, temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o fragmento de DNA precipitado com 1/10 volume de acetato de sódio 3 M, pH 5,2, 10 µL glicogênio 20% e 1 mL de etanol absoluto gelado. O tubo foi deixado a -80°C durante uma noite e centrifugado (14.000 rpm, 30 min, 4°C). O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco ao ar e ressuspenso com aproximadamente 50 µL de água. Após total ressusensão, a radiatividade incorporada à sonda foi medida por cintilação líquida em cintilador Beckman LS

6500. A concentração do DNA foi determinada por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640.

3.17.2 Ensaio de mobilidade em gel

A interação DNA-proteína foi realizada em 16 μ L de um tampão de ligação 1X (Hepes 125 mM, pH 7,9, KCl 100 mM, EDTA 0,5 mM, pH 8,0, glicerol 50% v/v) contendo uma mistura de inibidores de protease (DTT 0,05 mM, PMSF 0,025 mM, benzamidina 5 μ g/mL, antipaína A 5 μ g/mL, pepstatina 5 μ g/mL, NaF 5 μ g/mL), 2 μ g/reação de poli(dI-dC)•(dI-dC) (GE Healthcare) como competidor inespecífico e aproximadamente 20 μ g das proteínas recombinantes His::RCO1, His::RCM1 e His::CRE1 purificadas. Na primeira etapa da reação, diferentes combinações das proteínas (20 μ g) foram incubadas em tampão de ligação, acrescido de inibidores de proteases e poli(dI-dC)•(dI-dC) e mantidas em contato por 30 min a temperatura ambiente: CRE1, RCO1, RCM1, CRE1+RCO1, CRE1+RCM1, RCO1+RCM1, CRE1+RCO1+RCM1. Em seguida, foi adicionado 0,34 μ g de sonda marcada (5×10^3 cpm) em cada reação e mantidas por 20 min à temperatura ambiente. Após incubação com a sonda, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de poli(acrilamida 5% (29:1) não desnaturante, em tampão TBE 0,5X (300 V, 10 mA, 10°C). O gel foi seco e exposto ao filme Kodak T-Mat G/RA.

3.18 Análise computacional dos fatores/cofatores de transcrição

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

clássicos (NLS) foram determinadas utilizando a ferramenta PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp/form2.html>).

As sequências polipeptídicas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta Blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para o alinhamento múltiplo das sequências polipeptídicas das proteínas de interesse e dos ortólogos funcionais caracterizados em outros organismos foi utilizado o programa ClustalW server (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) e os resíduos de aminoácidos idênticos e conservados foram identificados por *Boxshade* 3.21 no site *Box Shade Server* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

4. Resultados e Discussão

A seção Resultados e Discussão foi dividida em duas partes, uma vez que o trabalho possui dois grandes objetivos: caracterização do fator de transcrição hipotético 9739 e dos cofatores transcripcionais RCO-1 e RCM-1 (Parte 1), e estudos de correlação entre metabolismo de glicogênio e relógio biológico em *N. crassa* (Parte 2).

PARTE 1 - Caracterização dos fatores/cofatores de transcrição

4.1 Descrição das linhagens

A linhagem mutante na ORF NCU06205 (FGSC#11371) corresponde à linhagem nocauteada no gene *rco-1* (*r*egulator of *c*onidiation-1), o qual codifica para uma proteína repressora transcricional ortóloga à Tup1 de *S. cerevisiae* (YAMASHIRO et al., 1996). A linhagem mutante na ORF NCU06842 (FGSC#10215) corresponde à linhagem que sofreu o processo de RIP no gene *rcm-1* (*r*egulator of *c*onidiation and *m*orphology-1), o qual codifica para a proteína ortóloga à Ssn6 de levedura (KIM; LEE, 2005; OLMEDO et al., 2010) e a linhagem mutante na ORF NCU09739 (FGSC#11062) corresponde à linhagem nocauteada em um gene que codifica para uma proteína anotada no banco de dados de *N. crassa* como hipotética. A linhagem mutante na ORF NCU08807 (FGSC#10372) corresponde a linhagem nocauteada no gene *cre-1* (*c*arbon catabolite *r*egulation), o qual codifica para a proteína ortóloga a Mig1 de *S. cerevisiae* e a CreA de *A. nidulans* (SUN; GLASS, 2011) e será utilizada em ensaios com diferentes fontes de carbono. As linhagens mutantes nocauteadas foram construídas por meio da inserção, por recombinação homóloga, do gene *hph* (codifica para higromicina B fosfotransferase).

A linhagem FGSC#9718 (a, *mus-51::bar^r*) foi usada para a construção dos mutantes nocauteados e, em nossos experimentos, foi utilizada como linhagem selvagem para comparação com as linhagens mutantes.

4.2 Confirmação dos nocautes gênicos

Linhagens mutantes selecionadas para este trabalho correspondem a linhagens contendo genes alvo nocauteados através da inserção de uma marca de seleção por recombinação homóloga. Com o objetivo de verificar se essas linhagens

adquiridas pelo FGSC eram realmente mutantes nos genes de interesse, foi feita a confirmação do nocaute gênico. Para isso, foi realizada a extração do DNA genômico do micélio das linhagens mutantes (*rco-1*^{KO} e 9739^{KO}) e da linhagem selvagem (FGCS#9718) após crescimento vegetativo a 30°C, 24 h. O DNA genômico foi quantificado e a confirmação dos nocautes foi feita por PCR, utilizando paralelamente o DNA da linhagem selvagem como controle positivo.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Houve amplificação de ambas as ORFs na linhagem selvagem, contendo as regiões de éxons e íntrons, as quais geraram fragmentos de 2.176 pb correspondente ao gene *rco-1* e de 2.389 pb correspondente à ORF NCU09739.

A Figura 5A mostra a amplificação, somente na linhagem selvagem, de um fragmento de cerca de 2.389 pb correspondente a ORF NCU09739, confirmando o nocaute na linhagem 9739^{KO}. A amplificação desta ORF foi feita em duas diferentes temperaturas de *melting* (TM), 64°C e 70°C, sendo que a primeira foi usada devido à indicação do fabricante dos oligonucleotídeos em relação à temperatura de anelamento, e a segunda temperatura foi selecionada após a realização de reações de amplificação em um gradiente de temperatura (60°C até 74°C) para a fase de anelamento.

A Figura 5B mostra a amplificação de um fragmento de cerca de 2.176 pb correspondente ao gene *rco-1*, porém essa amplificação ocorreu tanto na linhagem selvagem quanto na linhagem mutante. Os fragmentos de 2.176 pb foram retirados do gel de agarose e purificados. Foram realizadas duas digestões com os fragmentos purificados, usando as enzimas de restrição *EcoRI* e *EcoRV*, liberando fragmentos correspondentes aos tamanhos de 812 pb e 1.364 pb, e as enzimas *BamHI* e *EcoRI*, liberando fragmentos correspondentes aos tamanhos de 247 pb, 396 pb e 1.533 pb. A digestão dos fragmentos correspondentes a ORF06205 foi observada somente na linhagem selvagem (Figura 5C), assim, confirmando o nocaute na linhagem *rco-1*. O nocaute na linhagem *cre-1*^{KO} já havia sido confirmado.

Confirmar os nocautes gênicos por PCR a partir do DNA genômico não é a técnica experimental mais correta, uma vez que pode apresentar falsos positivos, porém é a maneira mais fácil e rápida de verificarmos a ausência do gene de interesse nas linhagens mutantes. A maneira mais confiável de obter estes resultados seria por *Southern blot*, sendo uma técnica mais trabalhosa.

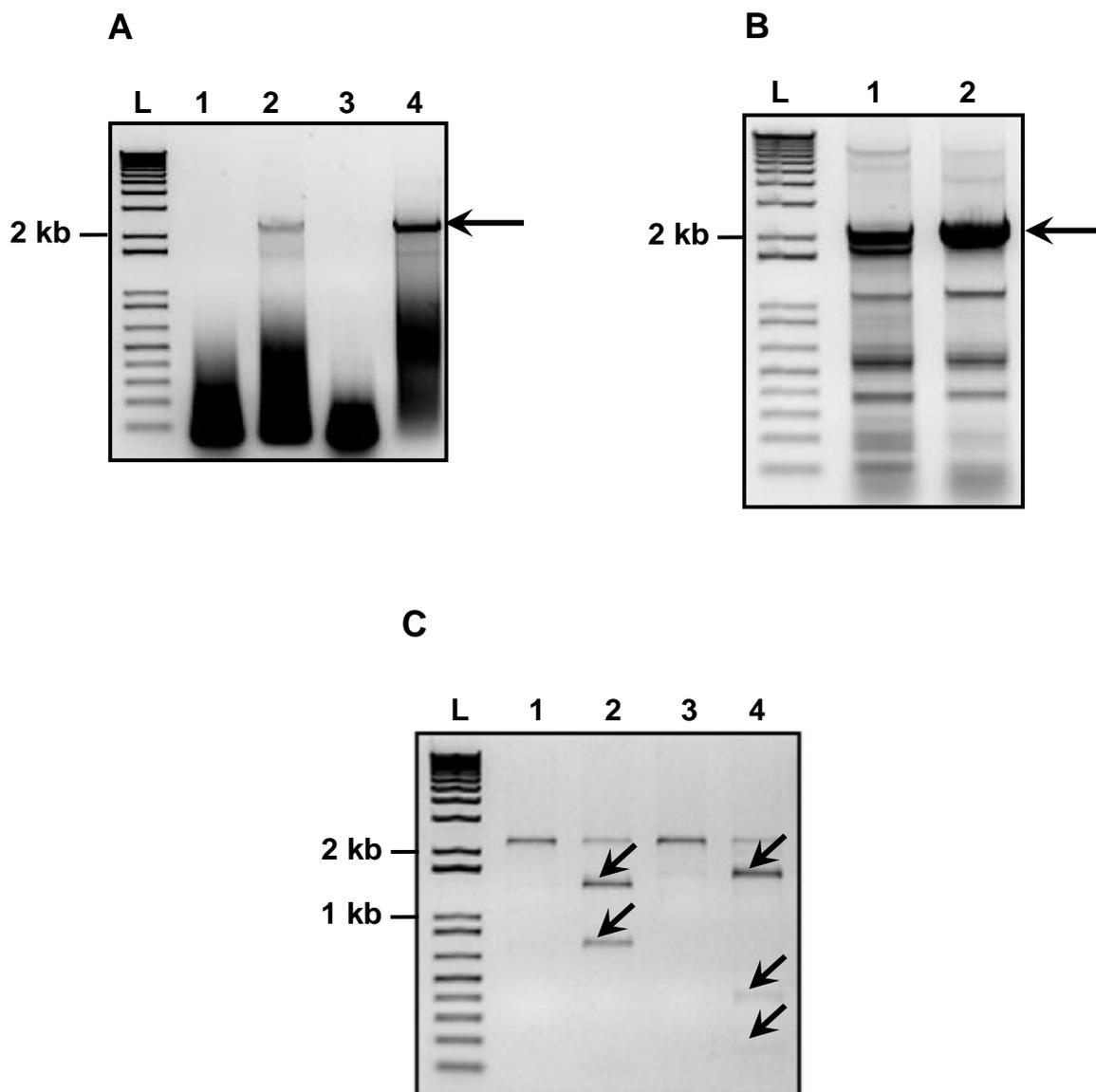


Figura 5- Amplificação de fragmentos correspondentes às ORFs a partir do DNA genômico das linhagens mutantes e selvagem. (A) Amplificação do fragmento correspondente à ORF NCU09739 contendo 2.389 pb. **1-** linhagem 9739^{KO}, TM de 64°C. **2-** linhagem selvagem, TM de 64°C. **3-** linhagem 9739^{KO}, TM de 70°C. **4-** linhagem selvagem, TM de 70°C. **(B)** Amplificação do gene *rco-1* contendo 2.176 pb. **1-** linhagem *rco-1*^{KO}. **2-** linhagem selvagem. **(C)** Análise de restrição dos fragmentos amplificados das linhagens *rco-1*^{KO} e selvagem. **1-** Fragmento amplificado a partir de DNA genômico da linhagem *rco-1*^{KO} digerido com as enzimas *EcoRI* e *EcoRV*. Presença do fragmento não digerido. **2-** Fragmento amplificado a partir de DNA genômico da linhagem selvagem digerido com *EcoRI* e *EcoRV*. Presença das duas bandas esperadas (812 pb e 1.364 pb), além da banda correspondente ao gene inteiro de 2.176 pb. **3-** Fragmento amplificado a partir de DNA genômico da linhagem *rco-1*^{KO} digerido com as enzimas *BamHI* e *EcoRI*. Presença do fragmento não digerido **4-** Fragmento amplificado a partir de DNA genômico da linhagem selvagem digerido com *BamHI* e *EcoRI*. Presença das três bandas esperadas (247 pb, 396 pb e 1.533 pb), além da banda correspondente ao gene inteiro. **L,** ladder de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

4.3 Análises morfológicas das linhagens mutantes

É de grande interesse investigar se a ausência dos fatores e cofatores de transcrição pode afetar o crescimento e morfologia das linhagens mutantes. Para tanto, foram feitas análises de crescimento, bem como verificação da produção de hifas aéreas, pigmentação, conidiação e extremidades das hifas.

4.3.1 Crescimento em meio sólido

A análise do crescimento das linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem, foi avaliada em frascos contendo meio VM sólido incubados a 30°C durante 3 dias em estufa. Em seguida, os frascos foram transferidos para temperatura e luminosidade ambiente por mais 5 dias. Após 8 dias foi avaliada a presença/ausência de hifas aéreas e pigmentação. Verificou-se que todas as linhagens mutantes apresentaram menor crescimento e aspecto diferente da selvagem (Figura 6). A linhagem selvagem (Figura 6A) apresentou maior crescimento, produção de hifas aéreas e marcante pigmentação alaranjada devido à presença de pigmentos carotenóides. A biossíntese de carotenóide é ativada pela luz (HARDING; TURNER, 1981), por isso os frascos são primeiramente mantidos em estufa, para crescimento das hifas, e depois mantidos em luminosidade ambiente, para síntese de carotenóide e consequente pigmentação alaranjada das hifas. A linhagem 9739^{KO} (Figura 6B) apresentou crescimento reduzido, baixa produção de hifas aéreas e pigmentação alaranjada clara. As linhagens *rco-1*^{KO} (Figura 6C) e *rcm-1*^{RIP} (Figura 6D) apresentaram crescimento muito reduzido, como um “tapete” na superfície do meio de cultura sólido, não produziram hifas aéreas e coloração diferente da apresentada pela linhagem selvagem (baixa produção de carotenóides).

Os conídios foram coletados destas linhagens após a análise do aspecto macroscópico. A suspensão conidial foi coletada em água destilada e filtrada com o auxílio de uma gaze estéril e os conídios contados em câmara de Neubauer. A linhagem selvagem apresentou um alto número de conídios, a linhagem 9739^{KO} apresentou baixo número e as linhagens *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP} não apresentaram conídios. Os nossos resultados confirmaram aqueles anteriormente descritos, o quais mostraram conidiação reduzida para a linhagem 9739^{KO} (COLOT et al., 2006), ausência de conidiação, morfologia das hifas alterada e taxa de crescimento

reduzida na linhagem mutante *rco-1* (YAMASHIRO et al., 1996) e ausência ou reduzida conidiação e perda de hifas aéreas na linhagem *rcm-1*^{RIP} (OLMEDO et al., 2010).

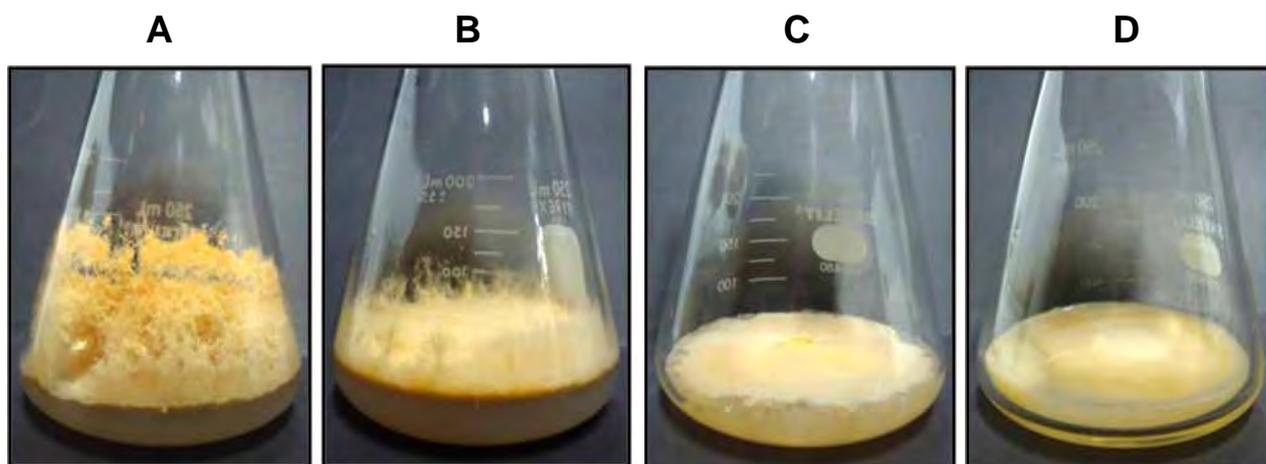


Figura 6- Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutantes em meio sólido. Conídios foram inoculados no centro do meio de cultura, as linhagens foram mantidas inicialmente a 30°C por 72 h e, posteriormente, à temperatura e luminosidade ambiente por mais 5 dias. **(A)** Linhagem selvagem (FGSC#9718), **(B)** 9739^{KO}, **(C)** *rco-1*^{KO}, **(D)** *rcm-1*^{RIP}.

4.3.2 Crescimento colonial e crescimento radial

Para a análise de crescimento colonial, os raios das colônias obtidas foram determinados para todas as linhagens mutantes, tendo como padrão o raio da colônia apresentado pela linhagem selvagem. Conídios foram inoculados no centro das placas e estas foram incubadas a 30°C por 24 h. Foram testados dois tipos de meio de cultivo (VM e VM suplementado com extrato de levedo 2%). *N. crassa* é um fungo filamentoso de cultivo bastante simples e tem como única exigência nutricional a biotina. O enriquecimento do meio VM com extrato de levedo teve como principal objetivo analisar a capacidade das linhagens mutantes em utilizar os nutrientes suplementados, uma vez que estes nutrientes, por se encontrarem no meio extracelular, estariam estimulando as células do fungo para a sua utilização. Os ensaios foram feitos em duplicatas biológicas e experimentais.

Imagens digitais das colônias foram adquiridas com o auxílio de uma máquina fotográfica e podem ser visualizadas na Figura 7, à esquerda. A análise de crescimento radial em meio VM e VM+YE é mostrada no Quadro 2 e revelou que todas as linhagens mutantes apresentaram menor crescimento comparado ao perfil apresentado pela linhagem selvagem na mesma condição.

Quadro 2 - Taxa de crescimento radial da linhagem selvagem e dos mutantes.

Linhagem	Crescimento Radial (cm/24 h)	
	30°C VM	30°C VM+YE
WT	4,13 ± 0,46	4,03 ± 0,72
9739 ^{KO}	1,84 ± 0,8	2,55 ± 0,48
<i>rco-1</i> ^{KO}	0,54 ± 0,18	0,65 ± 0,22
<i>rcm-1</i> ^{RIP}	0,5 ± 0,05	0,45 ± 0,14

A linhagem selvagem teve crescimento radial levemente maior no meio VM sem suplementação de extrato de levedo, porém em meio VM+YE houve um aumento das hifas aéreas (aspecto “plumoso”). Já a linhagem 9739^{KO} apresentou aumento das hifas radiais e aéreas ligeiramente maior em meio VM+YE. As linhagens *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP} apresentaram crescimentos similares nos dois meios de cultura, e muito inferior comparadas à linhagem selvagem (7-8 vezes menor que a linhagem selvagem). Também foi analisado o crescimento colonial das linhagens em temperatura em torno de 25°C, porém todas as linhagens tiveram maior crescimento a 30°C, independente no meio de cultura a qual foram inoculadas (dados não mostrados). Isto sugere que o aumento da temperatura de crescimento interfere diretamente na taxa metabólica do fungo, permitindo um melhor crescimento/desenvolvimento.

A Figura 7, à direita, mostra as extremidades das hifas das linhagens selvagem e mutantes quando analisadas em estereomicroscópio acoplado à câmara fotográfica, em um aumento de 8 vezes e escala de 100 µm. As imagens revelaram que o perfil das extremidades das hifas mostrado pela linhagem selvagem foi semelhante às demais linhagens, em todas as condições testadas, e somente a linhagem *rcm-1*^{RIP} revelou hifas mais densas em meio VM+YE.

