

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

Ana Carolina Boni

**Caracterização funcional do produto da ORF NCU03043 de
Neurospora crassa homólogo ao fator de transcrição FlbC
de *Aspergillus nidulans***

ARARAQUARA

2014

ANA CAROLINA BONI

Caracterização funcional do produto da ORF 3043 de *Neurospora crassa* homólogo ao fator de transcrição FlbC de *Aspergillus nidulans*

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. Dr. Maria Célia Bertolini

ARARAQUARA

2014

DADOS CURRICULARES

Ana Carolina Boni

1. Dados pessoais

Filiação: Hermes Boni e Maria Helena Pizzaia Boni

Nascimento: 13 de março de 1986 – Araraquara-SP, Brasil

Endereço Pessoal: Avenida Guanabara, 583 – Jardim Brasil

CEP: 14811-108 – 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: Licenciada em Química

2. Formação acadêmica

2012-2014: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia. Título: Caracterização do fator de transcrição FlbC-*like* de *Neurospora crassa*, uma proteína que participa no desenvolvimento do fungo. Orientadora: Maria Célia Bertolini, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil (em andamento).

2006-2010: Graduação Licenciatura em Química, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

3. Atividades de pesquisa

3.1 Artigos completos publicados em periódicos

BONI, A. C.; WONG, A.; DUTRA, R. A. F.; SOTOMAYOR, M. D. P. T. Cobalt phthalocyanine as a biomimetic catalyst in the amperometric quantification of dipyrone using FIA. **Talanta**, v. 85, p. 2067-2073, 2011.

BONI, A. C.; LANZA, M. R. V.; TANAKA, S. M. C. N.; TANAKA, A. A. Application of a biomimetic sensor based on iron phthalocyanine chloride: 4-methylbenzylidene-camphor detection. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, p. 1377-1383, 2010.

3.2 Resumos apresentados em congressos

BONI, A.C.; CUPERTINO, F.B.; VIRGILIO, S.; BERTOLINI, M.C. The *Neurospora crassa* FLBC Transcription Factor is Involved in Fungus Development and Glycogen Metabolism Control. XLII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, SBBQ, 2013, Foz do Iguaçu, PR.

BONI, A. C.; SOTOMAYOR M. D. P. T. S. Desenvolvimento de sistema FIA usando sensor biomimético para determinação de dipirona como detector amperométrico. 2010. In: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2010, Águas de Lindóia-SP.

BONI, A. C.; SOTOMAYOR M. D. P. T. S. Determinação de dipirona em medicamentos e águas naturais empregando eletrodos microimpressos modificados com ftalocianina de cobalto. 2010. In: XXII Congresso de Iniciação Científica da Unesp (CIC), 2010, Araraquara-SP.

BONI, A. C.; ROMERO, J. H. S. Era uma vez em atomolândia: o lúdico para contextualizar o ensino de Química. 2010. In: VII Evento de Educação em Química (EVEQ), 2010, Araraquara-SP.

BONI, A. C.; SOTOMAYOR M. D. P. T. S. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de dipirona em medicamentos e efluentes empregando sensores biomiméticos à base da enzima P450. 2009. In: XXI Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC), 2009, São José do Rio Preto-SP.

BONI, A. C.; SOTOMAYOR M. D. P. T. S. Aplicación de un sensor biomimético para la determinación de la hormona sintética valerato de estradiol en ambientes acuáticos naturales del interior de são paulo. 2009. In: XVII Jornadas de Jóvenes Investigadores de la AUGM, 2009, Concórdia- Entre Ríos, Argentina.

BONI, A. C.; SOTOMAYOR M. D. P. T. S. Sensores biomiméticos para protetores solares em sistemas aquáticos naturais na região de Araraquara. 2008. In: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP (CIC), 2008, São José dos Campos-SP.

Dedico este trabalho
primeiramente a Deus, aos
meus pais Hermes e Maria
Helena, meus irmãos Thayz e
Rodrigo, e a meu namorado
Igor, pessoas que amo muito.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora, Prof.^a Maria Célia, por me acolher em seu grupo de pesquisa, pelos ensinamentos, pela paciência e confiança que depositou em mim.

Agradeço a todos do laboratório, Susi, Thiago, Eliane, Stela, Rodrigo, Fernanda Cupertino, Fernanda Zanolli, Kelly e Ana Paula, pela companhia agradável e pela amizade. Também gostaria de agradecer-los pelas risadas e conversas, muitas conversas “interessantes” que tivemos durante esses dois anos de convívio. Em especial gostaria de agradecer a minha Co-orientadora, Fernanda Cupertino, por toda a paciência e pelos ensinamentos transmitidos, e aos Pós-Doutorandos Fernanda Zanolli e Rodrigo, por toda a ajuda que me deram. Vocês são o grupo que todo laboratório deveria ter, adoro vocês!

Gostaria de agradecer a Susi também, por estar comigo desde o início da Graduação. Sua amizade sempre foi muito importante pra mim!

Agradeço novamente aos meus pais, Maria Helena e Hermes, e a minha irmã Thayz por me aconselharem durante esta jornada. Agradeço meu namorado Igor por todo o apoio e pela paciência com os meus ataques de nervosismo, por me compreender nas horas difíceis e por sempre me incentivar.

Agradeço ao técnico de laboratório Tarcísio, por ser essencial no funcionamento do laboratório e pelo bom humor.

Agradeço ao Prof. Iran Malavazzi por toda a ajuda nas análises de microscopia de fluorescência, a qual acrescentou muitos em meu trabalho e ao grupo de pesquisa do Prof. Gustavo Goldman, pelo acolhimento em seu laboratório e pelo aprendizado obtido.

Ao departamento de Bioquímica e Tecnologia Química e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do instituto de Química da UNESP de Araraquara pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

(Benjamin Disraeli)

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

(Carl Sagan)