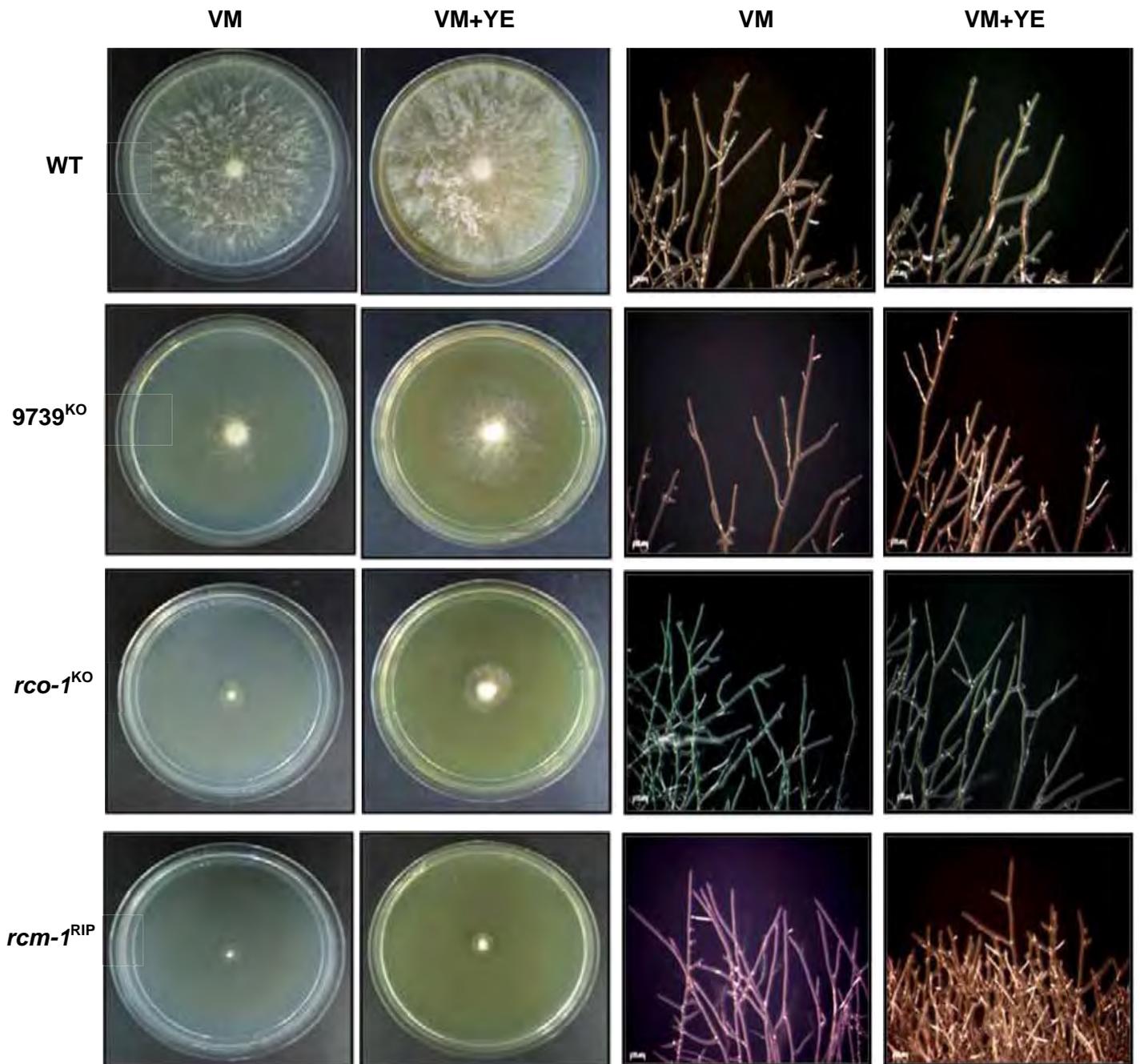


Figura 7- Análise da morfologia da colônia e crescimento radial e da extremidade das hifas nas linhagens selvagem e mutantes. Conídios foram inoculados no centro das placas contendo os meios de cultura VM e VM acrescido de extrato de levedo 2%, e as linhagens foram mantidas por 24 h a 30°C. **Esquerda**, visualização do crescimento radial de cada linhagem. **Direita**, visualização das extremidades das hifas analisadas em estereomicroscópio SteREO Discovery.V8, Zeiss acoplado à câmara fotográfica. Escala de 100 µm (aumento de 8x).

A partir dos resultados podemos observar que todas as linhagens mutantes apresentaram crescimento reduzido, baixa produção de hifas aéreas, alteração na pigmentação e conidiação. Os genes que codificam os fatores ou cofatores de transcrição, analisados neste trabalho, possivelmente exercem um importante papel no crescimento e desenvolvimento do fungo *N. crassa*.

4.4 Determinação do acúmulo de glicogênio e avaliação da expressão dos genes *gsn* e *gpn* nas linhagens

As linhagens do fungo foram avaliadas em relação aos seus conteúdos de glicogênio e expressão dos genes que codificam para a enzima glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*) por *Northern blot* e comparadas à linhagem selvagem, antes (30°C) e após choque térmico (45°C) em meio mínimo de Vogel (VM) líquido. Os micélios obtidos de cada linhagem, antes e após choque térmico, foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio. A dosagem de glicogênio foi feita por meio da determinação da glicose liberada pela digestão com amiloglicosidase e α -amilase, após precipitação do glicogênio com etanol. A quantidade foi expressa em relação à proteína total presente no extrato protéico. Os ensaios de choque térmico e determinação do conteúdo de glicogênio foram realizados em triplicatas biológicas e experimentais.

A quantificação do conteúdo de glicogênio pode ser observada na Figura 8A. Na linhagem selvagem houve uma redução do conteúdo de glicogênio após o choque térmico quando comparado à condição normal de crescimento. As linhagens mutantes *rco-1*^{KO}, *rcm-1*^{RIP} e 9739^{KO} apresentaram um perfil bem diferente do observado pela linhagem selvagem. A linhagem *rco-1*^{KO} apresentou maior acúmulo de glicogênio antes do choque térmico em relação à selvagem e praticamente não mostrou redução no acúmulo após choque térmico, se considerarmos o desvio padrão. Já as linhagens *rcm-1*^{RIP} e 9739^{KO} não apresentaram redução do nível de glicogênio após choque térmico, sendo os conteúdos antes e depois do choque térmico semelhantes. É importante observar o baixo acúmulo de glicogênio na temperatura normal de crescimento (30°C) nestas linhagens.

Todas as linhagens foram submetidas à análise da expressão do gene *gsn* (Figura 8B) e *gpn* (Figura 8C) por *Northern blot*, utilizando-se o RNA ribossômico 18S como controle endógeno. O objetivo deste experimento foi verificar se o padrão

de acúmulo de glicogênio antes e depois do choque térmico poderia ser correlacionado à expressão diferenciada dos genes *gsn* e *gpn*, bem como levantar hipóteses se o fator/cofator de transcrição ausente em cada linhagem mutante poderia estar envolvido na regulação da expressão dos mesmos e qual função poderiam estar desempenhando. O RNA total foi extraído de micélio, antes e depois do choque térmico e analisados por *Northern blot* utilizando como sondas um fragmento do gene *gsn* de 900 pb ou um fragmento do gene *gpn* de 798 pb marcadas radiativamente com α [³²P]dATP. Foram realizados triplicatas biológicas e experimentais, e ambos transcritos apresentaram tamanhos de aproximadamente 3 kb.

Pelos resultados observou-se que o perfil de expressão dos genes *gsn* e *gpn* foram semelhantes em todas as linhagens, diminuindo após choque térmico, como na linhagem selvagem. De Paula et al. (2002) e Freitas e Bertolini (2004) mostraram que a expressão do gene *gsn* é máxima em 24 h de crescimento e é drasticamente reduzida após choque térmico e esse perfil apresentado pela linhagem selvagem pode ser visto na Figura 8B. Entretanto, é importante salientar que as linhagens *rcm-1*^{RIP} e *rco-1*^{KO} apresentaram níveis maiores do que a linhagem selvagem, em ambas as condições, sendo muito maior na linhagem *rco-1*^{KO}. A linhagem mutante na ORF NCU09739 apresentou uma redução no transcrito *gpn* em comparação à selvagem, porém não houve uma correlação direta entre o baixo acúmulo de glicogênio, apresentado durante crescimento vegetativo e após choque térmico, com a expressão dos genes *gsn* e *gpn*. Provavelmente outros genes estariam participando na regulação do metabolismo de glicogênio na linhagem 9739^{KO}.

As proteínas RCO-1/RCM-1 de *N. crassa*, ortólogas a Tup1-Ssn6 de *S. cerevisiae*, são descritas como um possível complexo corepressor similar ao de levedura (OLMEDO et al., 2010). Levando em consideração estes dados, podemos sugerir, a partir dos nossos resultados, que tanto a proteína RCO-1 quanto a proteína RCM-1 possivelmente participam de um complexo funcional que reprimiria a expressão dos genes *gsn* e *gpn* de *N. crassa*. Assim, é sugestivo que a ausência do repressor transcricional RCO-1 na linhagem mutante *rco-1*^{KO} poderia estar provocando a elevação do acúmulo de glicogênio intracelular, conseqüentemente pela desregulação da expressão dos genes *gsn* e *gpn* (Figura 8B e 8C). Em relação a parceira RCM-1, o mutante *rcm-1*^{RIP} produz uma proteína RCM-1 truncada,

contendo apenas os 114 aminoácidos da região N-terminal. É importante salientar que a proteína truncada contém os 2 primeiros domínios TPR, de um total de 10, de interação proteína-proteína. Essa proteína truncada pode manter alguma atividade repressora residual, que poderia estar provocando o baixo acúmulo de glicogênio nos nossos experimentos. Também explicaria porque a expressão dos genes *gsn* e *gpn* não está tão desregulada quanto no mutante *rco-1^{KO}*. Olmedo et al. (2010) também observaram, em estudos de fotoadaptação, que o mutante *rcm-1^{RIP}* não apresentou acúmulo de transcritos de genes regulados por luz tão exacerbado quanto o mutante *rco-1^{KO}*, presumivelmente devido a alguma atividade residual da proteína RCM-1 truncada. A desregulação nos níveis dos transcritos *gsn* e *gpn* na linhagem *rcm-1^{RIP}* não está totalmente correlacionada ao baixo acúmulo de glicogênio apresentado antes e após choque térmico. Portanto outros genes estariam participando na resposta ao conteúdo de glicogênio nesta linhagem.

Os experimentos apresentados mostraram que os três genes codificam proteínas que além de atuarem no crescimento e desenvolvimento do fungo *N. crassa*, também estão envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio, muito provavelmente atuando na regulação da expressão dos genes *gsn* e/ou *gpn*, e também de outros genes. Os resultados motivam a realização de estudos mais detalhados destas proteínas a fim de obter uma melhor caracterização funcional destes fatores e cofatores de transcrição em relação ao papel na regulação da via metabólica do glicogênio.

4.5 Características bioquímicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU09739

A proteína hipotética codificada pela ORF NCU09739 é um fator de transcrição que apresenta um domínio clássico de ligação a DNA *zinc finger* do tipo Zn_2Cys_6 , do resíduo de aminoácido 7 ao 51 (Figura 9A). Um fator de transcrição do tipo Zn_2Cys_6 muito conhecido é o fator Gal4 de *S. cerevisiae* que é requerido para ativação transcricional de genes que codificam enzimas do metabolismo de galactose (BRANDEN; TOOZE, 1991). Essa proteína não possui sinal de localização nuclear clássico (NLS – *Nuclear Localization Signal*), o que seria esperado em se tratando de um fator de transcrição, entretanto isto não significa que esta proteína não possua outros NLS não clássicos. Além disso, a falta de NLS não afasta a

possibilidade de que a proteína seja transportada para o núcleo, pois ela pode ser transportada na forma de complexos proteicos. A Figura 9B mostra uma representação esquemática da forma truncada da proteína hipotética que foi produzida na forma recombinante neste trabalho.

A proteína codificada pela ORF NCU09739 não apresentou homologia a nenhuma proteína funcionalmente caracterizada em outros organismos, apenas com proteínas hipotéticas de outros fungos filamentosos. O Quadro 3 apresenta alguns dados bioquímicos obtidos por predição teórica da proteína estudada, como o tamanho do cDNA, número de resíduos de aminoácidos (AA), Massa Molecular (MM) e ponto isoelétrico (PI) estimado.

Quadro 3 - Dados bioquímicos do fator de transcrição codificado pela ORF NCU09739.

ORF	cDNA (pb)	AA	MM estimada (kDa)	PI estimado	Família
NCU09739	2.028	675	75,09	7,85	<i>zinc finger</i>
**NCU09739	990	329	36,26	9,04	Zn ₂ Cys ₆

**produção da proteína truncada

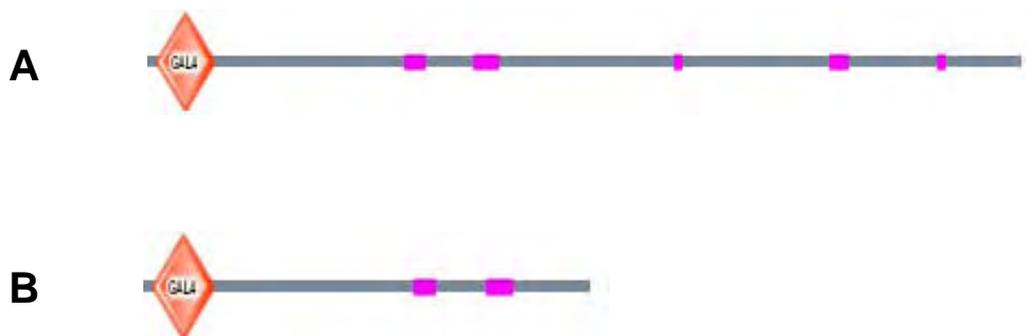


Figura 9- Representação esquemática do fator de transcrição hipotético. A ORF NCU09739 codifica uma proteína com domínio *zinc finger* do tipo Zn₂Cys₆ (Gal4-like) representado pelo losango em vermelho. As barras em rosa representam sequências com baixa complexidade. **(A)** Proteína hipotética inteira codificada pela ORF NCU09739. **(B)** Proteína hipotética 9739 truncada na região C-terminal (1-329 aa), de maneira a conservar a região do domínio de ligação ao DNA. Representação esquemática feita pelo servidor EMBL-SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

4.6 Análise da expressão do gene NCU09739

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que a proteína hipotética codificada pela ORF NCU09739 de *N. crassa* está diretamente envolvida no crescimento e no desenvolvimento do fungo, além de atuar na regulação do metabolismo de glicogênio e na expressão do gene *gpn*. Em função disto, foi realizada a análise da expressão do gene correspondente à ORF NCU09739 por *Northern blot*, utilizando-se o RNA ribossômico 18S como controle endógeno, em micélios da linhagem selvagem (FGSC#9718) coletados em diferentes tempos de crescimento vegetativo. Conídios da linhagem selvagem foram inoculados em um litro de meio VM, incubados a 30°C, 250 rpm e amostras foram coletadas após 8, 12, 24, 36, 48 e 72 h de inoculação. O RNA total foi extraído das diferentes amostras, quantificado e utilizado no ensaio de *Northern blot* utilizando como sonda um fragmento da ORF NCU09739 de 488 pb. O transcrito apresentou tamanho de aproximadamente 2 kb. Foram feitos dois ensaios experimentais e biológicos e também foi testada uma sonda de 990 pb, porém houve várias hibridizações inespecíficas. Este experimento foi realizado para verificar se havia a presença do transcrito e, como consequência, se o fator de transcrição seria sintetizado pelo fungo.

Os resultados mostraram (Figura 10) que o gene foi altamente expresso nas primeiras horas de germinação de 8 a 24 h. Os níveis do transcrito foram reduzidos após este tempo (tempo de formação da massa micelial) mostrando que a proteína provavelmente é requerida para o estágio inicial da germinação. O transcrito apresentou tamanho de aproximadamente 2 kb e a ORF NCU09739 possui 2.028 pb, ou seja, o tamanho do transcrito é quase do mesmo tamanho da ORF. Podemos levantar alguns questionamentos em relação ao produto da transcrição: o transcrito pode possuir regiões 5'- e 3'-UTR muito pequenas, levando em consideração o tamanho das regiões intergênicas 5'- e 3'-flanqueadoras do gene (Figura 11). A região intergênica *upstream* à ORF NCU09739 tem 1.394 nucleotídeos e compreende a região 3'-UTR do gene correspondente à ORF NCU09740, a região promotora e a 5'-UTR da ORF em questão. A região intergênica *downstream* à ORF NCU09739 possui somente 257 nucleotídeos e compreende as regiões 3'-UTR dos genes correspondentes às ORFs NCU09739 e NCU09738. Portanto, o gene

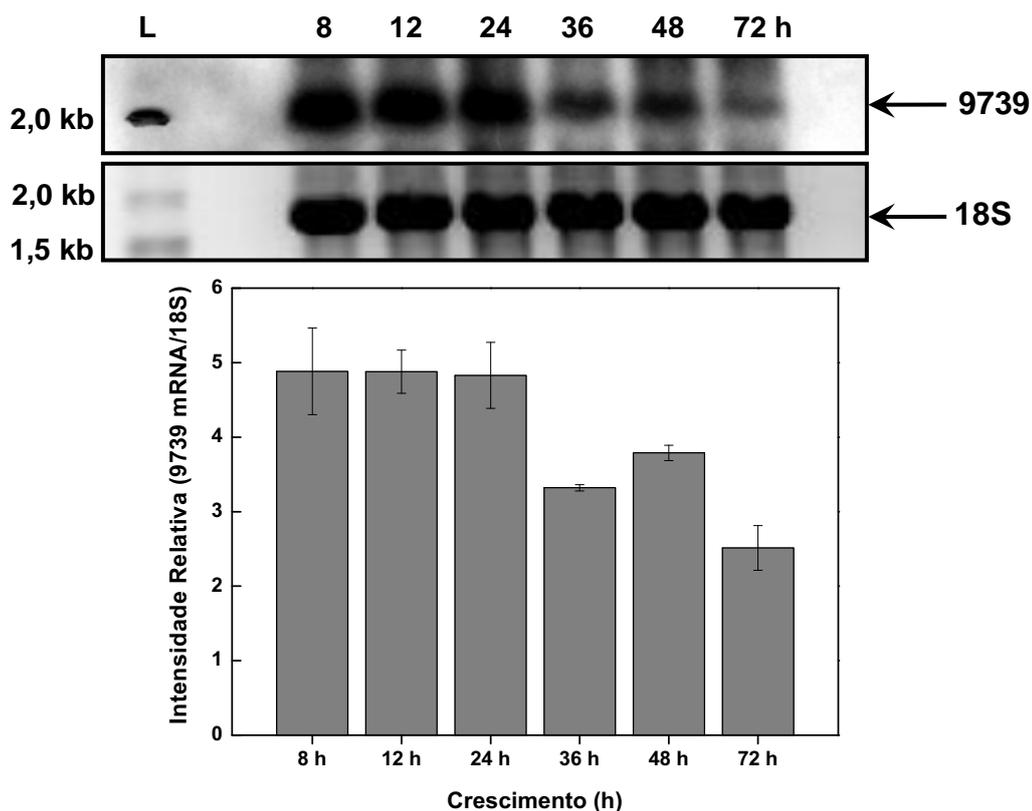


Figura 10- Expressão do gene correspondente à ORF NCU09739 durante o crescimento vegetativo na linhagem selvagem. Amostras de micélio foram coletadas nos tempos de 8 a 72 h de crescimento, o RNA foi extraído e analisado por *Northern blot* utilizando um fragmento do gene como sonda. Autorradiografia do gel, perfil do RNAr 18S em gel de agarose e análise densitométrica da expressão utilizando o software ImageJ (ABRAMOFF; MAGALHÃES; RAM, 2004). A intensidade relativa foi calculada pela razão entre 9739 RNAm/18S RNAr. L, ladder de RNA de 0,5-10 kb.

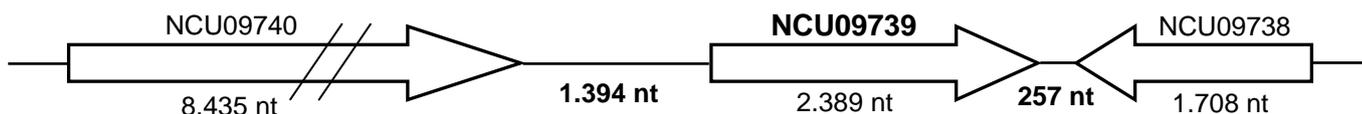


Figura 11- Representação esquemática das ORFs NCU09740, NCU09739 e NCU09738 e das regiões intergênicas. A região intergênica *upstream* a ORF NCU09739 tem 1.394 nt e a região intergênica *downstream* a ORF NCU09739 tem 257 nt.

NCU09739 teria regiões 5'- e 3'-UTR pequenas e uma região promotora também relativamente pequena. Um fato interessante é que esta ORF possui um único íntron de 361 pb no começo da região codificadora e como, teoricamente, apresenta uma região promotora pequena, então esta região de íntron poderia servir como sequência regulatória do gene. Outra questão seria saber se o produto da ORF realmente corresponderia ao tamanho esperado da ORF.

4.7 Clonagem da ORF NCU09739, ensaio de produção e purificação da proteína recombinante

Para a análise funcional da proteína hipotética na regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* é importante sua produção na forma recombinante. Para isto, o cDNA codificador da proteína foi clonado por RT-PCR, com pares de oligonucleotídeos específicos mostrados no Quadro 1 (Materiais e Métodos). A amplificação da ORF NCU09739 inteira não foi possível de ser conseguida, mesmo após inúmeras tentativas e empregando diferentes estratégias de amplificação. Por este motivo, foi amplificado um fragmento de DNA (Figura 12) para a produção da proteína truncada na região C-terminal (1-329), de maneira a conservar a região do domínio de ligação ao DNA. O fragmento amplificado foi subclonado no vetor de clonagem pMOS-Blue, originando o plasmídio pMOS-9739.

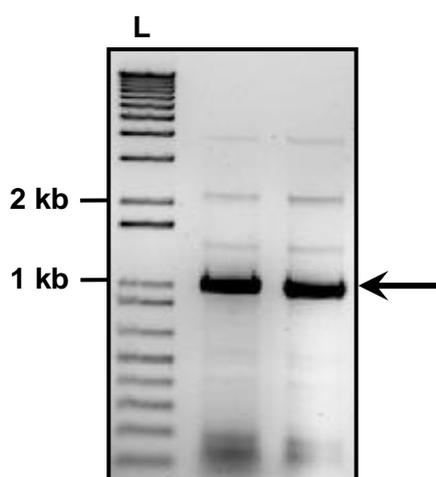


Figura 12- Amplificação da ORF NCU09739. Amplificação por RT-PCR do fragmento correspondente à ORF NCU09739, contendo 990 pb. L, ladder de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL.

O cassete de DNA correspondente ao inserto 9739 (990 pb) foi transferido da construção pMOS-9739 para o vetor de expressão pET28a (Novagen), para produção da proteína recombinante fusionada a uma cauda de poli-His, gerando o plasmídeo pET-9739. Construções plasmidiais de clones considerados positivos foram confirmadas através de sequenciamento de DNA e armazenadas a -80°C.

Para a produção da proteína recombinante o plasmídeo pET-9739 foi utilizado para transformar células competentes de três linhagens produtoras diferentes de *E. coli*: BL21(DE3)pLys-S, Rosetta(DE3)pLys-S e ArcticExpress(DE3). A seleção dos transformantes foi realizada em meio de cultura contendo os antibióticos apropriados. As culturas celulares foram induzidas e amostras foram coletadas antes e depois da indução. Células das culturas induzidas foram coletadas e lisadas em tampão de lise e centrifugadas para a separação do sobrenadante (S) e do precipitado (P) para verificar a solubilidade das proteínas. Primeiramente, o ensaio de indução da proteína recombinante His::9739 foi realizado juntamente com o controle positivo (pET-CopB ou pET-XAC2369), os quais produzem proteínas de *X. citri* e controle negativo (pET28a vazio). As amostras protéicas foram quantificadas e fracionadas por SDS-PAGE 12%.

A melhor condição de indução para esta proteína foi em *E. coli* cepa ArcticExpress(DE3), a qual também produz as chaperoninas Cpn10 (~10 kDa) e Cpn60 (~57 kDa), nas condições de indução utilizadas: 12°C, 24 h, 200 rpm e concentração de IPTG de 0,4 mM. Houve produção da proteína recombinante tanto na forma solúvel quanto na forma insolúvel (Figura 13A), porém a expressão não foi alta. As setas apontam bandas correspondentes à proteína recombinante e a proteína CopB (controle positivo). O resultado da detecção protéica por *Western blot* revelou claramente a presença da banda referente à proteína His::9739, com aproximadamente 38,4 kDa, tanto no sobrenadante (S) como no precipitado (P), como mostrado na Figura 13B. Foram realizadas novas análises de expressão alterando as condições de indução e as linhagens de *E. coli* produtoras. Nas linhagens de *E. coli* Rosetta e BL21 houve baixa produção da proteína recombinante e esta se manteve apenas na forma insolúvel. A partir destes resultados, seguiram-se os ensaios de purificação da proteína His::9739 na cepa *E. coli* ArcticExpress(DE3).

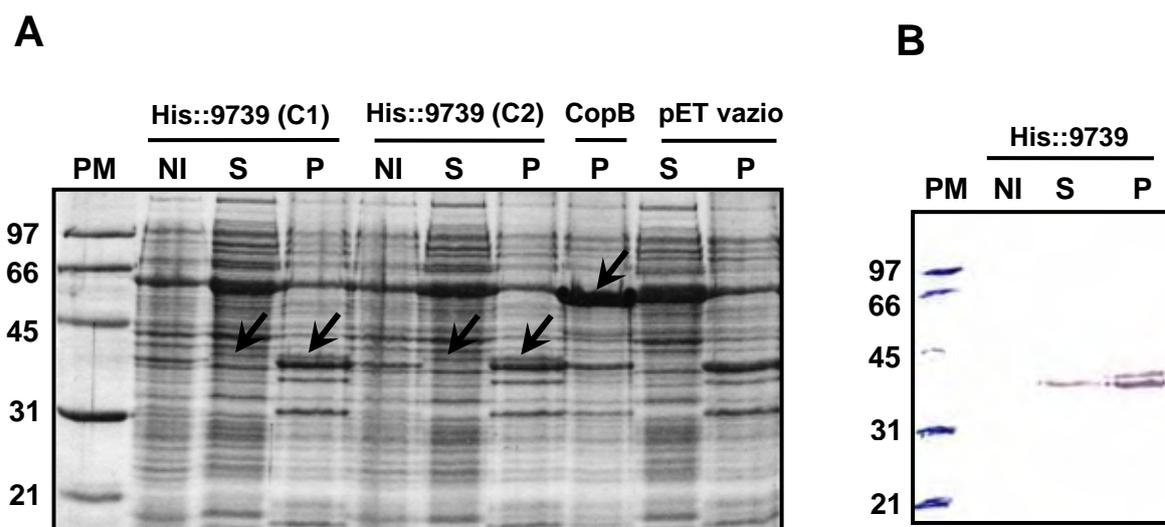


Figura 13- Análise da expressão em *E. coli* da proteína His::9739. (A) Extratos de células de *E. coli* ArcticExpress(DE3) transformadas com o plasmídeo pET-9739 (colônia 1, C1 e colônia 2, C2), pET-CopB e pET-vazio. As setas indicam bandas correspondentes à proteína recombinante (38,4 kDa) e ao controle positivo CopB (55 kDa). Eletroforese em SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. (B) *Western blot* da proteína His::9739 expressa em *E. coli* ArcticExpress(DE3), tanto na fração solúvel quanto na insolúvel, utilizando anticorpo anti-His. NI, amostra não-induzida; S, sobrenadante, P, precipitado. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares das proteínas em kDa.

Com o objetivo de obter a proteína recombinante pura para ser utilizada em alguns ensaios funcionais, a purificação da proteína His::9739 em pequena escala foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando resina de NiNTA agarose (Qiagen), a qual permite purificar a proteína em um único passo. Para isso, a proteína foi produzida em pequena escala (200 mL) e eluída com 100, 200 e 300 mM de imidazol. Os resultados foram satisfatórios (Figura 14A), pois houve purificação da proteína recombinante (indicado pela seta em vermelho) e diminuição da banda referente a chaperonina (seta em preto), principalmente na eluição E3. A chaperonina é altamente expressa nesta cepa ArcticExpress(DE3). Porém as frações protéicas foram eluídas com contaminação e, por este motivo, a purificação foi realizada no sistema AKTA Prime a partir de 500 mL de cultura usando coluna HisTrap. As frações cromatográficas foram coletadas durante a eluição da proteína em tampão Tris-HCl, gradiente de imidazol de 50 mM - 1 M. O cromatograma (Figura

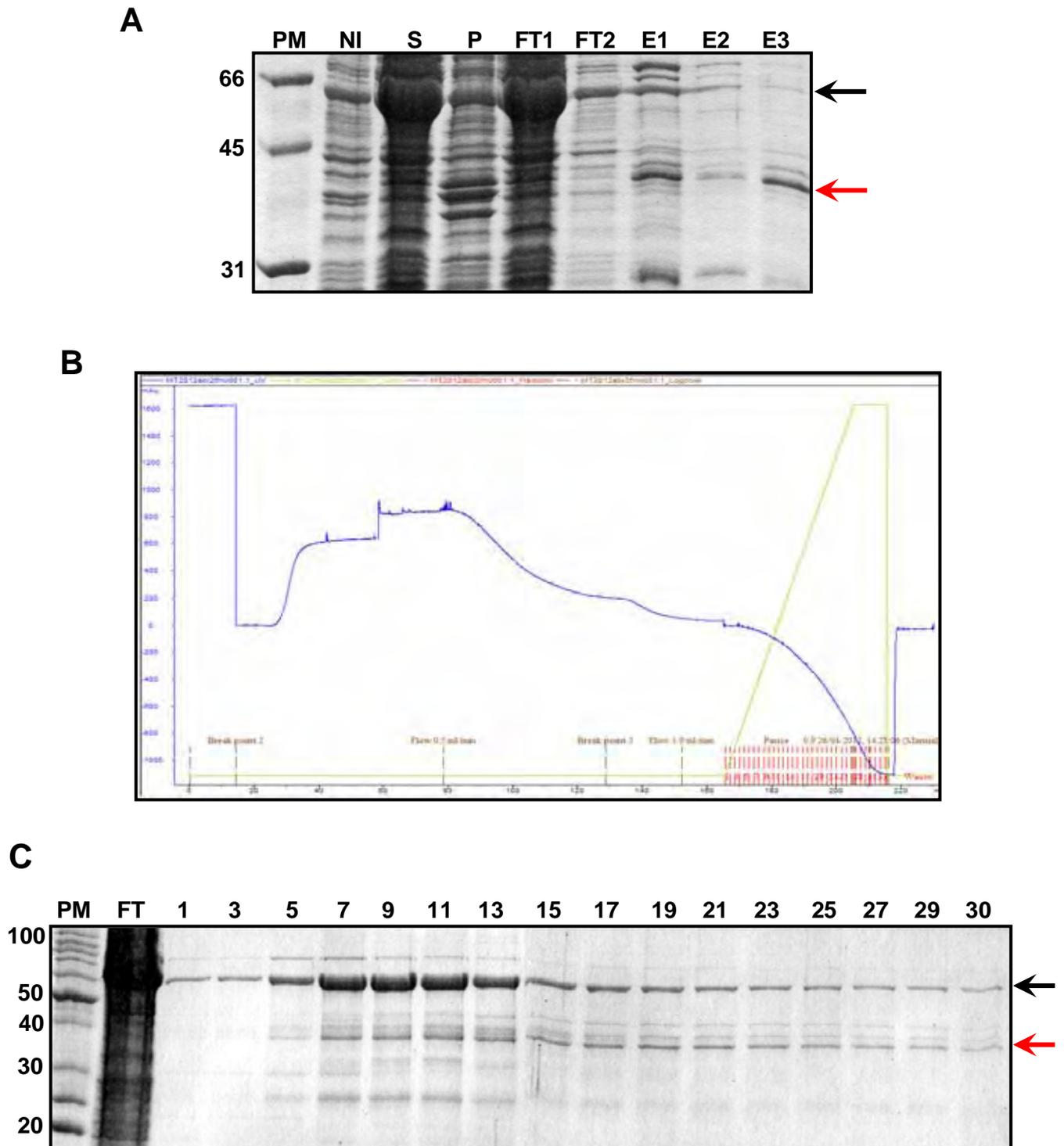


Figura 14- Purificação da proteína His::9739 produzida em *E. coli* ArcticExpress(DE3). (A) Purificação proteína His::9739 em pequena escala, usando resina de níquel. (B) Perfil de eluição da proteína recombinante no sistema AKTA Prime utilizando gradiente linear de 50 mM a 1 M de imidazol. (C) Análise das 16 frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. As setas em vermelho indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante com 38,4 kDa, e as setas em preto indicam as bandas correspondentes a chaperonina (Cpn60) com 57 kDa. NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado, FT, *flow through*, E1, eluição com 100 mM de imidazol, E2, eluição com 200 mM de imidazol, E3, eluição com 300 mM de imidazol. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares aproximados das proteínas em kDa.

14B) mostra que não houve a formação de um pico específico referente às frações em que a proteína recombinante foi eluída. Dessa forma, amostras de 40 frações eluídas foram avaliadas em SDS-PAGE 12%. A Figura 14C mostra o perfil das frações 1 a 30, na qual se observa um alto grau de contaminação pela chaperonina (Cpn60), a qual provavelmente forma um complexo com a proteína recombinante, sendo eluída em todas as frações. Devido a este contaminante, a produção da proteína recombinante 9739 em maior escala usando a linhagem produtora *E. coli* ArcticExpress(DE3) não foi satisfatória e esta linhagem de *E. coli* não será utilizada. Esta proteína poderá ser utilizada futuramente em outros ensaios, como por exemplo determinação do *motif* de ligação ao DNA por CHIP-Seq, então outras formas truncadas que permitam uma melhor solubilidade da proteína deverão ser construídas.

4.8 Características bioquímicas dos cofatores de transcrição RCO-1 e RCM-1

A proteína RCO-1 de *N. crassa* apresenta dois domínios de interação proteína-proteína: domínio Tup_N na porção N-terminal (do resíduo de aminoácido 19 ao 90) e sete domínios WD40 na porção C-terminal, do aminoácido 287 ao 600 (Figura 15A). A proteína RCM-1 de *N. crassa* apresenta dez domínios repetidos de tetratricopeptídeos (TPR) de interação proteína-proteína, do aminoácido 44 ao 396 (Figura 15B). A Figura 15C representa a proteína RCM-1 truncada na região C-terminal, que foi produzida na forma recombinante neste trabalho. Utilizando a ferramenta PSORTII foi realizada uma busca para identificar a presença de sinais de localização nuclear clássicos (NLS) nestas proteínas. A proteína RCM-1 mostrou um provável sinal de localização nuclear monopartido 713RHRR716, porém a proteína RCO-1 não mostrou NLS clássico. Entretanto, Olmedo et al. (2010) mostraram que ambas proteínas estão localizadas no núcleo de células do fungo *N. crassa*, como demonstrado em um ensaio de fracionamento celular. Portanto, podemos sugerir que a proteína RCO-1 seja transportada para o núcleo na forma de complexo protéico ligada à proteína RCM-1 ou que possua um NLS não clássico. A interação física entre RCO-1 e RCM-1 (Tup1-Ssn6) em *N. crassa* ainda não foi reportada.

A Quadro 4 apresenta alguns dados bioquímicos das proteínas RCO-1 e RCM-1, como o tamanho do cDNA, número de resíduos de aminoácidos (AA), Massa Molecular (MM) e ponto isoelétrico (PI) estimado.

Quadro 4 - Dados bioquímicos dos cofatores transcricionais estudados.

ORF	Gene	cDNA (pb)	Resíduos de aminoácidos	MM estimada (kDa)	PI estimado	Domínios
NCU06205	<i>rco-1</i>	1.815	604	66,08	6,42	Tup_N e WD40
NCU06842	<i>rcm-1</i>	2.754	917	102,41	6,36	Domínios
**NCU06842		1.515	504	56,40	5,89	TPR

**produção da proteína truncada



Figura 15- Representação esquemática dos cofatores de transcrição. (A) A proteína RCO-1 apresenta um domínio Tup_N, representado pelo quadrado em cinza, e sete domínios WD40 representados por triângulos verdes. **(B)** A proteína RCM-1 apresenta dez domínios TPR representados pelos círculos amarelos. **(C)** A proteína RCM-1 truncada na região C-terminal (1-504 aa), de maneira a conservar a região dos domínios TPR. As barras em rosa/verde claro representam sequências com baixa complexidade ou domínios com funções desconhecidas. Representação esquemática feita pelo servidor EMBL-SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>).

4.9 Análises de similaridade e alinhamento das sequências das proteínas RCO-1 e RCM-1

As sequências polipeptídicas das proteínas estudadas foram analisadas por Blastp e mostraram que as proteínas RCO-1 e RCM-1 de *N. crassa* são conservadas em alguns microrganismos e apresentaram homologia com proteínas de fungos e leveduras. A proteína RCO-1 de *N. crassa* possui homologia com Tup1 de *Wangiella (Exophiala) dermatitides* (70% similaridade/59% identidade), TupA de *Penicillium marneffeii* (68% similaridade/57% identidade), RcoA de *A. nidulans* (66% similaridade/55% identidade), TUP1 de *Cryptococcus neoformans* (70% similaridade/55% identidade), Tup1 de *Candida albicans* (69% similaridade/53% identidade), Tup1 de *Kluyveromyces lactis* (66% similaridade/51% identidade) e com Tup1 de *S. cerevisiae* (64% similaridade/48% identidade).

Em *N. crassa*, a deleção do gene *rco-1* afetou a conidiação e desenvolvimento sexual (YAMASHIRO et al., 1996). Algumas funções foram descritas para o produto do gene. A proteína RCO-1 é requerida para a fusão e morfologia normal das hifas (ALDABBOUS et al., 2010), participa na fotoadaptação de genes regulados por luz (OLMEDO et al., 2010), é um repressor específico do gene *con-10*, um gene envolvido na conidiação (LEE; EBBOLE, 1998) e está relacionada com o ritmo circadiano de *N. crassa* (BRODY et al., 2010). No fungo dimórfico *W. dermatitides*, a deleção de *tup1* afetou o crescimento e levou a anormalidades celulares e além dos mutantes não produzirem hifas verdadeiras, as células não produziram conídios. Portanto, a proteína Tup1 de *W. dermatitides* é um potencial repressor transcricional que regula o crescimento transiente entre as fases de levedura e filamentosa (LIU et al., 2008). Em *P. marneffeii*, outro fungo dimórfico, a deleção de *tupA* confere redução no crescimento filamentoso e inapropriada morfogênese leveduriforme. Com isso, conclui-se que a proteína TupA de *P. marneffeii* é requerida para o crescimento filamentoso e para a repressão da esporulação (TODD et al., 2003).

Em *A. nidulans* a deleção de *rcoA* levou à redução na esporulação e alterações no desenvolvimento sexual (HICKS et al., 2001; TODD; HYNES; ANDRIANOPOULOS, 2006) e também resultou em não desrepressão do catabolismo de carbono, sugerindo que CreA não desenvolve sua função repressora recrutando RcoA para determinados promotores reprimidos por glicose (GARCIA et

al., 2008). Por outro lado, este mesmo estudo mostrou que RcoA foi essencial para a manutenção da estrutura da cromatina de certos promotores reprimidos por glicose em *A. nidulans* (GARCIA et al., 2008). No basidiomiceto *C. neoformans*, a mutação em *tup1* afetou o crescimento e o comportamento sexual (LEE; CHANG; KWON-CHUNG, 2005). Em *C. albicans*, a proteína Tup1 atua como repressor de genes requeridos para o crescimento filamentosos (BRAUN; JOHNSON, 1997) e está envolvida no mecanismo de dimorfismo (ZHAO et al., 2002) e no mecanismo de catabolismo de carbono (MURAD et al., 2001). A proteína Tup1 de *K. lactis* atua com um repressor transcricional, uma vez que tem a capacidade de complementar o fenótipo de repressão no mutante *tup1* de *S. cerevisiae* (LAMAS-MACEIRAS; FREIRE-PICOS; TORRES, 2011).

A proteína RCM-1 de *N. crassa* possui homologia com Ssn6 de *C. albicans* (73% similaridade/59% identidade), Ssn6 de *S. cerevisiae* (74% similaridade/56% identidade) e com SsnF de *A. nidulans* (58% similaridade/49% identidade). Em *N. crassa*, a ausência de *rcm-1* foi letal e o mutante *rcm-1*^{RIP} apresentou sérias alterações no desenvolvimento vegetativo e sexual (OLMEDO et al., 2010). Estudos mostraram que o gene *rcm-1* é requerido para a fusão e morfologia normal das hifas (ALDABBOUS et al., 2010) e a proteína RCM-1 participa na fotoadaptação de genes regulados por luz em *N. crassa* (OLMEDO et al., 2010). A ausência de Ssn6 em *C. albicans* promoveu a formação de pseudo-hifas (GARCIA-SANCHEZ et al., 2005; HWANG et al., 2003) e a inativação de *ssnF* em *A. nidulans* foi letal (GARCIA et al., 2008).

Alinhamentos múltiplos das sequências polipeptídicas de RCO-1 e de RCM-1 com os ortólogos funcionais caracterizados em outros organismos foram realizados. A Figura 16 mostra o alinhamento entre a proteína RCO-1 de *N. crassa* e as proteínas ortólogas. O resultado do alinhamento mostrou três regiões bem conservadas nestes microrganismos: a região do domínio Tup_N, a região rica em prolina e as regiões dos domínios WD40. A região rica em prolina, que possui uma estrutura quimicamente coesa e rígida, provavelmente sirva como “ponte”, separando os dois domínios. A Figura 17 mostra o alinhamento da proteína RCM-1 de *N. crassa* e das proteínas ortólogas. O resultado mostrou que as regiões mais conservadas entre estes microrganismos são as regiões dos domínios TPR.

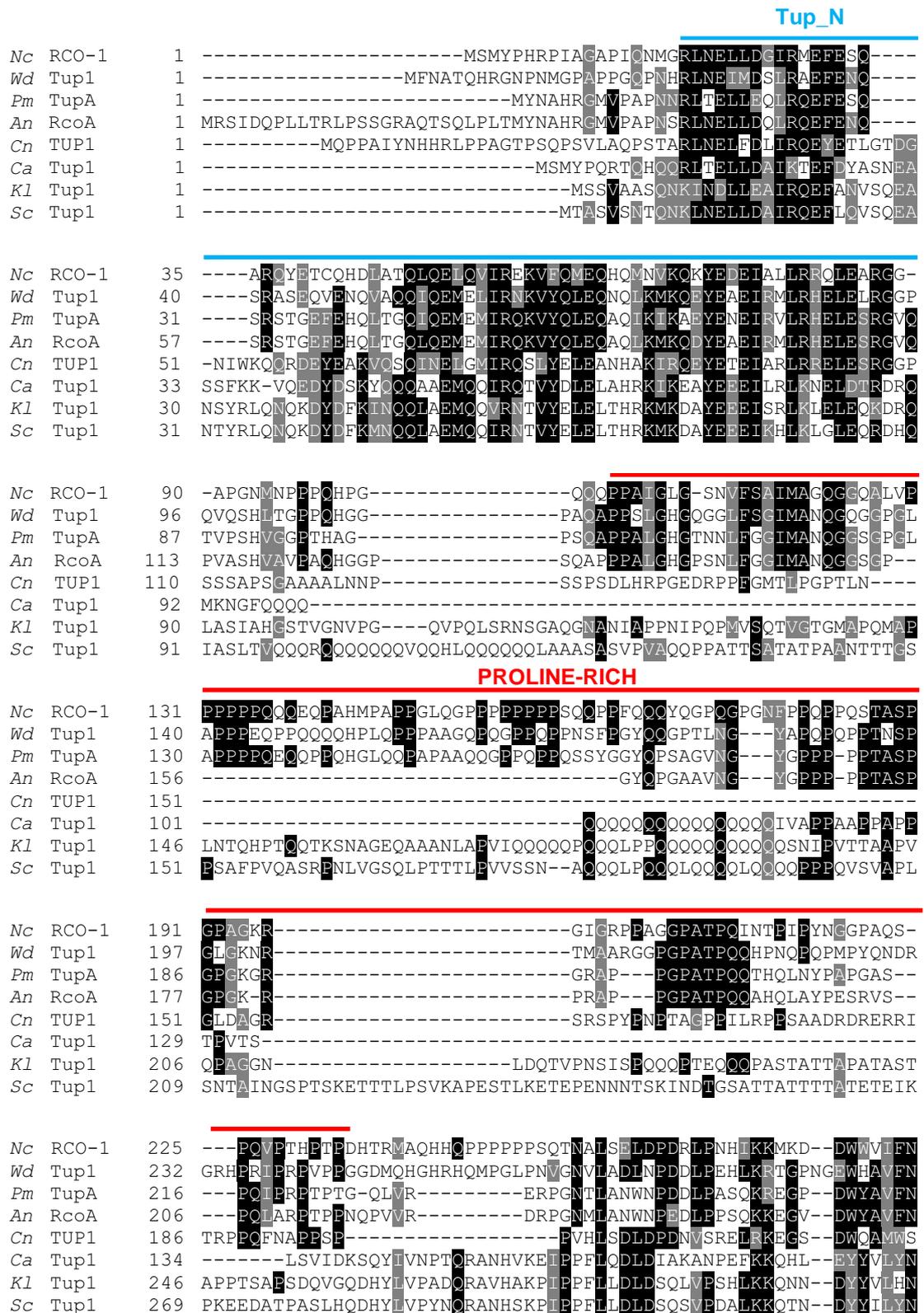


Figura 16- Alinhamento múltiplo da sequência polipeptídica da proteína RCO-1 de *N. crassa* com proteínas ortólogas de outros fungos. Em preto estão representados os resíduos de aminoácidos idênticos e em cinza os aminoácidos similares. A região do domínio Tup_N está apresentada pela linha em azul, a região rica em prolina está apresentada pela linha em vermelha, e as linhas pretas representam os sete domínios WD40.