Resumo

O fungo filamentoso *Neurospora crassa* é um organismo modelo amplamente utilizado para estudos de diversos aspectos da biologia dos eucariotos. Nosso laboratório tem utilizado este fungo para estudar os mecanismos moleculares e bioquímicos envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio. A avaliação de uma coleção de linhagens mutantes individualmente nocauteadas em genes que codificam fatores de transcrição permitiu identificar várias proteínas potencialmente envolvidas na regulação do metabolismo de glicogênio do fungo *N. crassa*. Dentre as proteínas, o fator de transcrição FLBC foi identificado como uma possível proteína regulatória do metabolismo de glicogênio. A linhagem mutante apresentou alterações no perfil de acúmulo de glicogênio e na expressão do gene *gsn* em relação à linhagem selvagem, quando submetidas a estresse térmico. Estudos preliminares realizados anteriormente em nosso laboratório mostraram severas alterações morfológicas na linhagem *flbC*^{KO}, como reduzida capacidade de conidiação, com a presença de poucos microconídios, formação de hifas aéreas reduzidas, morfologia das extremidades das hifas alterada, aspecto e morfologia alterados das colônias e produção acentuada do pigmento melanina, indicando que a proteína FLBC desempenha importante papel no desenvolvimento do fungo. O fator de transcrição FLBC, objeto de estudo deste trabalho, é uma proteína homóloga às proteínas FlbC e FLE1 dos fungos *Aspergillus nidulans* e *Podospora anserina*, respectivamente, ambas envolvidas nos processos de conidiação e desenvolvimento dos fungos. O objetivo deste trabalho foi realizar uma caracterização funcional detalhada deste fator de transcrição em *N. crassa*. Análises de expressão gênica mostraram níveis elevados do transcrito *flbC* durante o crescimento vegetativo do fungo e após a indução do desenvolvimento assexual. A linhagem nocaute mostrou uma desregulação no acúmulo de carboidratos de reserva (glicogênio e trehalose) durante o crescimento vegetativo do fungo, apresentando níveis elevados dos dois carboidratos. Análises de expressão gênica nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO} mostrou que os genes *gdn* (codifica a enzima desramificadora) e *gpn* (codifica glicogênio fosforilase) são regulados por FLBC. Foram identificados sítios de ligação da proteína FLBC na região promotora dos genes *gdn* e *gpn* e os promotores de tais genes foram ligados *in vitro* pela proteína FLBC. Genes homólogos a *vosA*, *abaA* e *wetA* (regulados por FlbC em *A. nidulans*) foram identificados no genoma de *N. crassa* e a expressão dos genes *abaA* e *wetA* também foi demonstrada ser regulada por FLBC. Além disso, a proteína FLBC também foi mostrada ser capaz de se ligar *in vitro* aos promotores *abaA* e *wetA*, mas não ao promotor *vosA*, indicando que esta proteína não deve ser regulada por FLBC em *N. crassa*. A análise de conteúdo de glicogênio e trehalose nas linhagens mutantes *vosA*^{KO} e *wetA*^{KO} mostrou que o conteúdo de glicogênio é alterado apenas na linhagem *vosA*^{KO}, indicando que esta proteína regula o metabolismo deste carboidrato, independente de FLBC.

Palavras-chave: *Neurospora crass.* Glicogênio. Expressão gênica. Desenvolvimento. DNA gel shift

Abstract

The filamentous fungus *Neurospora crassa* is a model organism widely used for studies of several aspects of the biology in eukaryotes. We have been studying the molecular and biochemical mechanisms involved in glycogen metabolism regulation in this fungus. The screening of a knocked-out strains set in genes encoding transcription factors has identified many proteins likely involved in the regulation of glycogen metabolism in the fungus *N. crassa*. Among the proteins, the transcription factor FLBC was identified as a regulatory protein of the glycogen metabolism. The mutant strain showed changes in the glycogen accumulated and in the *gsn* gene expression when compared to the wild-type strain under heat stress. Preliminary studies carried out in our laboratory showed severe morphological changes in the strain *flbC*^{KO}, such as reduced ability to conidiate, presence of a few microconidia, reduced production of aerial hyphae, altered morphology of hyphae tips, changes in the colonies morphology and high production of the pigment melanin, suggesting that FLBC plays an important role in the fungus development. The transcription factor FLBC, object of study in this work, is the *Aspergillus nidulans* and *Podospora anserina* FlbC/FLE1 homologous protein, respectively, both involved in conidiation and fungal growth. The purpose of this study was to perform functional characterization of this transcription factor in *N. crassa*. Analysis of gene expression showed high levels of the transcript *flbC* during vegetative growth and after induction of asexual development. The knockout strain presented a misregulation in the accumulation of reserve carbohydrate (glycogen and trehalose) during vegetative growth accumulating higher levels of both carbohydrates as compared to the wild-type strain. Analysis of gene expression in the strains wild-type and *flbC*^{KO} showed that *gdn* (encoding for debranching enzyme) and *gpn* (encoding glycogen phosphorylase) genes are regulated by FLBC. DNA binding sites for FLBC were identified in the promoters *gdn* and *gpn* and the protein FLBC was able to bind *in vitro* to DNA fragments containing the motifs. Homologous genes to *vosA*, *abaA* and *wetA* (regulated by FlbC in *A. nidulans*) were identified in the *N. crassa* genome and the gene expression analysis of *abaA* and *wetA* also showed that both genes are regulated by FLBC. Furthermore, FLBC protein was able to bind *in vitro* to the promoters *abaA* and *wetA*, but not in the promoter *vosA*, indicating that this protein may not be regulated by FLBC in *N. crassa*. The analysis of the glycogen and trehalose levels in the mutant strains *vosA*^{KO} and *wetA*^{KO} showed that only *vosA*^{KO} has impaired glycogen accumulation, indicating that this protein regulates the metabolism of this carbohydrate, however independent of FLBC.

Keywords: *Neurospora crassa*. Glycogen. Gene expression. Development. DNA gel shift

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

YT	meio de cultura com extrato de levedo e triptona
ATP	adenosina trifosfato
BSA	soroalbumina bovina
C-terminal	região carboxi-terminal
cDNA	DNA complementar
DEPC	dietil pirocarbonato
dNTP	desoxirribonucleotídeos fosfatados
D.O.	densidade óptica
DTT	Dithiotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
G1P	glicose-1-fosfato
G6P	glicose-6-fosfato
GNN	enzima glicogenina de <i>N. crassa</i>
GPN	enzima glicogênio fosforilase de <i>N. crassa</i>
<i>gpn</i>	gene da glicogênio fosforilase de <i>N. crassa</i>
GS	glicogênio sintase
GSN	enzima glicogênio sintase de <i>N. crassa</i>
<i>gsn</i>	gene da glicogênio sintase de <i>N. crassa</i>
<i>hyg</i>	gene que codifica para higromicina B fosfotransferase
IPTG	isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo
kDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i>
N-terminal	região amino terminal da proteína
PMSF	fluoreto de metilfenilssulfonil
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto

SC	<i>Synthetic Cross médium</i>
SDS	duodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TBST	tampão TBS acrescido de Tween 20
TCA	ácido tricloroacético
TLCK	N α -p-tosil-L-lisina-cloro
Tris	Hidroximetilaminometano
UDP	uridina difosfato
UDPG	uridina difosfato glicose
VM	meio mínimo de Vogel

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
1- O fungo <i>Neurospora crassa</i>	19
1.1- Ciclo de vida	20
1.2- Metabolismo do glicogênio e sua regulação no fungo <i>Neurospora crassa</i>	24
2- O fator de transcrição FLBC de <i>N. crassa</i>	27
OBJETIVOS	31
MATERIAS E MÉTODOS	34
1- Linhagens estudadas	35
1.1- <i>Neurospora crassa</i>	35
2- Meios de cultura	35
2.1- Meios de cultivo para <i>N. crassa</i>	35
2.1.1- Meio Mínimo de Vogel (VM)	35
2.1.2- <i>Synthetic Cross medium</i> (SC)	36
2.2- Meio de cultivo para <i>E. coli</i>	37
3- Propagação das linhagens de <i>N. crassa</i>	38
3.1- Obtenção de conídios	38
3.2- Crescimento vegetativo e indução do desenvolvimento assexual	38
4- Análises morfológicas das linhagens mutantes	39
4.1- Crescimento em meio sólido	39
4.2- Análise das extremidades das hifas	39
4.3- Germinação de microconídios da linhagem <i>flbC</i> ^{KO}	40
4.3.1- Visualização da parede celular e septos	40
4.3.2- Visualização dos núcleos	40
4.4- Germinação de conídios	40
4.4.1- Germinação dos conídios em cultura líquida	40
4.4.2- Germinação dos conídios em placas de Petri	41
5- Análise da viabilidade dos conídios	41
6- Análise do crescimento por massa seca	41

7- Determinação do conteúdo de glicogênio e trealose	42
7.1- Preparo do extrato celular	42
7.2- Determinação do conteúdo de glicogênio	42
7.3- Determinação do conteúdo de trealose	43
8- Extração de RNA total e análise da expressão gênica	43
8.1- Extração de RNA total	43
8.2- PCR quantitativo	44
9- Ensaio de produção e purificação de proteína recombinante	45
9.1- Análise de solubilidade em pequena escala	45
9.2- Ensaio de <i>Western Blot</i>	45
9.3- Produção e purificação da proteína recombinante	46
10- Extração de DNA genômico	47
11- Ensaios de DNA gel <i>shift</i> (EMSA)	47
11.1- Preparo das sondas de DNA	47
11.2- Preparo dos competidores específicos	49
11.3- Ensaio de ligação DNA-proteína	49
12- Análise de bioinformática das proteínas estudadas	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
1- A proteína FLBC	52
2- Análises morfológicas da linhagem <i>flbC^{KO}</i>	54
2.1- Crescimento em meio sólido	54
2.2- Análise da extremidade das hifas	55
2.3- Análise da germinação de microconídios da linhagem <i>flbC^{KO}</i>	55
3- Análise do conteúdo de carboidratos de reserva na linhagem <i>flbC^{KO}</i>	59
4- Produção e purificação da proteína FLBC recombinante	59
4.1- Análise da solubilidade	59
4.2- Purificação da proteína recombinante	62
5- Ensaios de ligação DNA-proteína	62
5.1- Ensaio de DNA gel <i>shift</i> (EMSA)	65
6- Análises de expressão gênica	69

6.1- Análise da expressão do gene <i>flbC</i>	70
6.2- Análise da expressão dos genes <i>gpn</i> e <i>gdn</i>	70
7- Participação do fator de transcrição FLBC no desenvolvimento no fungo <i>N. crassa</i>	73
8- Caracterização morfológica dos mutantes <i>vosA</i>^{KO}, <i>wetA-like</i>^{KO} e <i>abaA-like</i>^{KO}	81
8.1- Crescimento em meio sólido	81
8.2- Análise da germinação dos conídios das linhagens <i>vosA</i> ^{KO} e <i>wetA-like</i> ^{KO}	81
9- Análise do crescimento e viabilidade celular das linhagens selvagem, <i>vosA</i>^{KO} e <i>wetA-like</i>^{KO}	83
10- Acúmulo de carboidratos de reserva nos mutantes <i>vosA</i>^{KO} e <i>wetA-like</i>^{KO}	87
11- Análise de ligação da proteína FLBC aos promotores <i>vosA</i>, <i>abaA-like</i> e <i>wetA-like</i>	90
12- Análise da expressão dos genes <i>abaA-like</i> e <i>wetA-like</i>	93
PRINCIPAIS CONCLUSÕES	97
REFERÊNCIAS	99

Introdução

1. O fungo *Neurospora crassa*

Um seleto grupo de organismos modelo tem sido utilizado para uma análise detalhada dos processos de desenvolvimento, processos fisiológicos, genéticos e evolutivos. Aproximadamente 10% de todos os organismos vivos conhecidos são fungos (~ 250.000 espécies), sendo encontrados em todos os nichos, alguns em associação simbiótica com plantas (micorrizas) e algas (líquens), muitos causando doenças em plantas e animais e muitos outros desempenham um papel social beneficiário na decomposição de matéria orgânica e, assim, a reciclagem de nutrientes. Alguns fungos são utilizados como alimentos (cogumelos), em processos de panificação e fermentação (*Saccharomyces*), e outros para a produção de antibióticos e metabólitos secundários (*Aspergillus* e *Penicillium*) (RAJU, 2009).

Neurospora crassa é um fungo filamentosos que vive em habitats com climas tropicais e subtropicais. Este fungo possui coloração alaranjada e é encontrado na natureza em arbustos e troncos de árvores (JACOBSON, 2004). É capaz de crescer rapidamente em meio simples (meio mínimo), com apenas uma fonte de energia (carbono), sais minerais, e uma vitamina essencial, biotina (METZENBERG, 1979). É um organismo anaeróbico restrito, não patogênico e consegue se desenvolver em uma faixa de pH que pode variar entre 4,0 e 7,5, com uma baixa taxa de crescimento nos extremos. Sua temperatura ótima de crescimento vegetativo se dá por volta de 30 a 35°C, embora possa crescer em temperaturas mais elevadas (42°C) (METZENBERG, 1979).

Por ser considerado um organismo de fácil manipulação, tornou-se atraente para o uso em pesquisas (PERKINS, 1992). *N. crassa* é utilizado como organismo modelo em pesquisa básica desde os anos 60 sendo um dos fungos mais bem estudados dentre os fungos filamentosos (SCHULTE *et al.*, 2002). Esse fungo foi utilizado para estudos pelos pesquisadores Beadle e Tatum (1941), os quais elucidaram o papel dos genes envolvidos em seu metabolismo celular tendo como base a idéia “um gene – uma enzima”, abrindo caminho para diversos estudos bioquímicos, genéticos, fisiológicos e moleculares (DAVIS, PERKINS, 2002).

Seu genoma foi sequenciado em 2003 por Galagan e colaboradores apresentando-se organizado em 7 cromossomos, distribuídos em 10.082 genes. Na época em que o sequenciamento foi realizado somente 13% dos genes codificavam proteínas já conhecidas em bancos de dados, 46% dos genes codificavam proteínas hipotéticas e 41% deles codificavam proteínas que não possuíam ortólogos funcionais conhecidos. Um novo estudo sobre o genoma de *N. crassa* foi realizado em 2011 por Wang e colaboradores e mostrou que 40% dos genes codificam proteínas funcionalmente anotadas em bancos de dados e há a estimativa de que ocorram 27.588 interações proteína-proteína entre as 3.006 proteínas

do fungo. Esses dados mostram que mesmo depois de quase 10 anos do sequenciamento do genoma de *N. crassa* existe ainda um grande número de genes com funções desconhecidas, sendo, portanto um organismo muito promissor para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos (DUNLAP *et al.*, 2007).

1.1. Ciclo de vida

O fungo *N. crassa* possui um ciclo de vida (Figura 1) com duas fases, vegetativa e sexual, e pode ser altamente influenciado por fatores do meio ambiente, como nutrientes, luz e temperatura. Na fase vegetativa existem estruturas de propagação chamadas conídios e na fase sexual é possível observar a presença de corpos de frutificação. É um fungo heterotático, tendo dois tipos de indivíduos sexualmente compatíveis, **A** e **a**. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens com *mating types* diferentes e quaisquer duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto outro pode se comportar como doador de núcleos ou receptor de núcleos (METZENBERG, 1979).