			WD 1																			
Nc	RCO-1	280	AAVPRVLDVVELVHTLQEHESVVCVRFSMDGKYVATGCNRSQAQYDVEFTGKLCILQDENI																			
Wd	Tup1	292	PNVPRTLDIQLLHNLVHESVVCVRFSNDGKYVATGCNRSQAQYDARDGRKVCETLDES																			
Pm	TupA	261	PEVQRVLDVVELVHHLVHDSVVCVRFSRDGKYVATGCNRSQAQYDVAATGQNVATLQDES																			
An	RcoA	252	PEVQRVLDVVELVHHLVHDSVVCVRFSRDGKYLATGCNRSQAQYDVTLLGQNVAVLQDES																			
Cn	TUP1	226	SQMRKQLDVTLVHLEHETVVCVRFSNDGKYLATGCNRTAQYDVKTGARVSTLQDDLA																			
Ca	Tup1	185	PAFSDKDLIDMVHSLDHSSVVCVRFSRDGKFLATGCNKTTQVENVTGELVAKLIDESS																			
Kl	Tup1	304	PALFTDLDELHKSLEHSSVVCVRFSDDGEFLATGCNKTTQVYKVTGELVAKLIDESSA																			
Sc	Tup1	327	PALPREIDVELHKSLEDHTSVVCVRFSNDGEFLATGCNKTTQVYRVSDGSLVAKLIDESSA																			
			WD 2										WD 3									
Nc	RCO-1	340	D-----																			
Wd	Tup1	352	QD-----																			
Pm	TupA	321	D-----																			
An	RcoA	312	D-----																			
Cn	TUP1	286	N-----																			
Ca	Tup1	245	NE-----																			
Kl	Tup1	364	SQ-----																			
Sc	Tup1	387	ANNHRNSITENNTTSTDNNTMTTTTTTTITTTAMTSAELAKDVENLNTSSSPSSDLYI																			
Nc	RCO-1	348	RSVCFSPDGKYLATGAEDKLIRWWDIQSRTIRNTFHHGHEQDIYSLDFSRDGRITASGSGD																			
Wd	Tup1	361	RSVCFSPDGKLLATGAEDKIRWWDIENKRIRITTFDGHGHEQDIYSLDFSRTRGLASGSGD																			
Pm	TupA	329	RSVCFSPDGKYLATGAEDKQIRWWDIATRSIKHVFTGHEQDIYSLDFAGNGRYIASGSGD																			
An	RcoA	320	RSVCFSPDGKYLATGAEDKQIRWWDIATRTIKHIFSGHEQDIYSLDFAGNGRYIASGSGD																			
Cn	TUP1	294	RSVCFSPDGKFLATGAEDRQIRWDLKORRICHLLQGHMQEIIYSLDFSRDGRFVASGSGD																			
Ca	Tup1	261	RSVCFSPDGKLLATGAEDKLIRWDLSTKRIIKLIRGHEQDIYSLDFFPDGRIVSGSGD																			
Kl	Tup1	410	RSVCFSPDGKFLATGAEDKLIRWDLTKKIVMTLKGHEQDIYSLDFPSPGNKLVSGSGD																			
Sc	Tup1	447	RSVCFSPDGKFLATGAEDRLIRWWDIENRKIVMLQGHGHEQDIYSLDFPSPGDKLVSGSGD																			
			WD 4																			
Nc	RCO-1	408	RTVRLWDIETGQNTSVLSIEDGVT-----TVVISP-DKQFVAAGSLDKSVRVWD																			
Wd	Tup1	421	KTVRLWDIESNQVMVLSIEDGVT-----TVVAMP-DGRFVAAGSLDKSVRVWD																			
Pm	TupA	389	KTVRLWDVLEGLVYTLVLSIEDGVT-----TVVAMP-DGIVVAAGSLDKSVRVWD																			
An	RcoA	380	KTVRLWDIAEGLVYTLVLSIEDGVT-----TVVAMP-DGLVVAAGSLDKSVRVWD																			
Cn	TUP1	354	KSARLWDVEKGTQVFNQIEDFHNEHGPIDAGITSVVAVSP-DGKLVAAGSLDTMVRVWN																			
Ca	Tup1	321	RSVRIWDLRTSQCSLTLVLSIEDGVT-----TVVAVSP-DGKLVAAGSLDRTVRVWD																			
Kl	Tup1	470	RTVRIWDLTTGTCSTLTLVLSIEDGVT-----TVVAVSPGKFLVAAGSLDRTVRVWD																			
Sc	Tup1	507	RTVRIWDLRTGQCSLTLVLSIEDGVT-----TVVAVSPGDGKYVAAGSLDRAVRVWD																			
			WD 5																			
Nc	RCO-1	456	MRG-YLAERLEG---PDGHKDSVYSVAFSPDGRNLVSGSLDKTIKMWELTAPRGIPSSA																			
Wd	Tup1	469	CSTGYLIERLEG---PQGHKDSVYSVAFSPSGRELVSGLDKTIKMWELTPQRNLIIP-S																			
Pm	TupA	437	TTTGYLVERLEN---PDGHKDSVYSVAFAPNGRDVSGSLDKTIKMWELTAPRGMLPGT																			
An	RcoA	428	TTTGYLVERLEN---PDGHKDSVYSVAFAPNGKELVSGSLDKTIKWLWLNLRPQQYN-S																			
Cn	TUP1	413	VSTGQOQVERLKG-----HKDSVYSVAFSPDGKCLVSGSLDRTRIRWDLTGTRKREVESL																			
Ca	Tup1	369	STTGFLVERLDSGNENGNHGEDSVYSVAFSNNGEQIASGSLDRTKLWHLGCKSDK---																			
Kl	Tup1	519	SDTGFLVERLDSENELGTGHRDSVYSVVFTRDGGVVSGLDRSVKLVNQLNGLSGQK---																			
Sc	Tup1	556	SETGFLVERLDSENESGTGHKDSVYSVVFTRDQGSVVSGLDRSVKLVNQLQANNKSDSK																			
			WD 6																			
Nc	RCO-1	511	PP-----KGGRCIKTFEGHRDFVLSVALTPDSQVWVLSGSKDRGVQFWDPRGTQLMLQ																			
Wd	Tup1	524	TA-----KDGKCIKTFEGHKDFVLSVCLTPDGHVWVMSGSKDRGVQFWDPTGNQAMMLQ																			
Pm	TupA	493	GV-----KGGKCVKTFEGHKDFVLSVCLTPDGHVWVMSGSKDRGVQFWDPTGSAQMMMLQ																			
An	RcoA	483	AG-----KGGKCHKTFEGHKDFVLSVCLTPDGHVWVMSGSKDRGVQFWDPTITGNAQMMMLQ																			
Cn	TUP1	466	PPGKEAQKNLGTCCSTLNGHKDFVLSVAISPDPGQVWVMSGSKDRSILQFVHISTGQAQMLQ																			
Ca	Tup1	426	-----STCEVTYIIGHKDFVLSVCCTPDNEYILSGSKDRGVIFWDQASGNPILMLQ																			
Kl	Tup1	576	-----SHAECVTTYIIGHKDFVLSVATTQNDYILSGSKDRGVIFWDTKSGNPILMLQ																			
Sc	Tup1	616	TP-----NSGTCEVTYIIGHKDFVLSVATTQNDYILSGSKDRGVIFWDTKSGNPILMLQ																			
			WD 7																			
Nc	RCO-1	565	GHKNSVISVAPSEVTG-PNGVGYFATGSGDMRARIWYSYRI-----																			
Wd	Tup1	578	GHKNSVISVAPCEPTG-----QIFATGSGDMKARIWQYITWRGAHQGI-----																			
Pm	TupA	547	GHKNSVISVAPSPIN-----NLFATGSGDMRARIWRYVEFPE-----																			
An	RcoA	537	GHKNSVISVAPSPITG-----NLFATGSGDMRARIWRYSAITGR-----																			
Cn	TUP1	526	GHKNSVISIDLARSG-----GYLASGSGDMRARIWKYEPICRD-----																			
Ca	Tup1	476	GHRNSVISVAVSLNSKG--TEGIFATGSGDCKARIWKYTKK-----																			
Kl	Tup1	628	GHRNSVIYVTVANGHPLGPEYGVFATGSGDCKARIWKYSKKNQQNSTQIKEIKE																			
Sc	Tup1	670	GHRNSVISVAVANGSPLGPEYVVFATGSGDCKARIWKYKKIAPN-----																			

Figura 16- Continuação.

4.10 Clonagem dos genes *rco-1* e *rcm-1*, ensaio de produção e purificação das proteínas recombinantes

A amplificação dos cDNAs dos genes *rco-1* e *rcm-1* foi realizada por RT-PCR usando pares de oligonucleotídeos específicos para cada gene, apresentados no Quadro 1 (Materiais e Métodos). A amplificação do gene *rco-1*, para produção da proteína inteira, de maneira a conservar todas as regiões de domínio de interação proteína-proteína, é mostrada na Figura 18A. A amplificação do gene *rcm-1* foi feita de maneira a produzir uma proteína truncada na região C-terminal (1-504 aa), conservando a região do domínio de interação proteína-proteína, e é mostrada na Figura 18B. Os fragmentos amplificados correspondentes aos tamanhos esperados das ORFs foram subclonados no vetor de clonagem pMOS-Blue, originando os plasmídios pMOS-*rco1* e pMOS-*rcm1*.

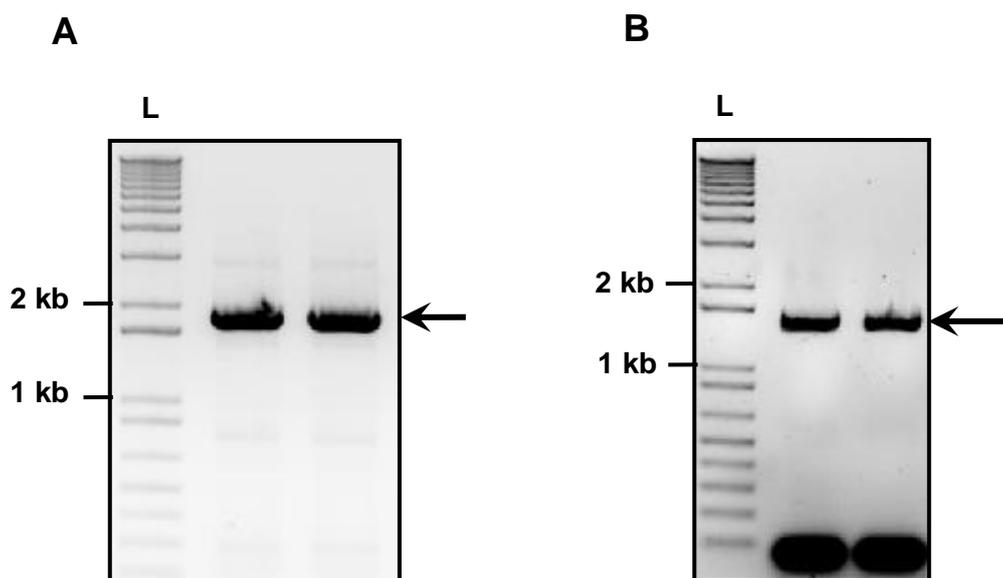


Figura 18- Amplificação dos genes *rco-1* e *rcm-1*. (A) Amplificação do fragmento correspondente à ORF NCU06205 (*rco-1*) contendo 1.815 pb. (B) Amplificação do gene correspondente à ORF NCU06842 (*rcm-1*) contendo 1.515 pb. L, ladder de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL. As setas indicam os fragmentos amplificados.

Os cassetes de DNA correspondentes aos insertos *rco-1* (1.815 pb) e *rcm-1* (1.515 pb) foram transferidos das construções pMOS-*rco1* e pMOS-*rcm1* para o vetor de expressão pET28a. Após transformação em *E. coli* DH10B, os plasmídios

recombinantes foram submetidos a análises de restrição para a confirmação da presença dos insertos no vetor de expressão. As construções plasmidiais resultantes pET-*rco1* e pET-*rcm1* foram confirmadas através de sequenciamento de DNA.

Para a produção das proteínas recombinantes os plasmídios pET-*rco1* e pET-*rcm1* foram utilizados para transformar células competentes de três linhagens produtoras de *E. coli*: BL21(DE3)pLys-S, Rosetta(DE3)pLys-S e ArcticExpress(DE3). Células das culturas induzidas foram coletadas e lisadas em tampão de lise e centrifugadas para a separação do sobrenadante (S) e do precipitado (P) para verificar a solubilidade das proteínas.

Primeiramente, o ensaio de indução da proteína recombinante RCO-1 fusionada à cauda poli-His foi realizada juntamente com o controle positivo (pET-CopB ou pET-XAC2369) e negativo (pET28a vazio). A melhor condição de produção da proteína RCO-1 foi na linhagem *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S, usando 0,4 mM de IPTG, 250 rpm, 37°C por 4 h, e a cultura foi lisada com tampão Tris-HCl. Na Figura 19A, bandas apontadas pelas setas correspondem à proteína recombinante His::RCO1 contendo aproximadamente 68 kDa e ao controle positivo CopB (55 kDa). A presença da proteína foi confirmada por *Western blot* (Figura 19B). O ensaio mostra que a proteína foi encontrada tanto na forma solúvel como insolúvel.

A proteína recombinante His::RCM1 fusionada à cauda poli-His foi induzida nas mesmas condições, juntamente com os controles positivos e negativos. A Figura 19C mostra o resultado da análise da expressão da proteína His::RCM1 em SDS-PAGE 12%. A melhor condição de indução para esta proteína foi em *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S, usando 0,4 mM IPTG, a 30°C, 250 rpm por 4 h, e a cultura foi lisada em tampão Hepes. A banda correspondente à proteína é indicada pela seta na Figura 19C e a presença da proteína foi confirmada por *Western blot* que revelou claramente a presença da banda referente à proteína His::RCM1 com aproximadamente 58,5 kDa, tanto no sobrenadante como no precipitado, como mostrado na Figura 19D. A partir destes resultados, seguiram-se os ensaios de purificação com a proteína recombinante His::RCO1 e His::RCM1 na cepa produtora *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S.

Com o objetivo de obter a proteína recombinante pura para ser utilizada na produção de anticorpo e em alguns ensaios funcionais, a purificação das proteínas His::RCO1 e His::RCM1 foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando resinas de NiNTA agarose (Qiagen) e de His-Select Cobalt Affinity Gel (Sigma). Para

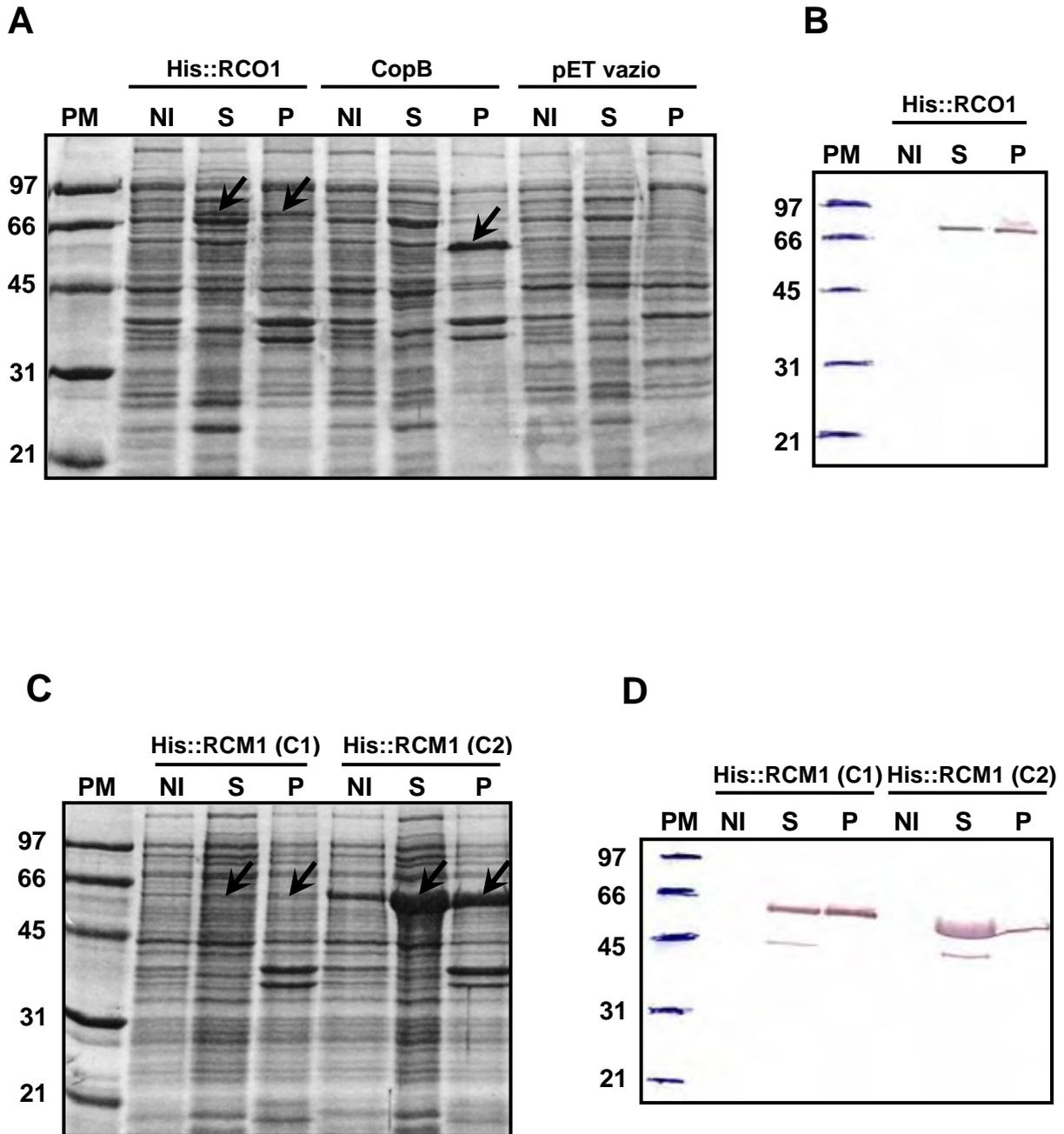


Figura 19- Análise da expressão em *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S das proteínas His::RCO1 e His::RCM1. (A) Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-*rco1*, pET-CopB (controle positivo) e pET-vazio (controle negativo). As setas indicam bandas correspondentes à proteína RCO-1 (~68 kDa) e a proteína CopB (~55 kDa). **(B)** Membrana do *Western blot* para RCO-1 revelada com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina. **(C)** Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-*rcm1* (colônia 1, C1 e colônia 2, C2). As setas indicam bandas correspondentes à proteína RCM-1 (~58,5 kDa). **(D)** Membrana do *Western blot* para proteína RCM-1 revelada com anticorpo anti-His conjugado à fosfatase alcalina. Eletroforese em SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. NI, amostra não-induzida, S, sobrenadante, P, precipitado. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares das proteínas em kDa.

isso, as proteínas foram produzidas em pequena escala (200 mL de cultura) e eluídas com 100, 200 e 300 mM de imidazol. Figura 20A mostra o SDS-PAGE 12% com a purificação da proteína RCO-1 utilizando resina de níquel e a Figura 20B a purificação da proteína utilizando resina de cobalto. Observa-se que em ambas figuras a fração eluída com 300 mM de imidazol (E3) apresentou maior pureza em relação à fração E1 (eluição com 100 mM de imidazol) e que a purificação com cobalto parece apresentar maior pureza e menor rendimento da proteína purificada. Podemos afirmar que por ser um método simples de purificação, o resultado é satisfatório, apresentando bandas referentes a proteína RCO-1 purificada em destaque quando comparadas ao sobrenadante (S), mas também mostrou contaminação com outras proteínas. A purificação da proteína His::RCM1 em pequena escala mostrou menor rendimento e pureza (resultado não mostrado). Para aumentar a quantidade destas proteínas e o grau de pureza foi usando o sistema de purificação AKTA Prime com coluna de níquel HisTrap (maior quantidade da proteína purificada) e depois com resina de cobalto (maior grau de pureza), conforme experimentos observados.

A purificação no sistema AKTA Prime foi realizada a partir de 500 mL de cultura para a proteína RCO-1 e 1 litro de cultura para a proteína RCM-1, usando coluna HisTrap. O resultado obtido para a proteína RCO-1 está mostrado na Figura 21, a qual mostra as frações cromatográficas coletadas durante a eluição da proteína em tampão Tris-HCl, gradiente de imidazol de 100 mM - 1 M. O cromatograma (Figura 21A) mostra que houve a formação de um pico específico referente às frações em que uma grande quantidade da proteína recombinante foi eluída. Dessa forma, amostras de 40 frações eluídas foram avaliadas em SDS-PAGE 12%. A Figura 21B mostra o perfil das frações 9 a 27, na qual se observa grande quantidade da proteína RCO-1 em todas as frações, principalmente nas frações de 10 a 17. Foram observados alguns contaminantes próximos à banda referente à proteína RCO-1. Portanto, as frações de 1 a 8 (resultados não mostrados), as quais apresentaram uma pequena quantidade de contaminantes, foram reunidas, concentradas, dialisadas e armazenadas a -80°C , para futuro uso em ensaio de EMSA (Figura 21C, fração 1). As frações restantes foram repurificadas em coluna de níquel HisTrap e eluídas em gradiente de 100 mM a 1 M de imidazol. A partir desta segunda cromatografia, as últimas frações eluídas estavam mais puras, foram reunidas, concentradas e armazenadas -80°C (Figura 21C,

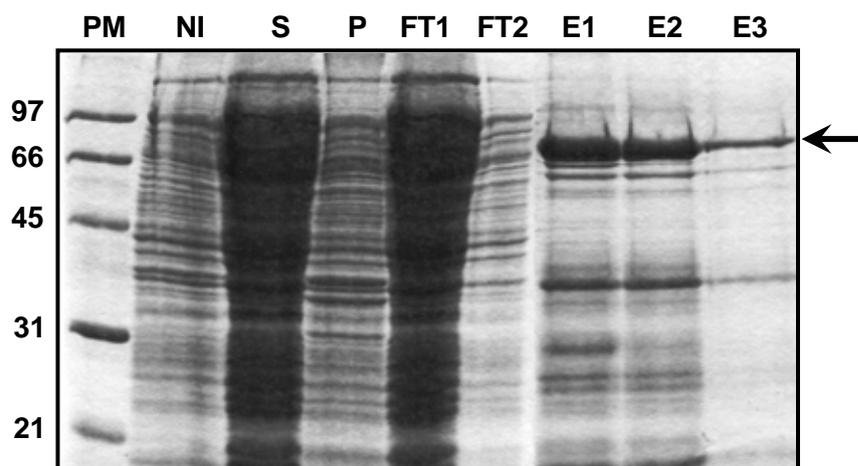
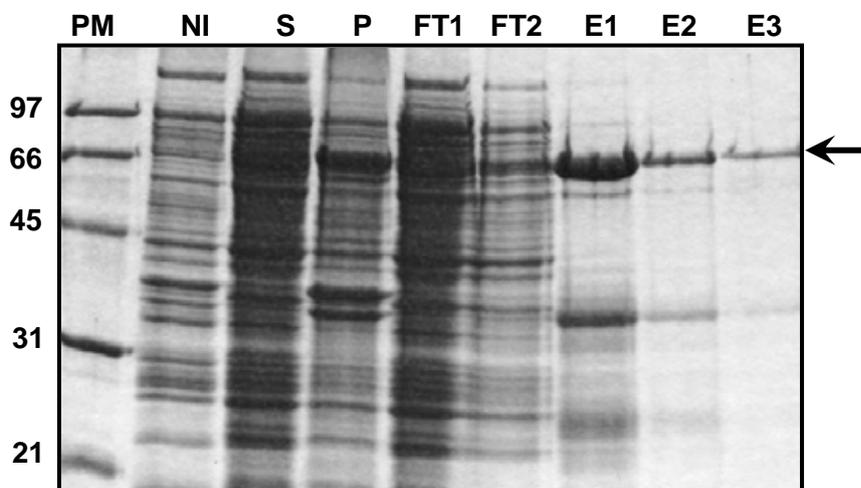
A**B**

Figura 20- Purificação em pequena escala da proteína His::RCO1. (A) resina de NiNTA. **(B)** resina His-Select Cobalt. **NI**, não induzido, **S**, sobrenadante, **P**, precipitado, **FT1**, **FT2**, *flow through*, **E1**, eluição com 100 mM de imidazol, **E2**, eluição com 200 mM de imidazol, **E3**, eluição com 300 mM de imidazol. SDS-PAGE 12%. As setas apontam as bandas correspondentes à proteína recombinante. Os números à esquerda do gel expressam o Peso Molecular das proteínas em kDa.