No estágio vegetativo de seu ciclo de vida, o fungo *N. crassa* cresce como hifas filamentosas que se entrelaçam formando um tapete micelial sobre o substrato. Sob condições apropriadas, as hifas promovem novas ramificações, as quais são orientadas para longe do substrato, formando uma massa de hifas aéreas (SPRINGER, YANOFISKY, 1989). O modo de crescimento de algumas hifas aéreas se desenvolvem em conidióforos levando à produção de esporos assexuais (FINCHAM, DAY, RADFORD, 1979), por meio da transição da elongação apical das hifas para repetidos brotamentos apicais, resultando em cadeias com junções interconidiais de diâmetro semelhante aos brotos recém-formados (cadeias de constrição menores). Conforme o surgimento de novos brotamentos apicais, as junções interconidiais se tornam mais estreitas, resultando na formação de cadeias de constrição maiores. Os septos então sofrem um processo de espessamento, seguido da separação dos conídios adjacentes, os quais permanecem ligados por um filamento conectivo (SPRINGER, YANOFISKY, 1989). Os macroconídios, ou simplesmente conídios, apresentam coloração laranja-rosado, produzem carotenoide (ZALOKAR, 1957a, 1957b) e se desenvolvem em condição com alta quantidade de açúcar e nitrogênio. Os conídios são bastante variáveis em tamanho e podem conter desde um até dez ou mais núcleos (FINCHAM, DAY, RADFORD, 1979). São resistentes à dessecação e podem ser armazenados por longos períodos em sílica gel. Também podem ser armazenados a -80°C por anos sem perda de viabilidade. Entretanto, se armazenado em local úmido, os conídios sobrevivem cerca de 1 a 2 dias em temperatura

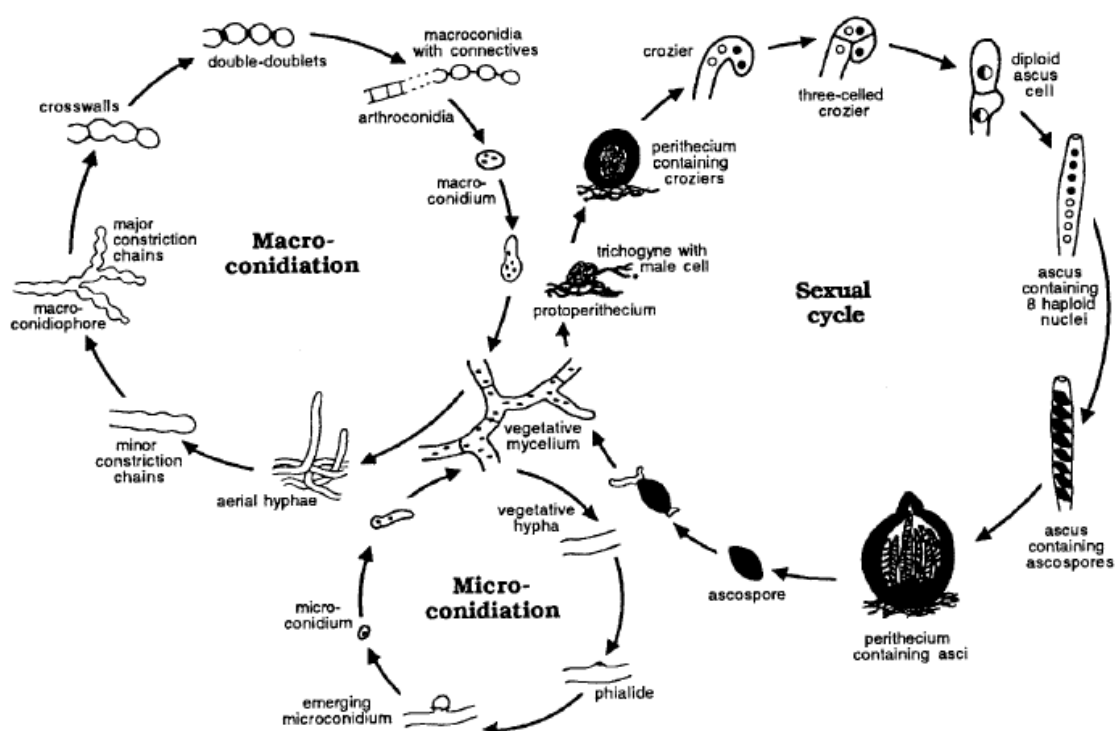


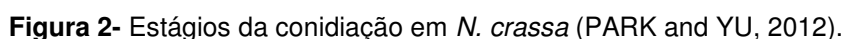
Figura 1- Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. O ciclo de vida pode se apresentar como sexual ou assexual. No assexual há a formação de macro e microconídios e no sexual há a formação do protoperitécio, dependendo das condições do ambiente, que quando fertilizado se desenvolve produzindo ascósporos (BORKOVICH et al., 2004).

ambiente. Em meio de cultura adequado, os conídios podem germinar em cerca de 2 a 5 h, retomando o crescimento filamentoso (METZENBERG, 1979). Em adição aos conídios, microconídios uninucleados também podem ser formados em condição com baixa quantidade de açúcar e nitrogênio, que apresentam uma coloração marrom-esverdeado, produzem melanina e carotenóides (TURIAN, OULEVEY, TISSOT, 1967). 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). São originados como pequenas protuberâncias nas hifas. As camadas exteriores da parede celular da hifa degeneram neste ponto, ocorrendo a deposição de mais material de parede celular na base do microconídio em formação, sendo o citoplasma da hifa compartilhado. Neste ponto, a parede celular sofre um espessamento, formando um colar na base do microconídio. Em seguida, um núcleo proveniente da hifa se desloca para o microconídio e então ocorre a separação deste da hifa da qual foi gerado (MAHESHWARI, 1999).

Quando há limitação de nitrogênio, o fungo *N. crassa* entra na fase sexual do seu ciclo de vida (Figura 1), a qual induz um tipo de agregação de hifas levando à formação de órgãos sexuais femininos (protoperitécio). O protoperitécio consiste de uma ascogônia e a

partir desta, hifas especializadas chamadas tricógino projetam-se em direção ao ar por ação de feromônios (FINCHAM, DAY, RADFORD, 1979). A fertilização ocorre quando uma célula de *mating type* oposto, podendo ser um macro ou microconídio, ou até mesmo um pedaço pequeno de micélio, entra em contato com o tricógino. Como resultado esse contato ocorre então a plasmogamia, associação de núcleos aos pares, que começam a se dividir sincronicamente para a formação de numerosas hifas ascógenas que passam a crescer para fora da ascogônia (FINCHAM, DAY, RADFORD, 1979). Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia começa a desenvolver uma espécie de parede originando uma estrutura denominada peritécio maduro. Os núcleos de tipos opostos localizados na extremidade da hifa ascogênica começam a se dividir, há formação de septos nessa região da hifa, com uma célula central contendo dois núcleos de tipos opostos, a qual é denominada asco inicial. Após a formação do asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haploides. Em seguida, ocorre uma mitose resultando em oito núcleos haploides dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada tipo de acasalamento (A e a). Esses núcleos originarão esporos (ascósporo), os quais originarão um novo micélio (FINCHAM, DAY, RADFORD, 1979). As etapas dos ciclos sexual e asexual do fungo *N. crassa* estão ilustradas na figura 1.

Genes requeridos para conidiação foram identificados e caracterizados no fungo *N. crassa*. O mutante *aconidiate-2* (*acon-2*) é capaz de produzir hifas aéreas, mas tem a formação de cadeias de constricção menores bloqueada (MATSUYAMA, NELSON, SIEGEL, 1974). As linhagens mutantes nos genes *acon-3* e *fluffy* (*fl*) são incapazes de formar cadeias de constricção maiores (MATSUYAMA, NELSON, SIEGEL, 1974). O gene *fl*, o qual codifica para um fator de transcrição contendo um domínio de ligação ao DNA do tipo Zn(II)₂Cys₆, atua como um regulador maior da conidiação em *N. crassa* (BAILEY, EBBOLE, 1978), sendo seu transcrito expresso durante o tempo correspondente à transição do crescimento apical das hifas para o brotamento apical (BAILEY, EBBOLE, 1978). A transição do crescimento filamentoso para o brotamento das hifas também pode ser induzido por luz. A regulação da conidiação por luz requer o complexo *white-collar* (WCC), um complexo regulatório da transcrição composto pelos fatores de transcrição WC-1 e WC-2 (PARK, YU, 2012). O complexo WCC é requerido em todas as respostas à luz azul, incluindo a redefinição do relógio circadiano, síntese de carotenoides, desenvolvimento de esporos assexuais, formação de estruturas sexuais femininas e liberação dos ascósporos (SMITH *et al.*, 2010). Em *N. crassa*, sob exposição à luz, o complexo *white-collar* transientemente regula a transcrição de *fl* e de genes específicos da conidiação, *con-6* e *con-10* (OLMEDO *et al.*, 2010, OLMEDO, RUGER-HERREROS, LUQUE, CORROCHANO, 2010). A Figura 2 mostra os estágios do processo de conidiação em *N. crassa* regulados por luz.



Recentemente, Smith *et al.* (2010) identificaram seis fatores de transcrição envolvidos com regulação do metabolismo ou resposta à estresse no fungo *N. crassa*, os quais demonstraram ser regulados pelo complexo WCC. Três destes fatores de transcrição, *cre-1*, *vosA* e *sre*, foram induzidos por luz. Em *A. nidulans*, VosA faz parte de uma família de proteínas denominada complexo *velvet*, o qual está envolvido com a regulação do desenvolvimento e metabolismo secundário do fungo, juntamente com VeA, VelB e VelC (NI, YU, 2007), e está localizada no núcleo de conídios maduros formando um complexo heterodimérico com VelB. O complexo VosA-VelB atua como um repressor da diferenciação assexual durante o crescimento vegetativo em cultura líquida submersa ou durante o desenvolvimento do fungo na ausência de luz (BAYRAM, BRAUS, 2012). A luz reprime os níveis dos transcritos *vosA* e *velB* drasticamente durante o desenvolvimento, o qual está correlacionado com o aumento da conidiação do fungo (BAYRAM, BRAUS, 2012). A proteína VeA é também é um regulador do desenvolvimento dependente de luz. Sob luz constante, VeA se localiza no citoplasma das hifas, enquanto que no escuro, está presente no núcleo formando um complexo com VelB, um heterodímero necessário para o desenvolvimento assexual de *A. nidulans* (KIM *et al.*, 2002).

Genes envolvidos no desenvolvimento sexual do fungo *N. crassa* também foram identificados. As proteínas heterotriméricas G estão associadas com o desenvolvimento do fungo, as quais consistem de três subunidades G α (GNA-1, GNA-2 e GNA-3), uma subunidade G β (GNB-1) e uma G γ (GNG-1) (LI *et al.*, 2007). A perda da subunidade *gna-1* leva à esterilidade dos órgãos femininos (IVEY *et al.*, 1996). A subunidade GNB-1 está associada à regulação da expressão dos genes *gna-1*, *gna-2* e *gna-3*, e o nocaute de *gnb-1* pode resultar em uma decaimento dos níveis do transcrito *gna-1*, ocasionando infertilidade feminina (YANG, POOLE, BORKOVICH, 2002). Li *et al.* (2005) caracterizaram os genes *mak-2* (*mitogen activated kinase-2*) e *pp-1* (*protoperithecium-1*), ambos essenciais para a formação do protoperitécio. A deleção de ambos os genes causa a total esterilidade dos órgãos femininos (LI *et al.*, 2005). Dois precursores de feromônios também foram

identificados em *N. crassa*, *mfa-1*, essencial para a atração dos tricóginos e para a fertilidade dos órgãos masculinos nos indivíduos do tipo a (KIM, METZEMBERG, NELSON, 2002) e *ccg-4*, o qual desempenha mesma função do gene *mfa-1* em linhagens do tipo A (BOBROWICS *et al.*, 2002). Adicionalmente, o gene *pre-1*, o qual codifica para um receptor de feromônios acoplado à proteína G, se mostrou essencial para as linhagens femininas do tipo A no reconhecimento e fusão de células do tipo a (KIM, BORKOVICH, 2004).

1.2. Metabolismo do glicogênio e sua regulação no fungo *Neurospora crassa*

O glicogênio é um polímero de glicose muito encontrado na natureza tanto em microrganismos quanto em eucariotos superiores. Ele é utilizado como carboidrato de reserva e juntamente com o amido nas plantas ele é considerado a maior fonte de carbono e energia. Trata-se de um polissacarídeo em que os resíduos de glicose estão unidos covalentemente por ligações glicosídicas α -1,4 lineares e ligações α -1,6 que ocorrem a cada 4 resíduos e responsáveis pela ramificação da molécula (NELSON; COX, 2008).

A síntese e degradação do glicogênio são bastante conservadas em eucariotos, sendo sua biossíntese mediada pela enzima glicogenina, a qual catalisa a formação de uma cadeia oligossacarídica de cerca de 10 resíduos que serve como ponto de partida para a extensão da cadeia pela enzima glicogênio sintase, catalisando a formação de novas ligações glicosídicas α -1,4, com UDP-glicose agindo como doador glicosil (ROACH, 2002). As ramificações da cadeia são introduzidas pela enzima ramificadora, pela conversão de ligações α -1,4 em α -1,6. A degradação do glicogênio se dá pela ação das enzimas glicogênio fosforilase, catalisando a fosforólise das ligações glicosídicas α -1,4, produzindo glicose-1-fosfato (G1P), e da enzima desramificadora, catalisando a quebra das ramificações α -1,6 (ROACH, 2002).