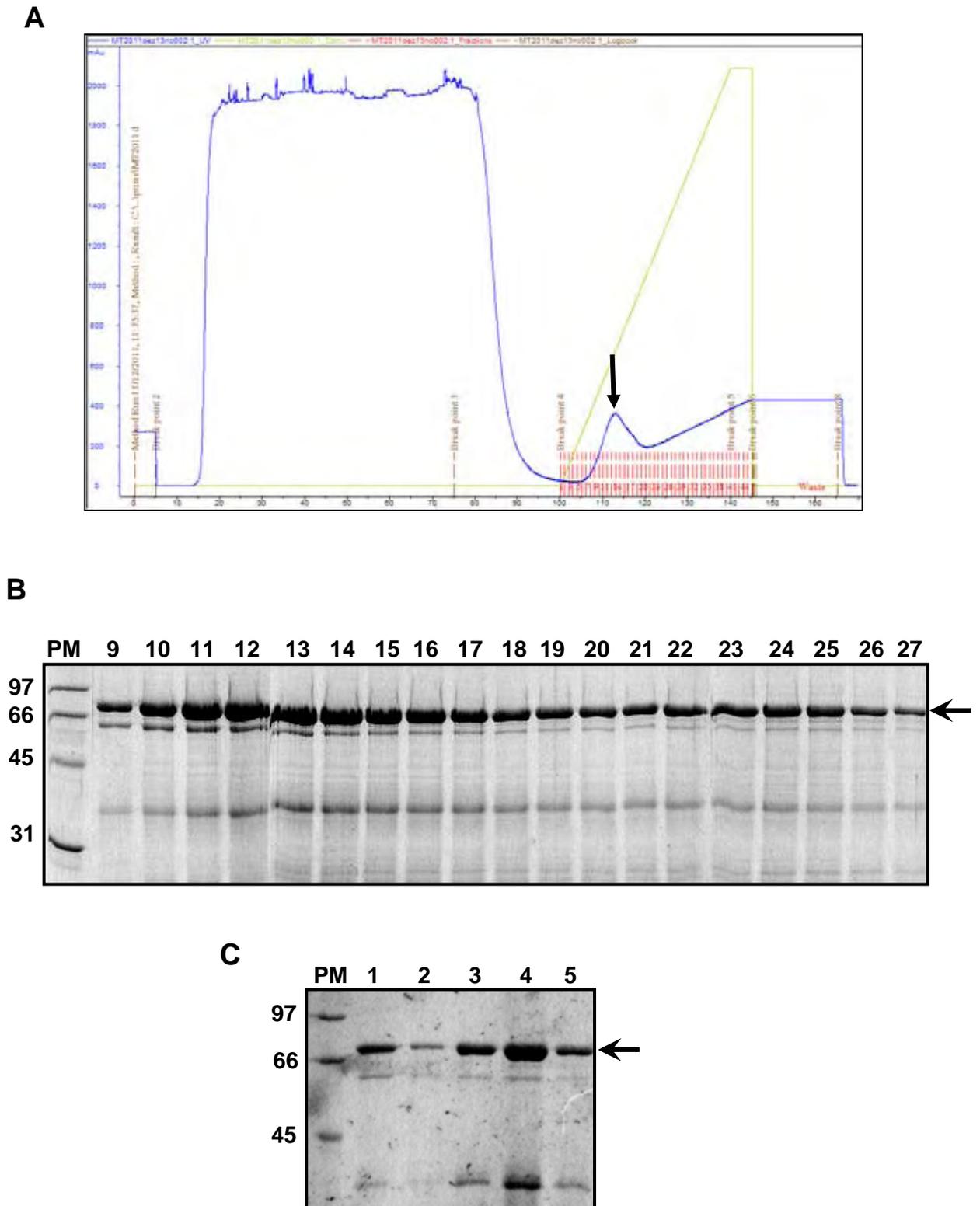


Figura 21- Purificação da proteína His::RCO1 produzida em *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S em maior escala. (A) Perfil de eluição da proteína recombinante em coluna HisTrap, usando gradiente linear de 100 mM a 1 M de imidazol. Seta indica um pico específico referente às frações em que uma grande quantidade da proteína foi eluída. **(B)** Análise das 19 frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. **(C)** Preparações da proteína His::RCO1. As setas em preto indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante de 68 kDa. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares aproximados das proteínas em kDa.

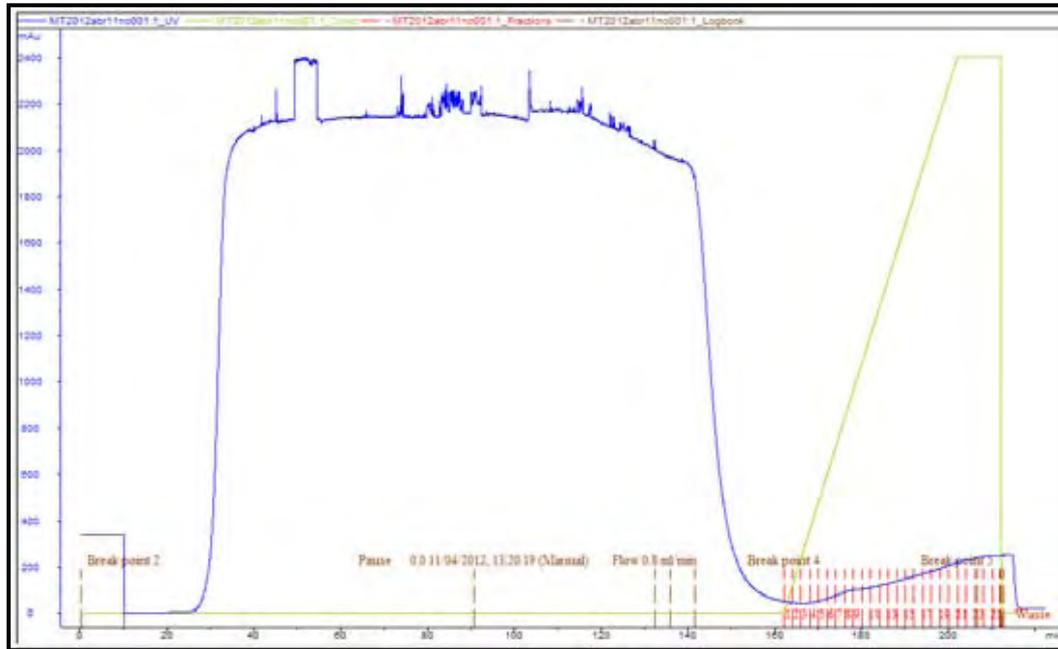
fração 2). As demais frações foram purificadas em resina de cobalto e eluídas em 100, 200 e 300 mM de imidazol. As frações foram concentradas em três porções distintas (Figura 21C, frações 3-5), as quais foram aplicadas em SDS-PAGE 9% e as bandas correspondentes à proteína RCO-1 foram recortadas e enviadas para a produção de anticorpo.

O resultado obtido para a proteína RCM-1 está mostrado na Figura 22, a qual mostra as frações cromatográficas coletadas durante a eluição da proteína em tampão Hepes e gradiente de imidazol de 150 mM - 1 M. O cromatograma (Figura 22A) mostra que não houve a formação de um pico específico referente às frações em que a proteína recombinante foi eluída. Dessa forma, amostras de 40 frações eluídas foram avaliadas em SDS-PAGE 12%. A Figura 22B mostra o perfil das frações 9 a 25, no qual se observa a proteína RCM-1 em todas as frações, em pequena quantidade e com muitos contaminantes. As frações de 16 a 28 foram dialisadas em tampão de diálise, concentradas em quatro frações (Figura 22C) e armazenadas a -80°C, para futuro uso em ensaio de EMSA. A proteína RCM-1 recombinante não foi purificada em boa quantidade para ser enviada para a produção de anticorpo.

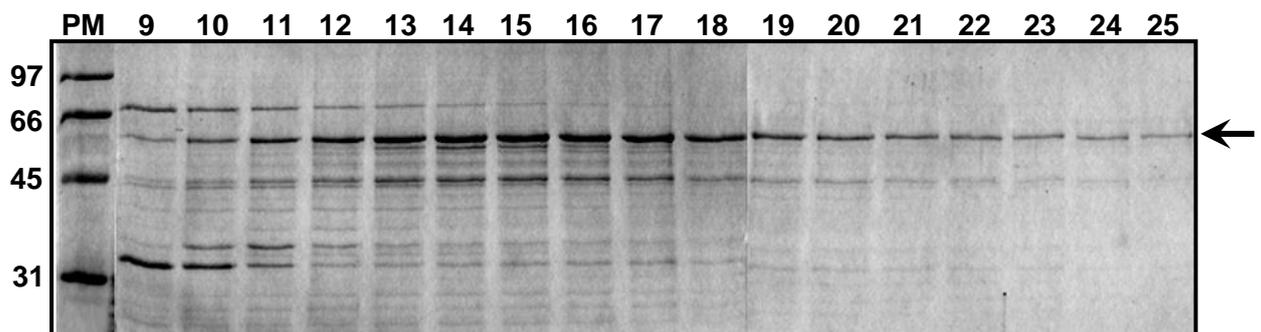
4.11 Ensaio com diferentes fontes de carbono

Como apresentado anteriormente, é provável que RCO-1 e RCM-1 formem um complexo corepressor (OLMEDO et al., 2010), assim como Tup1-Ssn6 de levedura e, como não possuem domínio de ligação a DNA, exercem suas funções devido à capacidade de interagir com fatores de transcrição e com outras proteínas por meio de seus domínios protéicos. Em *S. cerevisiae*, alguns genes são reprimidos em resposta a glicose extracelular. Neste caso, o fator de transcrição Mig1 recruta Tup1-Ssn6 e este complexo se liga a promotores de determinados genes, reprimindo a transcrição (NEHLIN; CARLBERG; RONNE, 1991). Quando se tem uma fonte de carbono não preferencial, Mig1 é fosforilada pela proteína Snf1 no núcleo, permitindo sua translocação citoplasmática, e a interação com Tup1-Ssn6 é rompida, desfazendo-se a repressão pela glicose (CHRONAKIS; GLIGORIS; TZAMARIAS, 2004). Estudos da regulação por glicose em fungos filamentosos focam na repressão transcricional e, em *A. nidulans*, CreA é a proteína ortóloga a Mig1, e ambas reconhecem sequências de DNA similares (EBBOLE, 1998).

A



B



C

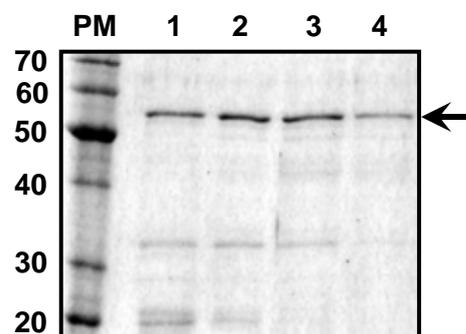


Figura 22- Purificação da proteína His::RCM1 produzida em *E. coli* Rosetta(DE3)pLys-S em maior escala. (A) Perfil de eluição da proteína recombinante em coluna HisTrap, usando gradiente linear de 150 mM a 1 M de imidazol. **(B)** Análise das 17 frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. **(C)** Preparações da proteína His::RCM1. As setas em preto indicam as bandas correspondentes à proteína recombinante de 58,5 kDa. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares aproximados das proteínas em kDa.

O fator de transcrição Mig1 possui dois domínios *zinc finger* tipo Cys₂His₂, constituídos por duas estruturas de folhas β antiparalelas, seguidas de um *hairpin* e uma estrutura em α-hélice com três voltas e meia (BRANDEN; TOOZE, 1999; LUSCOMBE et al., 2000). Em *N. crassa* a proteína CRE-1 tem 71% de identidade com Mig1 de *S. cerevisiae*, possui os mesmos domínios de interação a DNA e, recentemente, foi mostrada estar envolvida no mecanismo de repressão catabólica por carbono (SUN; GLASS, 2011).

A partir destes dados, realizamos ensaios com diferentes fontes de carbono utilizando as linhagens selvagem, *rco-1^{KO}*, *rcm-1^{RIP}* e *cre-1^{KO}*, sendo que a última vem sendo estudada por uma aluna de Pós-Doutorado. Foi realizado o crescimento das linhagens a 30°C em meio VM acrescido de frutose (fonte não repressora). Depois de 24 h, os micélios foram coletados e divididos em quatro partes. Uma delas foi congelada (amostra controle, FRU) e as três outras partes foram transferidas para os diferentes meios de cultura: VM líquido acrescido de glicose 2% (fonte repressora), VM acrescido de xilose 2% e VM acrescido de glicerol 2% (não repressores). Foram coletadas amostras em 2, 4 e 8 h após inoculação. Os micélios de cada linhagem, nas diferentes condições, foram utilizados para a quantificação de glicogênio e extração de RNA total para análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn*. Foram realizados 2-3 experimentos independentes. Para a linhagem *rcm-1^{RIP}* foi feito um único experimento.

Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 23. De uma maneira geral, verificamos que as linhagens mutantes apresentaram alteração no acúmulo do glicogênio quando comparadas à linhagem selvagem, em diferentes fontes de carbono preferenciais e alternativas (Figura 23A). A linhagem mutante *cre-1^{KO}* apresentou conteúdo de glicogênio superior ao da linhagem selvagem em todos os tempos e em todas as fontes de carbono analisadas. Por outro lado, as linhagens mutantes *rco-1^{KO}* e *rcm-1^{RIP}* mostraram um perfil de acúmulo de glicogênio similar ao da linhagem selvagem. Todas as linhagens mostraram um acúmulo reduzido quando a fonte de carbono foi glicerol ou xilose, o que é esperado uma vez que são fontes de carbono não preferenciais. É importante salientar o comportamento da linhagem *rco-1^{KO}*, a qual não mostrou um efeito repressor de glicose sobre o acúmulo de glicogênio como o apresentado pela linhagem selvagem (compare os níveis no tempo de 8 h na presença de glicose).

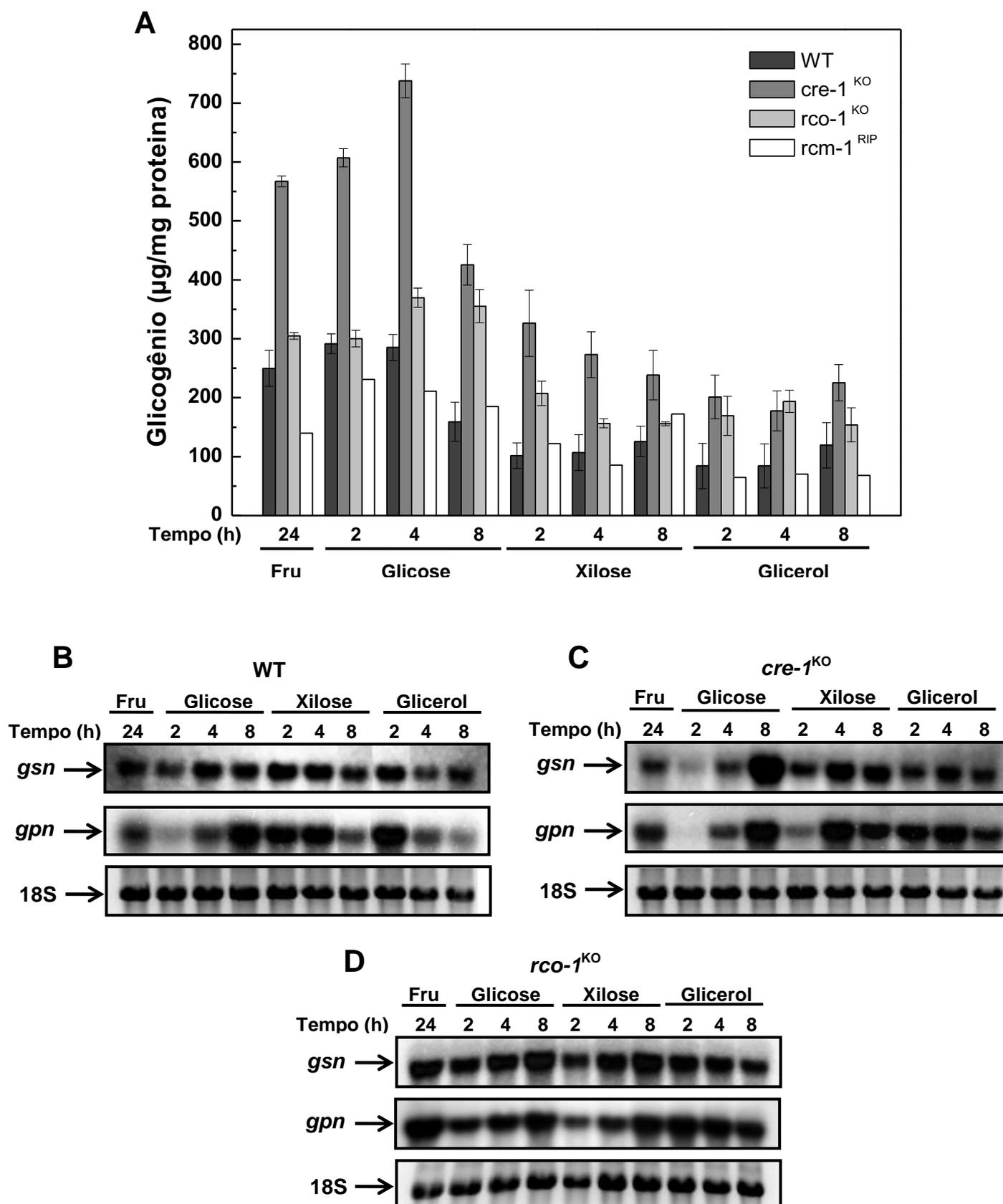


Figura 23- Acúmulo de glicogênio e expressão dos genes *gsn* e *gpn* em ensaio com diferentes fontes de carbono utilizando as linhagens selvagem, *cre-1*^{KO}, *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP}. (A) Análise das linhagens em relação ao conteúdo de glicogênio. (B) Expressão dos genes *gsn* e *gpn* na linhagem selvagem. (C) Expressão dos genes *gsn* e *gpn* na *cre-1*^{KO}. (D) Expressão dos genes *gsn* e *gpn* na *rco-1*^{KO}. Foi usado o RNAr 18S como controle endógeno.

Podemos concluir que o fator de transcrição CRE-1 é um regulador maior e atua como um repressor do acúmulo de glicogênio, pois na sua ausência os níveis estão aumentados. Podemos sugerir que no mutante *rco-1*^{KO} as proteínas CRE-1, RCM-1 e outras poderiam formar um complexo repressor (mesmo na ausência de RCO-1) e/ou a ausência de RCO-1 estaria afetando outras vias metabólicas, como descrito para Tup1-Ssn6, e assim causaria redução dos níveis do carboidrato. Já o mutante *rcm-1*^{RIP}, que produz uma proteína RCM-1 truncada com possível atividade repressora residual, apresentou um perfil de acúmulo de glicogênio muito parecido à linhagem selvagem, com exceção dos níveis apresentados no meio com frutose em 24 h. Por este motivo foi realizada uma única análise do conteúdo de glicogênio e os níveis dos transcritos *gsn* e *gpn* não foram analisados nesta linhagem, por se imaginar que apresentariam comportamentos similares aos da linhagem selvagem.

Tentativas de correlação do conteúdo de glicogênio com a expressão dos genes *gsn* e *gpn* foram realizadas. O objetivo desse experimento foi verificar se a desregulação do acúmulo de glicogênio apresentado pelas linhagens mutantes ocorreu devido à expressão alterada dos genes *gsn* e/ou *gpn*, bem como levantar hipóteses se o fator de transcrição CRE-1 e o cofator de transcrição RCO-1 poderiam estar envolvidos na regulação da expressão dos mesmos.

De uma maneira geral, a linhagem *cre-1*^{KO} mostrou alguma alteração na expressão dos genes, principalmente quando a fonte de carbono foi glicose (Figura 23C). Nesta linhagem foi observada uma maior expressão dos dois genes no tempo de 8 h de crescimento. Entretanto, a queda no conteúdo de glicogênio observada neste tempo não pode ser correlacionada com a expressão dos dois genes, uma vez que ambos apresentaram aumento na expressão. É importante salientar que no tempo de 8 h o nível de glicose deve estar reduzido, o que explicaria a diminuição no conteúdo de glicogênio. Na linhagem mutante *rco-1*^{KO} a expressão dos dois genes se manteve praticamente não alterada em todas as fontes de carbono e nos diferentes tempos (Figura 23D) quanto comparado a linhagem selvagem (Figura 23B), portanto fica difícil correlacionar a expressão dos dois genes com o acúmulo de glicogênio. Estes resultados são preliminares, porém se observa a participação de CRE-1 na regulação do catabolismo de glicogênio em diferentes fontes de carbono.