Para a síntese do glicogênio é necessário que a glicose entre na célula e seja fosforilada pela enzima hexoquinase para a formação de glicose-6-fosfato (G6P). A G6P pode ser usada para a síntese de glicogênio, metabolizada na via glicolítica para a produção de energia ou participar da via das pentoses para produção de pentoses e equivalentes redutores. Na síntese do glicogênio, G6P é primeiramente transformada em G1P pela enzima fosfoglicomutase, a qual será substrato para a produção de uridina difosfato-glicose (UDPG) pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. Assim, as moléculas de UDPG são as doadoras diretas de resíduos de glicose para a síntese de glicogênio (ROACH, 2002; NELSON; COX, 2008). Para que haja o início da síntese de glicogênio é necessário a presença da enzima glicogenina (GNN em *N. crassa*), uma enzima auto-glicosilável, que transfere resíduos de glicose provenientes da UDPG a resíduo(s) de tirosina (ALONSO *et al.*, 1995) até a formação de uma cadeia oligossacarídica. A elongação da síntese é

realizada pela enzima glicogênio sintase (GSN em *N. crassa*), a qual transfere resíduos de glicose da UDPG para extremidades não redutoras da molécula. As ligações glicosídicas do tipo α -1,6, responsáveis pela ramificação da molécula de glicogênio são catalisadas pela enzima ramificadora glicosil-(α -1,6)-transferase. Estas ramificações ocorrem equidistantemente a cada 10-14 resíduos de glicose, tornando o polissacarídeo mais compacto e solúvel e aumentando assim o número de extremidades não redutoras na molécula (NELSON; COX, 2008).

A degradação do glicogênio é catalisada pela enzima glicogênio fosforilase (GPN em *N. crassa*) através de uma reação de fosforólise, na qual as ligações glicosídicas α -1,4 que unem dois resíduos de glicose são atacadas por fosfato inorgânico, liberando uma molécula de glicose-1-fosfato (G1P). A enzima atua repetidamente sobre as extremidades não redutoras da molécula de glicogênio até que restem apenas quatro resíduos de glicose distantes do ponto de ramificação. A etapa restante da degradação é realizada pela enzima oligo (1,6) $\rightarrow$ (1,4) glicotransferase (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 glicogênio fosforilase. Resíduos de G1P, produtos finais da degradação do glicogênio, são novamente convertidos em G6P pela enzima fosfoglicomutase (NELSON; COX, 2008). Um esquema ilustrativo dos processos de síntese e degradação do glicogênio mostrando as enzimas existentes em *N. crassa* está apresentado na Figura 3.

Os processos de síntese e degradação do glicogênio são mecanismos muito bem conservados em eucariotos e possuem como enzimas regulatórias a glicogênio sintase (GS) e glicogênio fosforilase (GP). Essas enzimas 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 enzima GS sintase pode sofrer controle pós-traducional, via fosforilação/desfosforilação, através da ação de enzimas quinases e fosfatases e também por modulação alostérica, através do ligante G6P (HUANG, CABIB, 1974). Quando ela está na sua forma fosforilada ela se apresenta menos ativa e quando em sua forma desfosforilada ela se apresenta ativa, isso porque a fosforilação causa redução na atividade enzimática, efeito que é revertido na presença de G6P. Além da modulação alostérica por G6P, a GS também pode apresentar atividade alterada na presença dos inibidores ATP, UDP, fosfato inorgânico e outros intermediários metabólicos (PIRAS, ROTHMAN, CABIB, 1968). A GP possui apenas um sítio de fosforilação, Ser14, que é modificado pela ação da proteína quinase fosforilase. Quando essa enzima se apresenta

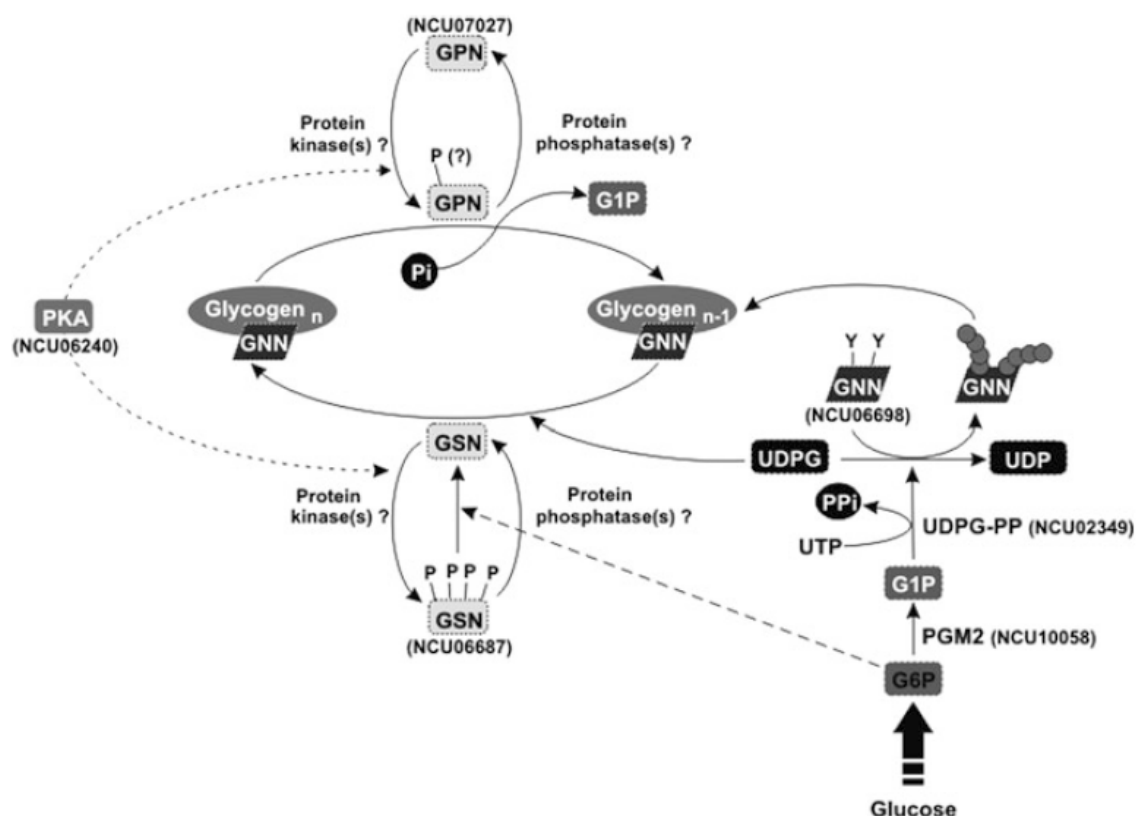


Figura 3- Representação esquemática da síntese e degradação do glicogênio em *N. crassa*. Glucose entra na célula e é convertida em UDPG, molécula doadora de glicose. A glicogenina (GNN), que é iniciadora da síntese de glicogênio, se autoglicosila, gerando extremidades não redutoras que permitem a elongação 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 sítios putativos de fosforilação são mostrados para GSN. As ORFs de *N. crassa* correspondentes aos produtos do metabolismo do 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).

fosforilada ela é ativa e quando desfosforilada ela está na sua forma menos ativa (NELSON; COX, 2008). Também está sujeita à regulação alostérica, tendo como modulador AMP (TÉLLEZ-IÑÓN; TORRES, 1970; JOHNSON, 1992; MADSEN, 1986).

Estudos realizados em nosso laboratório revelaram que, em condições de normais de crescimento, o conteúdo de glicogênio alcança um nível máximo ao fim da fase exponencial de crescimento vegetativo do fungo *N. crassa*, do mesmo modo que a transcrição do gene *gsn* é aumentada durante esta fase, diferentemente da levedura *S. cerevisiae*, na qual o acúmulo do carboidrato e a ativação da transcrição do gene *GSY2* ocorrem após a fase exponencial (DE PAULA *et al.*, 2002, NI, LAPORTE, 1995). Sob condições de estresse térmico, os níveis de glicogênio do fungo decaem rapidamente, restaurando os níveis normais do carboidrato quando reincubado à temperatura fisiológica.