A quantidade de glicogênio acumulada em um determinado momento e em determinada fonte de carbono é resultante da ação coordenada das duas enzimas

de síntese e degradação. Ambas são fortemente reguladas por eventos de fosforilação, o qual pode variar dependendo da condição ambiental. Além disso, a expressão dos genes que codificam ambas enzimas também sofre influência de fatores ambientais. Finalizando, outras enzimas do metabolismo do carboidrato podem estar sendo reguladas pelas proteínas CRE-1 e RCO-1.

4.12 Análise da ligação DNA-proteína por EMSA

O fator de transcrição Mig1 de *S. cerevisiae* (ortóloga a CRE-1 de *N. crassa*) se liga à sequência consenso 5'-GGGG-3' (LUNDIN; NEHLIN; RONNE, 1994) e foram identificados cinco sítios de ligação de DNA para esta proteína no promotor do gene *gsn* e cinco no promotor *gpn* (CUPERTINO, 2011). O fator de transcrição CreA de *A. nidulans* se liga à sequência consenso 5'-SYGGRG-3' (S= G ou C, Y= T ou C, R= A ou G) (STRAUSS et al., 1999) presente nos promotores de genes. Recentemente, foi descrito que o *motif* de ligação de CreA foi encontrado nos promotores de genes que codificam proteínas relacionadas à utilização de fontes de carbono, tais como celulolíticas e transportadores de açúcar em *N. crassa* (SUN; GLASS, 2011). Entretanto, o *motif* exato de CRE-1 em *N. crassa* não foi identificado. Alguns trabalhos mostram que CreA pode ser auto-regulada transcricionalmente através da ligação à região promotora do gene *creA* (STRAUSS et al., 1999). Além da regulação transcricional, tanto CreA como Mig1 podem ser reguladas negativamente por meio da fosforilação pelas proteínas quinases dependente de AMP cíclico (AMPK) (VAUTARD-MEY; FEVRE, 2000) e Snf1 (OSTLING; RONNE, 1998).

Ensaio de ligação DNA-proteína foram realizados com o objetivo de verificar se a proteína CRE-1 de *N. crassa*, produzida na forma recombinante, é capaz de reconhecer e se ligar às sequências consenso presente no promotor do gene *gsn*, em ensaios de retardamento em gel (EMSA). Além disso foi verificado se a ligação de CRE-1 ao sítio consenso no DNA é dependente das proteínas RCO-1 e RCM-1, ou seja, se CRE-1 se ligaria ao DNA e depois recrutaria RCO-1/RCM-1 ou se a ligação de CRE-1 ao DNA somente ocorre quando RCO-1/RCM-1 esteja formando um complexo com CRE-1. Desta maneira, um fragmento de DNA marcado (sonda) do promotor *gsn*, contendo dois *motifs* 5'-SYGGRG-3' adjacentes e correspondentes ao sítio de ligação do fator de transcrição CreA de *A. nidulans* e um *motif*

correspondente ao sítio de ligação do fator de transcrição Mig1 de *S. cerevisiae*, foi testado quanto à capacidade de ligação das proteínas.

A interação DNA-proteína foi verificada com diferentes combinações das proteínas recombinantes que foram incubadas e mantidas em contato por 30 min no gelo: CRE1, RCO1, RCM1, CRE1+RCO1, CRE1+RCM1, RCO1+RCM1, CRE1+RCO1+RCM1. Em seguida, foi adicionada a sonda marcada e a reação foi mantida por 20 min à temperatura ambiente. Após incubação com a sonda, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante. O resultado obtido foi negativo, ou seja, não foi observado a formação de complexo DNA-proteína, mesmo na presença das proteínas RCO-1 e RCM-1. Como a proteína CreA de *A. nidulans* é uma proteína descrita como auto-regulável, Cupertino (2011) realizou uma busca por sítios contendo a sequência 5'-SYGGRG-3' na região 5'-flaqueadora do gene *cre-1* de *N. crassa* e foram encontrados 10 possíveis sítios para a proteína CreA. Um fragmento de DNA do promotor *cre-1* contendo três *motifs* CreA foi marcado e utilizado como sonda com três diferentes preparações da proteína recombinante His::CRE1, porém o resultado foi negativo. Foram testados diferentes *motifs* CreA na região promotora do gene *gsn* e todos os resultados foram negativos (CUPERTINO, 2011).

A ligação de CRE-1 na ausência das prováveis proteínas parceiras RCO-1 e RCM-1 era um resultado esperado, uma vez que Strauss et al. (1999) demonstraram interação DNA-proteína, por EMSA, usando uma proteína CreA recombinante de *A. nidulans* fusionada a GST e como sonda um fragmento do promotor *creA* que continha dois *motif* CreA. Como Cupertino (2011) demonstrou que a proteína His::CRE1 não se ligou ao promotor do gene *gsn* e tampouco ao promotor do gene *cre-1*, foi analisado se CRE-1 era dependente de RCO-1 e RCM-1 para sua ligação do DNA. Foi usado uma quantidade relativamente grande de proteínas recombinantes (20 µg de cada proteína/reação) com o intuito de favorecer as interações proteína-proteína e também proteína-DNA, porém nossos resultados foram negativos.

Os resultados negativos podem ser compreendidos considerando que: 1) a proteína CRE-1 utilizada não esteja em sua conformação ativa; uma outra forma de fusão poderia ser avaliada, 2) as proteínas recombinantes RCO-1 e RCM-1 não estejam em suas formas ativas ou em quantidades suficientes para promover a interação proteína-proteína, 3) a ligação da proteína CRE-1 ao DNA seja

dependente de alguma outra proteína parceira, 4) a ligação de CRE-1 ao DNA só ocorreria em condições específicas, 5) o *motif* consenso de CRE-1 pode não ser o mesmo de CreA e Mig1, e 6) o ensaio por EMSA talvez não seja a melhor maneira de observar a interação entre as proteínas CRE-1/RCO-1/RCM-1.

Portanto, uma preparação da proteína CRE-1 fusionada a GST será realizada, levando em consideração que Strauss et al. (1999) demonstraram interação proteína-DNA usando CreA recombinante de *A. nidulans* fusionada a GST. Talvez a proteína fusionada a GST permita uma conformação adequada e ativa. A interação CRE-1/RCO-1/RCM-1 não pode ser observada por EMSA, mas estes resultados não excluem a possibilidade de que sejam parceiras. Ensaio de duplo-híbrido em levedura serão realizados para confirmar esta interação.

PARTE 2 - Estudos de correlação entre metabolismo de glicogênio e relógio biológico em *N. crassa*

4.13 Linhagens utilizadas em ensaios de relógio biológico e indução por luz

A linhagem selvagem FGSC#2489, usada no sequenciamento do genoma do fungo foi utilizada em nossos experimentos de relógio biológico e indução por luz. As linhagens mutantes *rco-1*^{KO}, *rcm-1*^{RIP} e 9739^{KO}, juntamente com a linhagem FGSC#9718 (a, *mus-51::bar^r*), foram usadas nos experimentos de crescimento linear em condições que mimetizam o relógio biológico.

4.14 Determinação da taxa de crescimento linear das linhagens mutantes em comparação à selvagem em experimentos de relógio biológico

A taxa de crescimento linear das linhagens mutantes, comparada à linhagem selvagem (FGSC#9718) foi avaliada em *race tubes*, os quais são longos tubos de vidro (40 cm de comprimento x 2 cm de diâmetro) contendo as duas extremidades curvadas em um ângulo de aproximadamente 45°. As três linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem, foram inoculadas em uma das extremidades do tubo, incubados sob luz branca durante uma noite. Após este período foi marcado a frente de crescimento (tempo zero) e, depois, os tubos foram incubados no escuro.

Este procedimento de exposição à luz e depois incubação no escuro zera o relógio biológico, pois durante o período claro os osciladores do relógio são expressos e desenvolvem determinadas funções, e no escuro estes osciladores sincronizam tais respostas ao relógio biológico. A frente de crescimento foi marcada a cada 12 h sob luz vermelha, evitando a exposição à luz branca. A distância de crescimento foi medida (cm) e expressa em função das horas de crescimento até que as linhagens atingissem a outra extremidade do tubo. Este ensaio foi realizado em triplicatas biológicas e experimentais.

A Figura 24 mostra as taxas de crescimento cumulativo das linhagens. Os resultados mostram que todas as linhagens mutantes apresentaram retardamento no crescimento, não atingindo a extremidade do tubo em 96 h. A linhagem mutante na ORF NCU09739 apresentou um menor retardamento no crescimento em comparação às outras linhagens. As linhagens *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP} apresentaram um grande retardamento no crescimento linear em comparação a selvagem. A linhagem selvagem após 96 horas atingiu 33,7 cm de crescimento, a linhagem 9739^{KO} atingiu 22,3 cm, a linhagem *rco-1*^{KO} atingiu 4,7 cm e a linhagem *rcm-1*^{RIP} atingiu 3,5 cm.

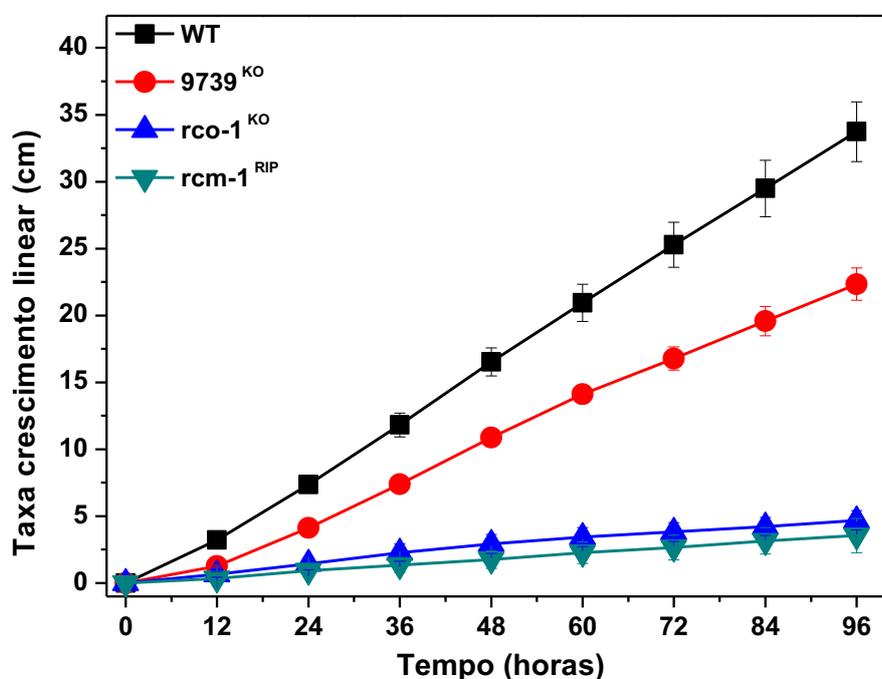


Figura 24- Análise do crescimento linear das linhagens selvagem (FGSC#9718) e mutantes (9739^{KO}, *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP}) em *race tubes*. As linhagens foram inoculadas em uma das extremidades e mantidas no escuro. O crescimento foi medido através da marcação da frente micelial a cada 12 h até a outra extremidade do tubo.

Também foram analisadas as taxas de crescimento linear das linhagens selvagem e mutantes, em *race tubes*, sob outras condições: incubando no escuro durante uma noite e transferindo para condição de luz e, em outra condição, mantendo os tubos sob condição ambiente (variação entre luz e escuro ambiental), a fim de determinar se estas variações afetariam o crescimento linear e qual seria a atuação do relógio biológico nestas linhagens. A linhagem selvagem FGSC#9718 e a linhagem mutante 9739^{KO} apresentaram as mesmas taxas de crescimento linear em todas as condições analisadas (dados não mostrados), portanto o crescimento linear nestas linhagens não foi afetado pelo relógio biológico.

As linhagens mutantes *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP} apresentaram crescimento linear alterado em função das diferentes condições de crescimento. A linhagem *rco-1*^{KO} apresentou maior crescimento no escuro (condição que mimetiza o relógio biológico), sendo que na condição de claro e na condição ambiental houve uma redução de 15% e 23% no crescimento linear, respectivamente. A linhagem *rcm-1*^{RIP} também apresentou maior crescimento na condição de escuro (relógio biológico), sendo que na condição de claro e ambiental houve uma redução de 30% e 11% no crescimento linear, respectivamente (dados não mostrados). O crescimento linear destas duas linhagens foi muito alterado em relação à linhagem selvagem e por meio deste experimento podemos concluir que o relógio biológico afeta no crescimento linear destas linhagens, aumentando a extensão das hifas.

Muitos estudos têm sido realizados mostrando alterações morfológicas em função da ritmicidade do relógio biológico. Sabe-se que *N. crassa* apresenta um relógio biológico de 22,5 h (revisado em BAKER; LOROS; DUNLAP, 2012) e o ritmo de acúmulo de mRNA em células sincronizadas ao relógio pode ser observado com um período de 20-24 h (CORREA et al., 2003). Em adição, a ramificação das hifas em *N. crassa* é rítmica com período em torno de 24 h (SUSSMAN; DURKEE; LOWRY, 1965), enquanto que, nas mesmas linhagens, o ritmo da conidiação é expressa com 22 h (FELDMAN; HOYLE, 1971). Algumas linhagens não respondem ao relógio e outras respondem de uma maneira muito baixa, por este motivo uma mutação no *locus band* (*bd*) aumentou o ritmo circadiano da conidiação, sem afetar o relógio biológico em si (SARGENT; BRIGGS; WOODWARD, 1966). Os mutantes *bd* apresentam uma acentuada conidiação rítmica que pode ser vista como uma série de bandas de regiões de conidiação (bandeamento), uma vez que ocorre a conidiação em um determinado período, depois as hifas se estendem, depois

novamente ocorre conidiação, e assim por diante, e essa ritmicidade é observada em linhagens sincronizadas ao relógio.

Para determinar se mutantes que tem conidiação bloqueada apresentam algum efeito sob o relógio biológico, Brody et al. (2010) usaram linhagens *rco-1*, que apresentam repressão da conidiação, e cruzaram com a linhagem *bd*, isolando duplos mutantes (*bd rco-1*). Diferentes fenótipos foram observados: 1) alguns duplos mutantes conidiaram mais que a linhagem *rco-1* e outros menos que a linhagem *bd*; 2) os duplos mutantes apresentaram taxa de crescimento menor do que a linhagem *rco-1*, devido à mutação *bd*; 3) e apresentaram conidiação rítmica no escuro, em placas contendo maltose como fonte de carbono. Inesperadamente, os duplos mutantes apresentaram periodicidade alterada da conidiação, ou seja, o período entre duas conidiações foi bem mais alto do que observado na linhagem *bd*, e o processo de conidiação foi mais sensível em diversas condições analisadas (BRODY et al., 2010). Com base nestes resultados mais estudos acerca das proteínas RCO-1 e RCM-1 devem ser feitos a fim de determinar suas funções no relógio biológico de *N. crassa*.

4.15 Determinação do acúmulo de glicogênio e avaliação da expressão dos genes *gsn*, *gpn* e *ccg-1* em resposta ao relógio biológico

Trabalhos têm sido publicados mostrando uma correlação entre a expressão de determinados genes e o ritmo circadiano em *N. crassa* (SHINOHARA et al., 2002; BELL-PEDERSEN; DUNLAP; LOROS, 1996). Recentemente, alguns trabalhos relataram uma conexão entre relógio biológico e a energia proveniente do metabolismo em células de mamíferos (DOI; OISHI; ISHIDA, 2010; MARCHEVA et al., 2010). Como alguns fatores e cofatores de transcrição identificados (GONÇALVES et al., 2011) como envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio também respondem à luz e/ou relógio biológico, é de grande interesse verificar se o acúmulo de glicogênio segue o ritmo circadiano em *N. crassa*. Anteriormente, Correa et al. (2003) mostraram que o gene que codifica para glicogênio fosforilase (*gpn*) segue o ritmo do relógio biológico, em uma análise por *microarray*.

No período de um dia, um organismo pode ter um determinado comportamento nas 12 primeiras horas (*early morning*) e oscilar esse

comportamento nas 12 horas seguintes (*late night*), seguindo a ritmicidade do relógio biológico. Experimentos foram montados de maneira a obtermos micélios em diferentes tempos do relógio, com o objetivo de verificar se os níveis do carboidrato e a expressão dos genes envolvidos no metabolismo de glicogênio seguem o ritmo do relógio biológico do fungo, da seguinte maneira: conídios da linhagem selvagem FGSC#2489 e da linhagem FGSC#9718 foram inoculados em meio HGV líquido em placa de Petri e mantidos por 2 dias em luz constante, para formar um “tapete micelial” consistente. Discos miceliais foram transferidos para frascos contendo HGV líquido e expostos à luz. Amostras foram transferidas para o escuro em tempos determinados a fim de manter a cultura no escuro por diferentes períodos (Quadro 5). Os micélios foram coletados sob luz vermelha, evitando a exposição à luz branca, e armazenados a -80°C . Foram realizados 4-5 experimentos independentes.

Quadro 5 – Esquema da transferência do claro para o escuro no ensaio de relógio biológico.

Tempos no escuro (horas)	Exposição à luz 1º dia	Transferência para o escuro			Coleta no escuro 3º dia
		1º dia	2º dia	3º dia	
52	10:00 am	14:00 pm			18:00 pm
48	10:00 am	18:00 pm			18:00 pm
44	10:00 am	14:00 pm			10:00 am
40	10:00 am	18:00 pm			10:00 am
36	10:00 am	22:00 pm			10:00 am
32	10:00 am		10:00 am		18:00 pm
28	10:00 am		14:00 pm		18:00 pm
24	10:00 am		18:00 pm		18:00 pm
20	10:00 am		14:00 pm		10:00 am
16	10:00 am		18:00 pm		10:00 am
12	10:00 am		22:00 pm		10:00 am
8	10:00 am			10:00 am	18:00 pm

O conteúdo de glicogênio foi quantificado nas amostras sincronizadas e está mostrado na Figura 25. É conhecido que o ritmo do relógio biológico em *N. crassa* varia de 22 a 24 h, portanto se um determinado processo celular segue o ritmo circadiano ele tem que obedecer o período de tempo acima mencionado. Quando o fungo é crescido sob luz constante e, em seguida, é transferido para o escuro, o relógio biológico é sincronizado de maneira que a cada 22-24 h subsequentes temos o período de 1 dia.

A Figura 25A mostra o acúmulo de glicogênio na linhagem selvagem FGSC#2489 e a Figura 25B na linhagem FGSC#9718. Em ambas as linhagens o conteúdo de glicogênio seguiu o ritmo circadiano, apresentando picos de maior acúmulo nos tempos de 24 e 48 h e menor acúmulo em 20 e 44 h para a linhagem selvagem FGSC#2489 e em 12 e 36 h para a linhagem FGSC#9718. Portanto, o nível de glicogênio sofre influência do relógio biológico, apresentando períodos cíclicos variando em 24 horas. Teoricamente, mostraram maior acúmulo no período *late night*.

A extração de RNA total do micélio da linhagem selvagem FGSC#2489 foi realizada e a expressão dos genes *gsn* e *gpn* foi analisada por *Northern blot* (Figura 26). Fragmentos dos genes *gsn*, *gpn* e *ccg-1* (*clock controlled gene*, controle positivo) foram utilizados como sondas. O gene *ccg-1* é um gene controlado pelo relógio e sua expressão é máxima no período *early morning* (BELL-PEDERSEN; DUNLAP; LOROS, 1996). Há vários *ccgs* que são usados como controles do relógio biológico e eles preferencialmente acumulam durante a transição entre *late night* para *early morning* (BELL-PEDERSEN; DUNLAP; LOROS, 1996). Os transcritos *gsn* e *gpn* apresentaram tamanhos de aproximadamente 3 kb, e o transcrito *ccg-1* (sonda de 216 pb) apresentou tamanho de aproximadamente 0,6 kb. A expressão do gene *ccg-1* (Figura 26) mostra que os experimentos foram conduzidos de maneira correta, uma vez que a expressão do gene segue o ritmo circadiano com períodos de máxima expressão variando entre 20-24 h e no período *early morning* como descrito por Bell-Pedersen; Dunlap; Loros (1996). Em relação à expressão dos genes *gsn* e *gpn* podemos verificar que a ritmicidade não foi tão pronunciada como a observada para o gene *ccg-1*, muito embora seja possível observar que a expressão dos dois genes seguiu o ritmo circadiano (Figura 26). Outros genes envolvidos no metabolismo do carboidrato serão posteriormente analisados.