Nesta situação, os níveis do transcrito *gsn* e *gpn* diminuem rapidamente, restaurando os valores iniciais quando reincubadas a temperatura fisiológica (30°C) (DE PAULA *et al.*, 2002, FREITAS E BERTOLINI, 2004). A atividade das enzimas glicogênio sintase e fosforilase sofre alterações quando submetidas a estresse térmico (NOVENTA-JORDÃO *et al.*, 1996).

Com o término do sequenciamento do genoma do fungo (GALAGAN *et al.*, 2003) e os avanços das metodologias disponíveis envolvidas na inativação de genes específicos em fungos filamentosos (NINOMIYA *et al.*, 2004), linhagens mutantes contendo genes que codificam fatores de transcrição individualmente nocauteados foram construídas (COLOT *et al.*, 2006) e disponibilizadas para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Assim, uma coleção de linhagens mutantes contendo ORFs codificadoras de fatores de transcrição individualmente nocauteadas foi adquirida pelo nosso laboratório, possibilitando a utilização destas linhagens para investigar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de regulação do metabolismo de glicogênio no fungo. Uma triagem realizada neste conjunto de linhagens mutantes, analisando o perfil de acúmulo de glicogênio nas condições normais de crescimento e em condição de estresse térmico, identificou um padrão no acúmulo do carboidrato diferente da linhagem selvagem em 17 das 147 linhagens mutantes adquiridas, sugerindo que estes fatores de transcrição possam estar envolvidos na regulação do acúmulo de glicogênio no fungo (GONÇALVES *et al.*, 2011). A análise da expressão dos genes *gsn* e *gpn* foi realizada nas linhagens que apresentaram alterações no acúmulo do carboidrato, nas condições normais de crescimento vegetativo (30°C) e na condição de choque térmico (45°C). A maioria das linhagens mutantes apresentou um decréscimo na expressão de ambos genes após o choque térmico, mesmo fenótipo apresentado pela linhagem selvagem. Entretanto, algumas linhagens apresentaram um padrão de expressão gênica alterado em relação à linhagem selvagem. Em algumas linhagens, a expressão dos genes pode ser correlacionada com o acúmulo de glicogênio, sugerindo que o fator de transcrição ausente nas linhagens atua direta ou indiretamente na expressão dos genes *gsn* e/ou *gpn* (BERTOLINI *et al.*, 2012). Dentre os fatores de transcrição estudados, destaca-se o fator de transcrição FLBC, uma proteína descrita estar envolvida no processo de desenvolvimento e regulação da conidiação em outros fungos filamentosos, foco de estudo deste trabalho.

2. O fator de transcrição FLBC de *N. crassa*

Estudos realizados para a elucidação da via de conidiação do fungo *A. nidulans* levaram à identificação de seis genes, *fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD* e *flbE*, os quais são requeridos para a conidiação e ativação de *brlA*, um regulador central da conidiação

(WIESER *et al.*, 1994). A mutação em qualquer um desses genes leva a um fenótipo denominado “*fluffy*”, devido ao aspecto cotonoso diferenciado observado pela massa de hifas vegetativas formada, descrito pela primeira vez por ADAMS *et al.* (1992). Mutações em qualquer um desses seis genes resultaram na formação de colônias com aspecto *fluffy* e uma grande redução da expressão de *brlA* (ADAMS, WIESER, YU, 1998).

A proteína FlbC foi caracterizada como um ativador de desenvolvimento do fungo, a qual é requerida para a iniciação da conidiação por meio da ativação do gene *brlA* (Figura 4). A proteína FlbC apresenta dois domínios *zinc finger* do tipo C₂H₂ na extremidade C-terminal, os quais se ligam a sítios específicos presentes nas regiões promotoras dos genes *brlA*, *abaA* e *vosA*, envolvidos no processo de conidiação do fungo (KWON *et al.*, 2010). O início da via de conidiação é dado pela ativação do gene *fluG*, o qual atua em dois processos distintos: a interrupção do crescimento vegetativo via ativação de *flbA* e a ativação do desenvolvimento que é realizada por duas vias, uma compreendendo o complexo FlbE/FlbB/FlbD e outra por FlbC, ambas ativando *brlA* (PARK, YU, 2012). Uma vez ativado, *brlA* é responsável pela transição do crescimento apical do conidióforo para a formação de vesícula. O passo seguinte do processo de conidiação é a ativação de *abaA* por BrlA na fase intermediária da conidiação, compreendendo a diferenciação e funcionalidade das fiálides. A fase final da conidiação se dá pela ativação do gene *wetA* pela proteína AbaA, o qual desencadeia a maturação e impermeabilidade dos conídios.

Além destes genes, o gene *vosA* atua como um regulador da negativo da conidiação, através da repressão do gene *brlA* (NI, YU, 2007). Este gene, juntamente com *wetA*, controla a biogênese de trealose (NI, YU, 2007, TAO, YU, 2011), tornando possível o envolvimento desta via regulatória no controle do metabolismo de carboidratos. O nocaute do gene *flbC* resulta em uma redução da expressão de *brlA* e *vosA*, além de apresentar um atraso no desenvolvimento dos conidióforos e na extensão do crescimento vegetativo (KWON *et al.*, 2010). Também foi descrito um aumento na produção de corpos de frutificação, sob condições limitantes de ar e ausência de luz, condições estas que são favoráveis para o desenvolvimento sexual. Análises de expressão gênica por *Northern blot* mostraram que o transcrito *flbC* foi detectado após 6 horas de crescimento vegetativo, mantendo níveis elevados até 24 h após a indução de desenvolvimento assexuado, indicando que a proteína FlbC desempenha importante papel na germinação dos esporos e no crescimento vegetativo de *A. nidulans* (KWON *et al.*, 2010). Adicionalmente, análises de localização nuclear mostraram que a proteína FlbC está presente no núcleo das hifas durante o crescimento vegetativo e também no núcleo de estruturas de desenvolvimento, como vesículas, metulae e fiálides, mas não nos conídios (KWON *et al.*, 2010).

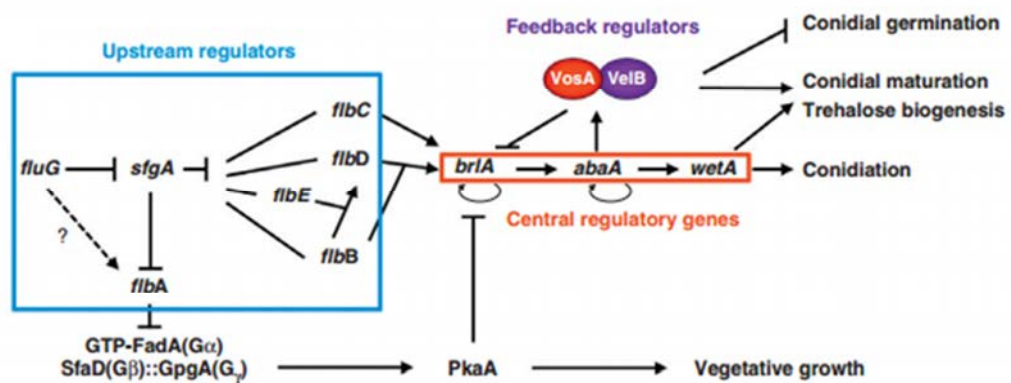


Figura 4- Modelo genético para reguladores centrais e *upstream* da conidiação em *A. nidulans* (PARK, YU, 2012).