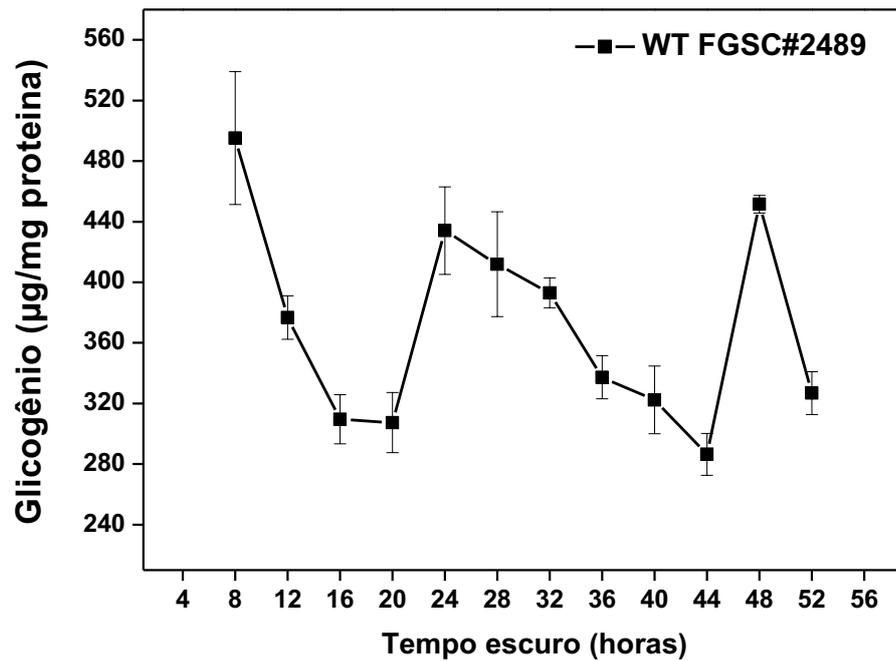
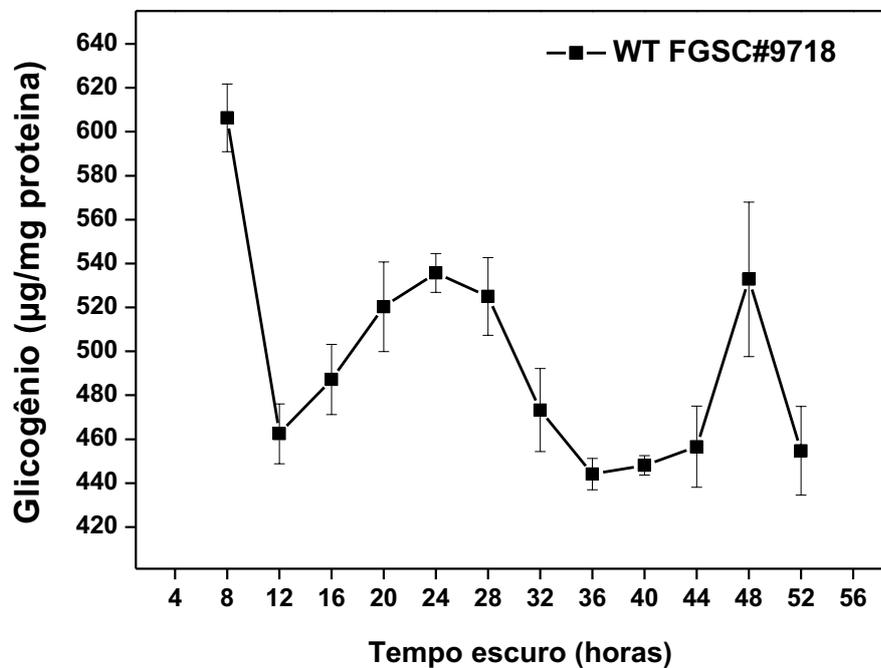
A**B**

Figura 25- Acúmulo de glicogênio em resposta ao relógio biológico. (A) Análise do conteúdo de glicogênio na linhagem FGSC#2489. **(B)** Análise do conteúdo de glicogênio na linhagem FGSC#9718.

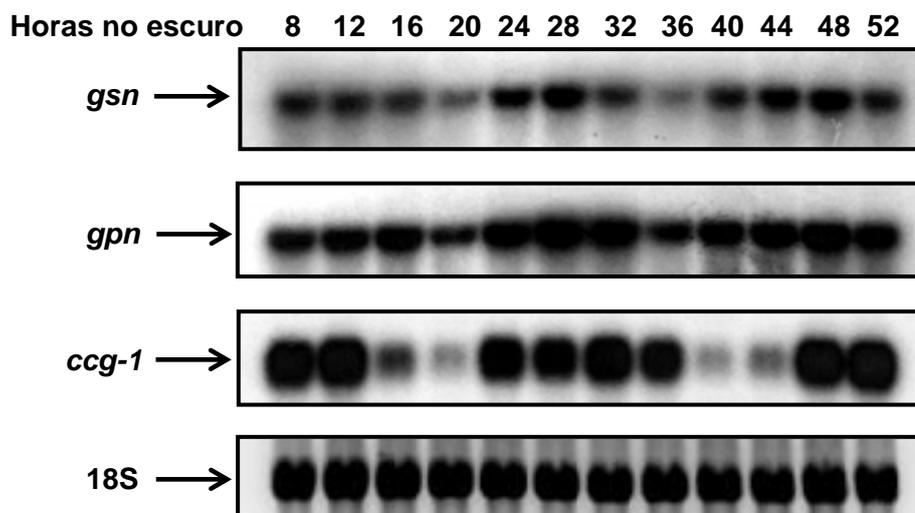


Figura 26- Análise da expressão dos genes *gsn*, *gpn* e *ccg-1* na linhagem selvagem FGSC#2489 em resposta ao relógio biológico. Foi feita a extração de RNA total das diferentes amostras sincronizadas ao relógio biológico e estas foram analisadas em ensaio de *Northern blot*, usando o RNAr 18S como controle endógeno. Foram realizados três experimentos independentes.

4.16 Determinação do acúmulo de glicogênio e avaliação dos genes *gsn*, *gpn* e *ccg-1* em ensaios de indução por luz

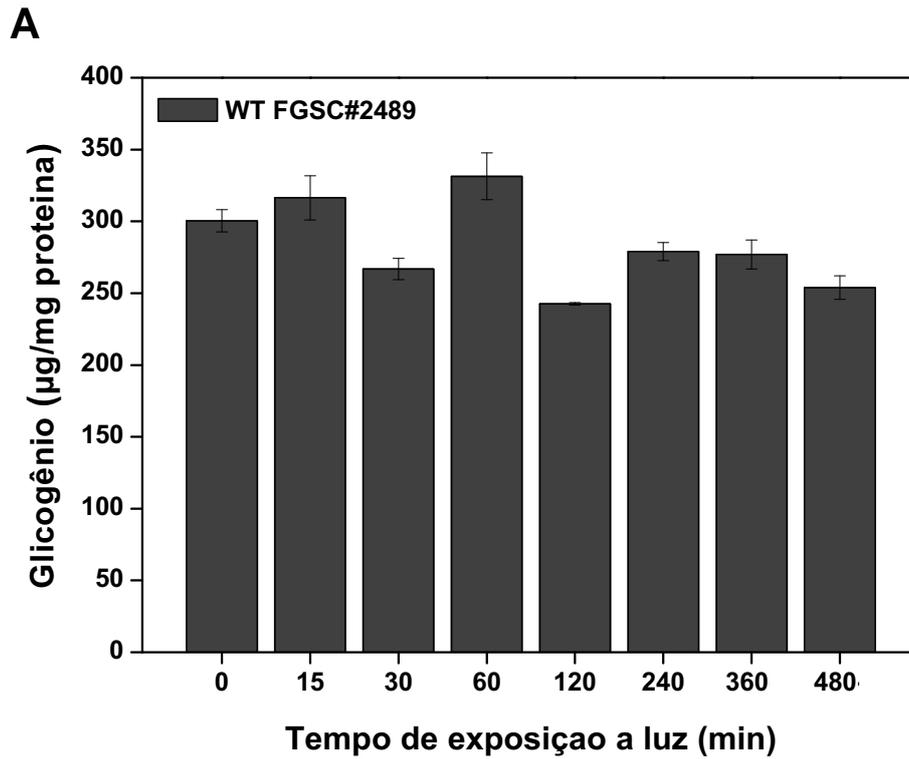
Em *N. crassa* a maioria dos genes regulados pelo relógio também são regulados por luz (SMITH et al., 2010). Como o acúmulo de glicogênio apresentou influência do relógio biológico, por meio de períodos cíclicos variando em 24 h, e os transcritos *gsn* e *gpn* também apresentaram ritmicidade, então se torna necessário avaliar se o acúmulo de glicogênio e a expressão dos genes do metabolismo de glicogênio são induzidos por luz.

Desta maneira foram obtidos micélios em diferentes tempos de exposição a luz, da seguinte maneira: conídios da linhagem selvagem FGSC#2489 foram inoculados em meio VM líquido em placa de Petri e mantidos por 2 dias em escuro constante, para formar um “tapete micelial” consistente. Discos miceliais foram transferidos para frascos contendo VM líquido e mantidos no escuro mais 24 h, em agitação de 100 rpm, 27°C. Todas as amostras foram transferidas para a luz de uma

única vez e coletadas, individualmente, após 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min de exposição à luz. Os micélios coletados foram filtrados e armazenados a -80°C.

A partir dos micélios expostos à luz, foram feitas quantificações do acúmulo de glicogênio e análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn*, cujos resultados são mostrados na Figura 27. O acúmulo de glicogênio se manteve constante durante os diferentes tempos de exposição à luz (Figura 27A), mas a expressão dos genes foi alterada após exposição à luz (Figura 27B). O transcrito *gsn* apresentou um pico de expressão em 30 min e o transcrito *gpn* em 60 min, portanto teoricamente apresentam indução tardia em resposta à indução por luz. A expressão do gene *ccg-1* foi descrita ser regulada por luz (LINDGREN, 1994; ARPAIA et al., 1993), exibe uma indução tardia (ARPAIA et al., 1995) e foi usada como controle positivo em nossos experimentos. O gene *ccg-1* foi altamente induzido por luz, apresentando pico máximo em 1 h após exposição à luz (Figura 27B).

Nossos resultados mostraram que o acúmulo de glicogênio segue o ritmo do relógio biológico assim como a expressão dos genes que codificam as enzimas regulatórias glicogênio sintase (*gsn*) e glicogênio fosforilase (*gpn*), e estes últimos também são induzidos por luz, mostrando serem genes de indução tardia à luz. Estes dados são muito interessantes, promissores e estimulantes, e nos faz acreditar na existência de uma conexão entre a energia proveniente do metabolismo e relógio biológico nos organismos eucariotos. Como continuidade, pretendemos investigar mais profundamente o assunto, buscando entender quais proteínas podem estar envolvidas na regulação do metabolismo de glicogênio quando cultura é sincronizada ao relógio biológico e desta maneira, como os dois processos podem estar conectados.



B

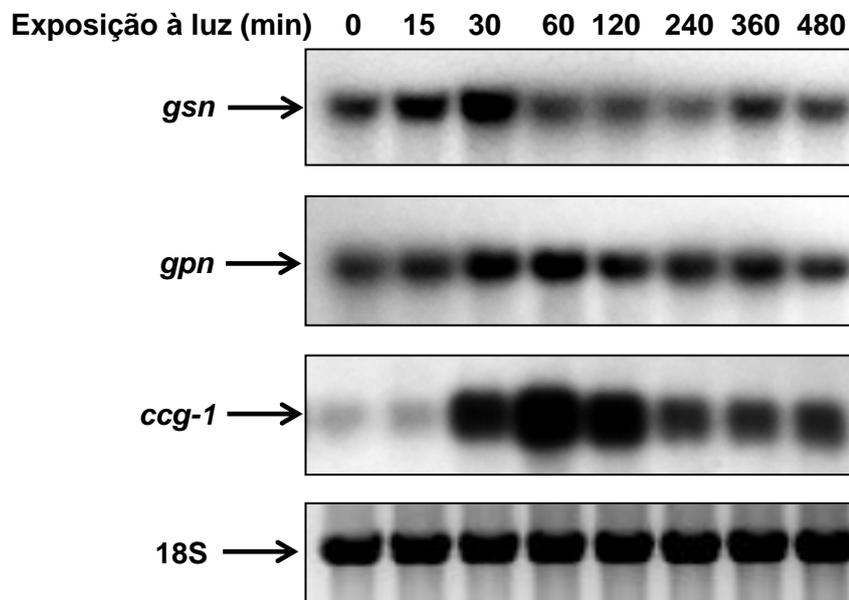


Figura 27- Determinação do acúmulo de glicogênio e da expressão dos genes *gsn*, *gpn* e *ccg-1* na linhagem selvagem FGSC#2489 em resposta à indução por luz. (A) Análise do conteúdo de glicogênio. (B) Análise da expressão dos genes *gsn*, *gpn* e *ccg-1*, usando o RNAr 18S como controle endógeno. Dois experimentos independentes foram realizados, com duplicatas biológicas.

5. Principais Conclusões

As principais conclusões deste trabalho foram:

- As proteínas RCO-1, RCM-1 e a hipotética codificada pela ORF NCU09739 de *N. crassa* estão envolvidas com os processos de extensão das hifas basais e aéreas, pigmentação e conidiação, portanto são requeridas para o crescimento normal e desenvolvimento do fungo.
- Estas proteínas também estão envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio, atuando na regulação da expressão dos genes *gsn* e/ou *gpn* e provavelmente de outros genes.
- O gene que codifica a proteína hipotética ORF NCU09739 foi altamente expresso no início do processo de germinação dos conídios, comprovando a participação da proteína no crescimento vegetativo do fungo. Porém o transcrito 9739 apresentou quase o mesmo tamanho da ORF, sugerindo que o gene NCU09739 tenha regiões 5'- e 3'-UTR pequenas e uma região promotora também relativamente pequena.
- A proteína hipotética recombinante foi produzida em *E. coli* e purificada parcialmente. Novos experimentos deverão ser realizados com a proteína codificada pela ORF NCU09739, a fim de se determinar o *motif* consenso ao qual ela se liga, sua localização celular e sua função específica.
- A partir dos ensaios de fontes de carbono, conclui-se que o fator de transcrição CRE-1 é um regulador maior e atua como um repressor do acúmulo de glicogênio. Entretanto, as proteínas RCO-1 e RCM-1 parecem não fazer parte do complexo repressor no metabolismo deste carboidrato.
- As proteínas recombinantes CRE-1, RCO-1 e RCM-1 fusionadas a histidina não foram capazes de formar complexos DNA-proteína quando um fragmento de DNA do promotor do gene *gsn* contendo sítios de ligação para as proteínas CreA/Mig1 foi analisado.

- Em ensaio de crescimento linear, as linhagens mutantes *rco-1*^{KO} e *rcm-1*^{RIP} apresentaram crescimento afetado quando as culturas foram submetidas às condições que mimetizaram o relógio biológico.
- O acúmulo de glicogênio deve estar conectado ao relógio biológico em *N. crassa*, apresentando períodos cíclicos variando em 24 horas (maior acúmulo no período *late night*). A expressão dos genes *gsn* e *gpn* também segue o ritmo circadiano, porém a ritmicidade não foi tão pronunciada quanto a observada para o gene *ccg-1* (*clock controlled gene-1*).
- Em ensaios de indução por luz, o acúmulo de glicogênio se manteve constante durante os diferentes tempos de exposição à luz, mas a expressão dos genes *gsn* e *gpn* variou após exposição à luz, mostrando que ambos os genes são induzidos por luz em *N. crassa*. O transcrito *gsn* apresentou um pico de expressão em 30 min e o transcrito *gpn* em 60 min, portanto ambos são genes de indução tardia.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with IMAGEJ. **Biophot. Int.**, v. 11, n. 7, p. 36-42, July 2004.
- ADAMS, T. H.; WIESER, J. K.; YU, J. H. Asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, n. 1, p. 35-54, Mar. 1998.
- ALBERTS, B. et al. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. 1463 p.
- ALDABBOUS, M. S. et al. The *ham-5*, *rcm-1* and *rco-1* genes regulate hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Microbiology**, v. 156, n. 9, p. 2621-2629, Sept. 2010.
- ALONSO, M. D. et al. A new look at the biogenesis of glycogen. **FASEB J.**, v. 9, n. 12, p. 1126-1137, Sept. 1995.
- ARPAIA, G. et al. The interplay of light and the circadian clock. Independent dual regulation of clock-controlled gene *ccg-2* (*eas*). **Plant Physiol.**, v. 102, n. 4, p. 1299-1305, Aug. 1993.
- ARPAIA, G. et al. Light induction of the clock-controlled gene *ccg-1* is not transduced through the circadian clock in *Neurospora crassa*. **Mol. Gen. Genet.**, v. 247, n. 2, p. 157-163, Apr. 1995
- ARPAIA, G. et al. Involvement of protein kinase C in the response of *Neurospora crassa* to blue light. **Mol. Gen. Genet.**, v. 262, n. 2, p. 314-322, Sept. 1999.
- BALASUBRAMANIAN, B.; LOWRY, C. V.; ZITOMER, R. S. The Rox1 repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* hypoxic genes is a specific DNA-binding protein with a high-mobility-group motif. **Mol. Cell. Biol.**, v. 13, n. 10, p. 6071-6078, Oct. 1993.
- BAKER, C. L.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. The circadian clock of *Neurospora crassa*. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 1, p. 95-110, Jan. 2012.
- BALLARIO, P. et al. White collar-1, a central regulator of blue light responses in *Neurospora*, is a zinc finger protein. **EMBO J.**, v. 15, n. 7, p. 1650-1657, Apr. 1996.
- BALLARIO, P. et al. Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 3, p. 719-729, Aug. 1998.
- BARBOSA, L. C. B. **Caracterização parcial dos sítios de fosforilação da enzima glicogênio sintase de *Neurospora crassa***. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

BASKARAN, S. et al. Multiple glycogen-binding sites in eukaryotic glycogen synthase are required for high catalytic efficiency toward glycogen. **J. Biol. Chem.**, v. 286, n. 39, p. 33999-34006, Aug. 2011.

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

BELL-PEDERSEN, D.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. Distinct cis-acting elements mediate clock, light, and development regulation of the *Neurospora crassa eas (ccg-1)* gene. **Mol. Cell Biol.**, v. 16, n. 2, p. 513-521, Feb. 1996.

BERTOLINI, M. C. et al. Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa*. In: WITZANY, G. **Biocommunication of fungi**. Dordrecht: Springer Science, 2012. Cap. 2, p. 39-56.

BISTIS, G. N.; PERKINS, D. D.; READ, N. D. Different cell type in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newls.**, v. 50, p. 17-19, Dec. 2003.

BLACKWELL, M. The fungi: 1, 2, 3 ... 5.1 million species. **Am. J. Bot.**, v. 98, n. 3, p. 42-438, Mar. 2011.

BORKOVICH, K. A. et al. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 1, n. 68, p. 1-108, Mar. 2004.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. New York: Garland Publishing, 1991. 302 p.

BRANDEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999. 410 p.

BRAUN, B. R.; JOHNSON, A. D. Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor Tup1. **Science**, v. 277, n. 5322, p. 105-109, July 1997.

BRODY, S. et al. Circadian rhythms in *Neurospora crassa*: downstream effectors. **Fungal Genet. Biol.**, v. 47, n. 2, p. 159-168, Feb. 2010.

CAMBARERI, E. B. et al. Repeat-induced G-C to A-T mutations in *Neurospora*. **Science**, v. 244, n. 4912, p. 1571-1575, June 1989.

CARLSON, M. Genetics of transcriptional regulation in yeast: connections to the RNA polymerase II CTD. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 1-23. Nov. 1997.

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

CHEN, C. H.; LOROS, J. J. *Neurospora* sees the light: light signaling components in a model system. **Commun. Integr. Biol.**, v. 2, n. 5, p. 448-451, Sept./Oct. 2009.

CHEN, C. H.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. Neurospora illuminates fungal photoreception. **Fungal Genet. Biol.**, v. 47, n. 11, p. 922-929, Nov. 2010.

CHEN, C. H. et al. Genome-wide analysis of light-inducible responses reveals hierarchical light signalling in Neurospora. **EMBO J.**, v. 28, n. 8, p. 1029-1042, Apr. 2009.

CHENG, C. et al. Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 15, n. 12, p. 6632-6640, Dec. 1995.

CHENG, P.; YANG, Y.; LIU, Y. Interlocked feedback loops contribute to the robustness of the Neurospora circadian clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 13, p. 7408-7413, June 2001.

CHENG, P. et al. Coiled-coil domain-mediated FRQ–FRQ interaction is essential for its circadian clock function in Neurospora. **EMBO J.**, v. 20, n. 1-2, p. 101-108, Jan. 2001.

CHENG, P. et al. Regulation of the Neurospora circadian clock by an RNA helicase. **Genes Dev.**, v. 19, n. 2, p. 234-241, Jan. 2005.

CHRONAKIS, M.; GLIGORIS, T.; TZAMARIAS, D. The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. **EMBO Rep.**, v. 5, n. 4, p. 368-372, Apr. 2004.

COLLETT, M. A. et al. Light and clock expression of the Neurospora clock gene frequency is differentially driven by but dependent on WHITE COLLAR-2. **Genetics**, v. 160, n. 1, p. 149-158, Jan. 2002.

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

COLOT, H. V. et al. A high throughput gene knockout procedure for Neurospora reveals functions for multiple transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 103, n. 27, p. 10352-10357, July 2006.

COOPER, G. M. **The cell, a molecular approach**. 2nd ed. Washington: ASM Press, 2000. 689 p.

CORREA, A. et al. Multiple oscillators regulate circadian gene expression in Neurospora. **PNAS**, v. 100, n. 23, p. 13597-13602, Nov. 2003.

CORROCHANO, L. M. et al. Light and developmental regulation of the gene *con-10* of *Neurospora crassa*. **Dev. Biol.**, v. 167, n. 1, p. 190-200, Jan. 1995.

CROSTHWAITE, S. K. et al. Neurospora *wc-1* and *wc-2*: transcription, photoresponses, and the origins of circadian rhythmicity. **Science**, v. 276, n. 5313, p. 763-769, May 1997.

- CUPERTINO, F. B. **Caracterização funcional de fatores de transcrição envolvidos na regulação do metabolismo de *Neurospora crassa***. 2011. 182 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2011.
- CURY, A. **O futuro da humanidade: a saga de Marco Polo**. Rio de Janeiro: Sextante, 2005. p. 12.
- D'ANDREA, L. D.; REGAN, L. TPR proteins: the versatile helix. **Trends Biochem. Sci.**, v. 28, n. 12, p. 655-662, Dec. 2003.
- 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, n. 5, p. 1192-1199, Mar. 1998.
- DAVIS, R. H. **Neurospora: contributions of a model organism**. New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.
- DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. *Neurospora*: a model of model microbes. **Nature Rev. Genet.**, v. 3, n. 5, p. 397-403, May 2002.
- DEGLI-INNOCENTI, F.; POHL, U.; RUSSO, V. E. A. Photoinduction of protoperithecia in *Neurospora crassa* by blue light. **Photochem. Photobiol.**, v. 37, n. 1, p. 49-51, Jan. 1983.
- DE PAULA, R. M. et al. Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. **Mol. Genet. Genomics**, v. 267, n. 2, p. 241-253, Apr. 2002.
- DE PAULA, R. M. et al. GNN is a self-glucosylation protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 435, n. 1, p. 112-124, Mar. 2005a.
- DE PAULA, R. M. et al. Biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogenin (GNN), the self-glucosylating initiator of glycogen synthesis. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 10, p. 2208-2214, Apr. 2005b.
- DE VIT, M. J. et al. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. **Mol. Biol. Cell**, v. 8, n. 8, p. 1603-1618, Aug. 1997.
- DOI, R.; OISHI, K.; ISHIDA, N. CLOCK regulates circadian rhythms of hepatic glycogen synthesis through transcriptional activation of *Gys2*. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 29, p. 22114-22121, Apr. 2010.
- DUNLAP, J. C. et al. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Adv. Genet.**, v. 57, n. 1, p. 49-96, Mar. 2007.
- EBBOLE, D. J. Carbon catabolite repression of gene expression and conidiation in *Neurospora crassa*. **Fungal Gen. Biol.**, v. 25, n. 1, p. 15-21, Oct. 1998.

EDMONDSON, D. G. et al. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. **Genes Dev.**, v. 10, n. 10, p. 1247-1259, May 1996.

EDMONDSON, D. G. et al. *In vivo* functions of histone acetylation/deacetylation in Tup1p repression and Gcn5p activation. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 63, p. 459-468, 1998.

EDMUNDS, L. N. J. **Cellular and molecular bases of biological clocks**. New York: Springer, 1987. 497 p.

FARKAS, I. et al. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 24, p. 15602-15607, Aug. 1991.

FELDMAN, J. F.; HOYLE, M. N. A direct comparison between circadian and noncircadian rhythms in *Neurospora crassa*. **Plant Physiol.**, v. 53, n. 6, p. 928-930, June 1971.

FINCHAM, J. R. S.; DAY, P. R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1979. 636 p.

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

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, n. 5, p. 550-561, Dec. 2004.

FROEHLICH, A. C.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. Rhythmic binding of a WHITE COLLAR containing complex to the frequency promoter is inhibited by FREQUENCY. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 100, n. 10, p. 5914-5919, May 2003.

FROEHLICH, A. C. et al. White-Collar-1, a circadian blue light photoreceptor, binding to the *frequency* promoter. **Science**, v. 297, n. 5582, p. 815-819, Aug. 2002.

FU, Y. H.; MARZLUF, G. A. Characterization of *nit-2*, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 7, n. 2, p. 1691-1696, May 1987.

GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GARCIA, I. et al. Roles of the *Aspergillus nidulans* homologues of Tup1 and Ssn6 in chromatin structure and cell viability. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 289, n. 2, p. 146-154, Dec. 2008.

GARCIA-SANCHEZ, S. et al. Global roles of Ssn6 in Tup1- and Nrg1-dependent gene regulation in the fungal pathogen, *Candida albicans*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 16, n. 6, p. 2913-2925, June 2005.

GLASS, C. K.; ROSENFELD, M. G. The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. **Genes Dev.**, v. 14, n. 2, p. 121-141, Jan. 2000.

GONÇALVES, R. D. et al. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 10, n. 11, p. M111.007963, July 2011.

GOODSON, M.; JONAS, B. A.; PRIVALSKY, M. A. Corepressors: custom tailoring and alterations while you wait. **Nucl. Recept. Signal**, v. 3, p. e003/1-e003/8, Oct. 2005.

GREEN, S. R.; JOHNSON, A. D. Promoter-dependent roles for the Srb10 cyclin-dependent kinase and the Hda1 deacetylase in Tup1-mediated repression in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 15, n. 9, p. 4191-4202, Sept. 2004.

HARDING, R. W.; TURNER, R. V. Photoregulation of the carotenoid biosynthetic pathway in albino and white collar mutants of *Neurospora crassa*. **Plant Physiol.**, v. 68, n. 3, p.745-749, Sept. 1981.

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

HARRIS, R. A. Carbohydrate metabolism I: major metabolic pathways and their control. In: DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 1997. p. 267-333.

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

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

HE, Q. et al. CKI and CKII mediate the FREQUENCY-dependent phosphorylation of the white collar complex to close the *Neurospora* circadian negative feedback loop. **Genes Dev.**, v. 20, n. 18, p. 2552-2565, Sept. 2006.

HEINTZEN, C.; LIU, Y. The *Neurospora crassa* circadian clock. **Adv. Genet.**, v. 58, p. 25-66, Apr. 2007.

HEINTZEN, C. et al. The PAS protein VIVID defines a clock-associated feedback loop the represses light input, modulates gating, and regulates clock resetting. **Cell**, v. 104, n. 3, p. 453-464, Feb. 2001.

HICKS, J. et al. RcoA has pleiotropic effects on *Aspergillus nidulans* cellular development. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 1482-1493, Mar. 2001.

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

HUANG, M.; ZHOU, Z.; ELLEDGE, S. J. The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. **Cell**, v. 94, n. 5, p. 595-605, Sept. 1998.

HWANG, C. S. et al. Ssn6, an important factor of morphological conversion and virulence in *Candida albicans*. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 4, p. 1029-1043, Feb. 2003.

JABET, C. et al. Characterization of the N-terminal domain of the yeast transcriptional repressor Tup1. Proposal for an association model of the repressor complex Tup1 x Ssn6. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 12, p. 9011-9018, Mar. 2000.

JOHNSON, L. N. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. **FASEB J.**, v. 6, n. 6, p. 2274-2282, Mar. 1992.

JOHNSON, L. N.; BARFORD, D. Glycogen phosphorylase. The structural basis of the allosteric response and comparison with other allosteric proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 5, p. 2409-2412, Feb. 1990.

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

KIM, S. R.; LEE, B. U. Characterization of the *Neurospora crassa rcm-1* mutants. **Kor. J. Microbiol.**, v. 41, n. 4, p. 246-254, Dec. 2005.

KLEMM, E.; NINNEMANN, H. Correlation between absorbance changes and a physiological response induced by blue light in *Neurospora crassa*. **Photochem. Photobiol.**, v. 28, n. 2, p. 227-230, Jan. 1978.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.

LAMAS-MACEIRAS, M.; FREIRE-PICOS, M. A.; TORRES, A. M. R. Transcriptional repression by *Kluyveromyces lactis* Tup1 in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 38, n. 1, p. 79-84, Jan. 2011.

LAMBREGHTS, R. et al. A high-density single nucleotide polymorphism map for *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 181, n. 2, p. 767-781, Feb. 2009.

LAUTER, F. R. Molecular genetics on fungal photobiology. **J. Genet.**, v. 75, n. 3, p. 375-386, Dec. 1996.

LAUTER, F. R.; RUSSO, V. E. A. Blue light induction of conidiation-specific genes in *Neurospora crassa*. **Nucleic Acids Res.**, v. 19, n. 24, p. 6883-6886, Dec. 1991.

LAUTER, F. R.; YANOFSKY, C. Day/night and circadian rhythm control of *con* gene expression in *Neurospora*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 17, p. 8249-8253, Sept. 1993.

LAZAR, M. A. Nuclear receptor corepressors. **Nucl. Recept. Signal**, v. 1, p. e001/1-e001/4, June 2003.

LEAL, J. et al. A splice variant of the *Neurospora crassa* hex-1 transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. **FEBS Lett.**, v. 583, n. 1, p. 180-184, Jan. 2009.

LEE, H.; CHANG, Y. C.; KWON-CHUNG, K. J. TUP1 disruption reveals biological differences between MATa and MATalpha strains of *Cryptococcus neoformans*. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 4, p. 1222-1232, Feb. 2005.

LEE, K.; EBBOLE, D. Tissue-specific repression of starvation and stress responses of the *Neurospora crassa* *con -10* gene is mediated by RCO1. **Fungal Genet. Biol.**, v. 23, n. 3, p. 269-278, Apr. 1998.

LEE, K.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J. Roles for WHITE COLLAR-1 in circadian and general photoperception in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 163, n. 1, p. 103-114, Jan. 2003.

LEE, M.; CHATTERJEE, S.; STRUHL, K. Genetic analysis of the role of Pol II holoenzyme components in repression by the Cyc8-Tup1 corepressor in yeast. **Genetics**, v. 155, n. 4, p. 1535-1542, Aug. 2000.

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

LI, D.; KOLATTUKUDY, P. E. Cloning of cutinase transcription factor 1, a transactivating protein containing Cys₆Zn₂ binuclear cluster DNA-binding motif. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 19, p. 12462-12467, May 1997.

LI, D.; ROBERTS, R. WD-repeats proteins: structure characteristics, biological function, and their involvement in human diseases. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 58, n. 14, p. 2058-2097, Dec. 2001.

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

LINDEGREN, C. C.; BEANFIELD, V.; BARBER, R. Increasing the fertility of *Neurospora* by selective inbreeding. **Bot. Gazette**, v. 100, n. 3, p. 592-599, Mar. 1939.

LINDEN, H.; MACINO, G. White collar 2, a partner in blue-light signal transduction, controlling expression of light-regulated genes in *Neurospora crassa*. **EMBO J.**, v. 16, n. 1, p. 98-109. Jan. 1997.

LINDEN, H.; BALLARIO, P.; MACINO, G. Blue light regulation in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 22, n. 3, p. 141-150, Dec. 1997.

LINDEN, H.; RODRIGUEZ-FRANCO, M.; MACINO, G. Mutants of *Neurospora crassa* defective in regulation of blue light perception. **Mol. Gen. Genet.**, v. 254, n. 2, p. 111-118, Mar. 1997.

LINDGREN, K. M. **Characterization of *ccg-1*, a clock-controlled gene of *Neurospora crassa***. Hanover: Dartmouth College, 1994. 444 p.

LIU, H. et al. Molecular cloning and characterization of WdTUP1, a gene that encodes a potential transcriptional repressor important for yeast-hyphal transitions in *Wangiella (Exophiala) dermatitidis*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 45, n. 5, p. 646-656, May 2008.

LIU, Y.; LOROS, J.; DUNLAP, J. C. Phosphorylation of the *Neurospora* clock protein FREQUENCY determines its degradation rate and strongly influences the period length of the circadian clock. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 1, p. 234-239, Jan. 2000.

LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. Genetic and molecular analysis of circadian rhythms in *Neurospora*. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 63, p. 757-794, Mar. 2001.

LUNDIN, M.; NEHLIN, J. D.; RONNE, H. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the CG box-binding zinc finger protein Mig1. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 3, p. 1979-1985, Mar. 1994.

LUSCOMBE, N. M. et al. An overview of the structures of protein-DNA complexes. **Genome Biol.**, v. 1, n. 1, p. 1-37, June 2000.

MADSEN, N. B. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation. In: BOYER, P. D.; KREBS, E. G. **The Enzymes**. 3rd ed. New York: Academic Press, 1986. v. 17, p. 366-394.

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

MALAVÉ, T. M.; DENT, S. Y. R. Transcriptional repression by Tup1-Ssn6. **Biochem. Cell Biol.**, v. 84, n. 4, p. 437-443, Aug. 2006.

MARCHEVA, B. et al. Disruption of the clock components CLOCK and BMAL1 leads to hypoinsulinaemia and diabetes. **Nature**, v. 466, n. 7306, p. 627-631, July 2010.

McKENNA, N. J.; O'MALLEY, B. W. Minireview: nuclear receptor coactivators-an update. **Endocrinology**, v. 143, n. 7, p. 2461-2465, July 2002.

METZENBERG, R. L. Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. **Microbiol. Rev.**, v. 43, n. 3, p. 361-383, Sept. 1979.

MÖLLER, A. **Phycomyceten und Ascomyceten. Untersuchungen aus Brasilien**. Jena: Gustav Fischer, 1901. 319 p.

MURAD, A. M. et al. NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*. **EMBO J.**, v. 20, n. 17, p. 4742-4752, Sept. 2001.

MYER, V. E.; YOUNG, R. A. RNA polymerase II holoenzyme and subcomplexes. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 43, p. 27757-27760, Oct. 1998.

NÄÄR, A. M.; LEMON, B. D.; TJIAN, R. Transcriptional coactivator complexes. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 70, n. 1, p. 475-501, July 2001.

NEER, E. J. et al. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. **Nature**, v. 371, n. 6495, p. 297-300, Sept. 1994.

NEHLIN, J. O.; CARLBERG, M.; RONNE, H. Control of yeast *GAL* genes by Mig1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. **EMBO J.**, v. 10, n. 11, p. 3373-3377, Nov. 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Principles of metabolic regulation. In: _____ . **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W H Freeman, 2008. Cap. 15, p. 594-609.

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

NINOMIYA, Y. et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 101, n. 33, p. 12248-12253, Aug. 2004.

NOVENTA-JORDÃO, M. A. et al. Effects of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphate synthase. **FEBS Lett.**, v. 378, n. 1, p. 32-36, Jan. 1996.

O'BRIEN, B. L. et al. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 71, n. 9, p. 5544-5550, Sept. 2005.

OLMEDO, M. et al. A role in the regulation of transcription by light for RCO-1 and RCM-1, the *Neurospora* homologs of the yeast Tup1-Ssn6 repressor. **Fungal Gen. Biol.**, v. 47, n. 11, p. 939-952, Nov. 2010.

OLSON, A. L.; PESSIN, J. E. Structure, function and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 16, p. 235-356, July 1996.

OSTLING, J.; RONNE, H. Negative control of the Mig1p repressor by Snf1p-dependent phosphorylation in the absence of glucose. **Eur. J. Biochem.**, v. 252, n. 1, p. 162-168, Feb. 1998.

PABO, C. O.; SAUER, R. T. Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 61, p. 1053-1095, July 1992.

PANDIT, A.; MAHESHWARI, R. Life history of *Neurospora intermedia* in a sugar cane field. **J. Biosci.**, v. 21, n. 1, p. 57-79, Apr. 1996.

PATTERTON, H. G.; SIMPSON, R. T. Nucleosomal location of the STE6 TATA box and Mat alpha2p mediated repression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 6, p. 4002-4010, June 1994.

PAYEN, A. Extrait d'un rapport adresseé à M. Le Maréchal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altération extraordinaire du pain de munition. **Ann. Chim. Phys.**, v. 9, n. 1, p. 5-21, 1843.

PERKINS, D. D. The first published scientific study of *Neurospora*, including a description of photoinduction of carotenoids. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 38, p. 64-65, 1991.

PERKINS, D. D. *Neurospora*: the organism behind the molecular revolution. **Genetics**, v. 130, n. 4, p. 687-701, Apr. 1992.

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

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

REDD, M. J.; ARNAUD, M. B.; JOHNSON, A. D. A complex composed of Tup1 and Ssn6 represses transcription *in vitro*. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 17, p. 11193-11197, Apr. 1997.

ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Curr. Mol. Med.**, v. 2, n. 2, p. 101-120, Mar. 2002.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344 p.

SANCAR, G. et al. A global circadian repressor controls antiphase expression of metabolic genes in *Neurospora*. **Mol. Cell**, v. 44, n. 5, p. 687-697, Dec. 2011.

SARGENT, M. L.; BRIGGS, W. R. The effects of light on a circadian rhythm of conidiation in *Neurospora*. **Plant Physiol.**, v. 42, n. 11, p. 1504-1510, Nov. 1967.

SARGENT, M. L.; BRIGGS, W. R.; WOODWARD, D. O. Circadian nature of a rhythm expressed by an invertaseless strain of *Neurospora crassa*. **Plant Physiol.**, v. 41, n. 8, p. 1343-1349, Oct. 1966.

SCHAFMEIER, T.; DIERNFELLNER, A. C. R. Light input and processing in the circadian clock of *Neurospora*. **FEBS Lett.**, v. 585, n. 10, p. 1467-1473, May 2011.

SCHAFMEIER, T. et al. Circadian activity and abundance rhythms of the *Neurospora* clock transcription factor WCC associated with rapid nucleocytoplasmic shuttling. **Genes Dev.**, v. 22, n. 24, p. 3397-3402, Dec. 2008.

SCHULTE, U. et al. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, v. 94, n. 1, p. 3-13, Mar. 2002.

SCHULTZ, L.; MARSHALL-CARLSON, L.; CARLSON, M. The Nterminal TPR region is the functional domain of Ssn6, a nuclear phosphoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 9, p. 4744-4756, Sept. 1990.

SCHWERDTFEGER, C.; LINDEN, H. Blue light adaptation and desensitization of light signal transduction in *Neurospora crassa*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 4, p. 1080-1087, Feb. 2001.

SCHWERDTFEGER, C.; LINDEN, H. VIVID is a flavoprotein and serves as a fungal blue light photoreceptor for photoadaptation. **EMBO J.**, v. 22, n. 18, p. 4846-4855, Sept. 2003.

SELKER, E. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 24, p. 579-613, Dec. 1990.

SELKER, E. U. et al. Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*. **Cell**, v. 51, n. 5, p. 741-752, Dec. 1987.

SHEAR, C. L.; DODGE, B. O. Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. **J. Agric. Res.**, v. 34, n. 1, p. 1019-1042, June 1927.

SHIMIZU, M. et al. Nucleosomes are positioned with base pair precision adjacent to the alpha 2 operator in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.**, v. 10, n. 10, p. 3033-3041, Oct. 1991.

SHINOHARA, M. L. et al. *Neurospora* clock-controlled gene 9 (*ccg-9*) encodes trehalose synthase: circadian regulation of stress responses and development. **Eukaryot. Cell**, v. 1, n. 1, p. 33-43, Feb. 2002.

SHRODE, L. B. et al. *Vvd* is required for light adaptation of conidiation-specific genes of *Neurospora crassa*, but not circadian conidiation. **Fungal. Genet. Biol.**, v. 32, n. 3, p. 169-181, Apr. 2001.

SIKORSKI, R. S. et al. A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. **Cell**, v. 60, n. 2, p. 307-317, Jan. 1990.

SMITH, K. M. et al. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genome-wide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. **Eukaryot. Cell**, v. 9, n. 10, p. 1549-1556, Oct. 2010.

SMITH, R. L.; JOHNSON, A. D. Turning genes off by Ssn6-Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. **Trends Biochem. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 325-330, July 2000.

SMITH, T. F. et al. The WD repeat: a common architecture for diverse functions. **Trends Biochem Sci.**, v. 24, n. 5, p. 181-185, May 1999.

SOKOLOVSKY, V. et al. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41-43, Feb. 1990.

SPRINGER, M. L. Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. **Bioessays**, v. 15, n. 6, p. 365-374, June 1993.

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

STRAUSS, J. et al. The function of CreA, the carbon catabolite repressor of *Aspergillus nidulans*, is regulated at the transcriptional and pos-transcriptional level. **Mol. Microbiol.**, v. 32, n. 1, p. 169-178, Apr. 1999.

SUN, J.; GLASS, N. L. Identification of the CRE-1 cellulolytic regulon in *Neurospora crassa*. **PloS One**, v. 6, n. 9, p. e25654/1-e25654/14, Sept. 2011.

SUSSMAN, A. S.; DURKEE, T. L.; LOWRY, R. J. A model for rhythmic and temperature-independent growth in 'clock' mutants of *Neurospora*. **Mycopathol. Mycol. Appl.**, v. 25, n. 3, p. 381-396, Apr. 1965.

TALORA, C. et al. Role of a white collar-1-white collar-2 complex in blue-light signal transduction. **EMBO J.**, v. 18, n. 18, p. 4961-4968, Sept. 1999.

TAYLOR, D. L. et al. Structure and resilience of fungal communities in Alaskan boreal forest soils. **Can. J. For. Res.**, v. 40, p. 1288-1301, July 2010.

TÉLLEZ-IÑÓN, M. T.; TORRES, H. N. Interconvertible forms of glycogen phosphorylase in *Neurospora crassa*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 66, n. 2, p. 459-463, June 1970.

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

THORENS, B. Glucose transporters in the regulation of intestinal, renal, and liver glucose fluxes. **Am. J. Physiol.**, v. 270, n. 4 pt 1, p. G541-G553, Apr. 1996.

TODD, R. B.; HYNES, M. J.; ANDRIANOPOULOS, A. The *Aspergillus nidulans rcoA* gene is required for veA-dependent sexual development. **Genetics**, v. 174, n. 3, p. 1685-1688, Nov. 2006.

TODD, R. B. et al. TupA, the *Penicillium marneffeii* Tup1p homologue, represses both yeast and spore development. **Mol. Microbiol.**, v. 48, n. 1, p. 85-94, Apr. 2003.

TREITEL, M. A.; CARLSON, M. Repression by Ssn6-Tup1 is directed by Mig1, a repressor/activator protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 92, n. 8, p. 3132-3136, Apr. 1995.

TREITEL, M. A. et al. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 18, n. 11, p. 6273-6280, Nov. 1998.

TURIAN, G.; BIANCHI, D. E. Conidiation in *Neurospora*. **Bot. Rev.**, v. 38, n. 1, p. 119-154, Jan./Mar. 1972.

TURIAN, G.; OULEVEY, N.; TISSOT, F. Preliminary studies on pigmentation and ultrastructure of microconidia of *Neurospora crassa*. **Neurospora Newslett.**, v. 11, p. 17, 1967.

TURNER, B. C.; PERKINS, D. D.; FAIRFIELD, A. *Neurospora* from natural populations: a global study. **Fungal Genet. Biol.**, v. 32, n. 2, p. 67-92, Mar. 2001.

TZAMARIAS, D.; STRUHL, K. Functional dissection of the yeast Cyc8-Tup1 transcriptional co-repressor complex. **Nature**, v. 369, n. 6483, p. 758-761, June 1994.

VAN PEIJ, N. N. et al. The transcriptional activator XlnR regulates both xylanolytic and endoglucanase gene expression in *Aspergillus niger*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 64, n. 10, p. 3615-3619, Oct. 1998.

VARANASI, U. S. et al. The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, n. 12, p. 6707-6714, Dec. 1996.

VAUTARD-MEY, G.; FEVRE, M. Mutation of a putative AMPK phosphorylation site abolishes the repressor activity but not the nuclear targeting of the fungal glucose regulator CRE1. **Curr. Genet.**, v. 37, n. 5, p. 328-332, May 2000.

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

WAHI, M.; KOMACHI, K.; JOHNSON, A. D. Gene regulation by the yeast Ssn6-Tup1 corepressor. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 63, p. 447-457, 1998.

WALKER, J. R.; CORPINA, R. A.; GOLDBERG, J. Structure of the ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. **Nature**, v. 412, n. 6847, p. 607-614, Aug. 2001.

WANG, T. Y. et al. A predicted protein-protein interaction network of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Mol. Biosyst.**, v. 7, p. 2278-2285, Apr. 2011.

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

XU, W. Nuclear receptor coactivators: the key to unlock chromatin. **Biochem. Cell Biol.**, v. 83, n. 4, p. 418-428, Aug. 2005.

YAMASHIRO, C. T. et al. Characterization of *rco-1* of *Neurospora crassa*, a pleiotropic gene affecting growth and development that encodes a homolog of Tup1 of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 16, n. 11, p. 6218-6228, Nov. 1996.

ZALOKAR, M. Variations in the production of carotenoids in *Neurospora*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 70, n. 2, p. 561-567, Aug. 1957a.

ZALOKAR, M. Isolation of an acidic pigment in *Neurospora*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 70, n. 2, p. 568-571, Aug. 1957b.

ZHAO, R. et al. Roles of Tup1 in switching, phase maintenance, and phase-specific gene expression in *Candida albicans*. **Eukaryot. Cell**, v. 1, n. 3, p. 353-365, June 2002.

ZOLTOWSKI, B. D.; CRANE, B. R. Light activation of the LOV protein vivid generates a rapidly exchanging dimer. **Biochemistry**, v. 47, n. 27, p. 7012-7019, July 2008.