Estudos realizados por Coppin (2002) identificaram a proteína FLE1 do fungo *Podospira anserina*, a qual possui homologia à proteína FlbC de *A. nidulans*. A proteína Fle1 atua na repressão da via de diferenciação sexual feminina do fungo. O nocaute do gene *fle-1* acarreta em dois fenótipos distintos: a ausência de conídios juntamente com um aumento da produção de protoperitécio. Este papel antagônico sugere que a diferenciação de órgãos femininos e a microconidiação são vias de desenvolvimento interconectadas (COPPIN, 2002). A linhagem mutante também apresentou defeitos no crescimento vegetativo, desenvolvendo hifas helicoidais, as quais formam estruturas de laço, raramente observadas na linhagem selvagem. Macroscopicamente, a linhagem *fle-1*^{KO} apresentou diferenças na pigmentação, apresentando coloração levemente rosa em vez de verde-escuro, e uma baixa densidade de hifas aéreas (COPPIN, 2002). Experimentos de PCR em tempo real mostraram que transcrito *fle-1* estava presente nos micélios e no peritécio, e a expressão da proteína recombinante FLE1-GFP foi detectada nos núcleos das hifas e nos ascósporos, indicando que o gene *fle-1* é expresso durante o crescimento vegetativo e durante a reprodução sexual (COPPIN, 2002). Estes dados são semelhantes aos descritos para a proteína FlbC de *A. nidulans* (KWON *et al.*, 2010).

As proteínas FLE1 e FlbC parecem exercer funções similares, já que ambas respondem a sinais que controlam a transição do crescimento vegetativo indiferenciado para o desenvolvimento, porém, agindo de maneiras diferentes (COPPIN, 2002). Em *A. nidulans*, FlbC age como um regulador positivo da conidiação, ativando uma via de central da conidiação do fungo (KWON *et al.*, 2010). Em *P. anserina*, FLE1 atua como um regulador negativo da via de diferenciação sexual feminina, com sua deleção resultando na redução da conidiação e no aumento da formação de estruturas sexuais de frutificação (COPPIN, 2002).

Em *N. crassa*, o produto da ORF NCU03043 codifica para uma proteína anotada no banco de dados do fungo como um fator de transcrição contendo um domínio *zinc finger* do tipo C₂H₂, a qual possui homologia com as proteínas FlbC de *A. nidulans* e FLE1 de *P. anserina*. Estudos realizados, em nosso laboratório, por Corrocher (2012) mostraram que a linhagem nocauteada no gene *flbC* apresentou severas alterações fenotípicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do fungo, entre eles a redução da capacidade de conidiação, apresentando poucos microconídios, hifas aéreas reduzidas, alteração da morfologia das hifas, apresentando um aumento de septação e produção acentuada do pigmento melanina (CORROCHER, 2012). A linhagem mutante também apresentou uma desregulação no metabolismo de glicogênio, apresentando níveis elevados de glicogênio antes e após o choque térmico e um alto nível do transcrito *gsn* após o choque térmico quando comparada à linhagem selvagem (GONÇALVES *et al.*, 2011, CORROCHER, 2012). Os dados sugerem que a proteína FLBC desempenha importante papel no desenvolvimento do fungo e também na regulação do metabolismo de glicogênio. Entretanto, estes resultados são preliminares, e uma caracterização mais detalhada da proteína é necessária.

Objetivos

O trabalho apresentado nesta Dissertação está inserido em um projeto maior do laboratório, com o objetivo identificar e caracterizar proteínas atuando como reguladoras do metabolismo de glicogênio no fungo *Neurospora crassa*. Como descrito anteriormente, a proteína FLBC foi identificadas anteriormente como uma provável reguladora do metabolismo de glicogênio e também do desenvolvimento do fungo. Alguns resultados preliminares haviam sido obtidos no laboratório, e o presente trabalho teve como objetivo principal dar continuidade aos estudos já iniciados. Os principais objetivos foram:

1. Caracterizar a linhagem *flbC*^{KO} em relação a sua morfologia. As análises de crescimento em meio sólido e de germinação dos microconídios foram realizadas utilizando a técnica de microscopia de fluorescência para a caracterização da linhagem mutante.

2. Avaliar o acúmulo de glicogênio nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO}. Como a proteína FLBC foi identificada como um provável regulador do metabolismo de glicogênio, o conteúdo do carboidrato foi quantificado durante o crescimento vegetativo das linhagens, confirmando dessa maneira o envolvimento do fator de transcrição na regulação do metabolismo de glicogênio do fungo.

3. Analisar a expressão do gene *flbC* e dos genes que codificam proteínas do metabolismo de glicogênio durante o desenvolvimento do fungo. Como a proteína FLBC participa no desenvolvimento do fungo, foi analisada a expressão do gene *flbC* no desenvolvimento assexual e no crescimento vegetativo. A expressão dos genes envolvidos no metabolismo de glicogênio também foi analisada nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO} durante o crescimento vegetativo.

4. Analisar o papel do fator de transcrição FLBC na regulação de genes relacionados ao metabolismo de glicogênio. Foi investigada a capacidade de ligação da proteína FLBC recombinante à região promotora dos genes relacionados ao metabolismo de glicogênio através de ensaios de DNA gel *shift*.

5. Identificar genes homólogos a *vosA*, *brlA*, *abaA* e *wetA*, descritos como envolvidos na regulação do processo de conidiação em *A. nidulans*. Em *A. nidulans*, os genes *wetA* e *brlA* desempenham importante papel na regulação da conidiação do fungo, sendo *vosA*, *abaA* e *brlA* regulados diretamente por FlbC. A deleção de qualquer um dos componentes desta cascata de conidiação leva a alterações morfológicas das estruturas de conidiação e diminuição da viabilidade celular. Um primeiro objetivo foi identificar genes ortólogos em *N.*

crassa e, posteriormente, analisar a possível regulação destes genes por FLBC. Para isto, análises de expressão gênica foram realizadas durante o crescimento vegetativo e após a indução do desenvolvimento assexuado do fungo nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO}. A capacidade de ligação da proteína FLBC às regiões promotoras de tais genes foi analisada, com o objetivo de investigar sua regulação pelo fator de transcrição.

6. Analisar o conteúdo de carboidratos de reserva nas linhagens mutantes nos genes acima mencionados. Os genes *vosA* e *wetA* controlam a via de biossíntese de trealose nos fungos *A. nidulans* e *Aspergillus fumigatus*, respectivamente (NI, YU, 2007, Tao, YU, 2011). O nocaute destes genes ocasiona a ausência do carboidrato trealose no fungo, conferindo a suscetibilidade a diferentes tipos de estresses e uma brusca diminuição na viabilidade celular. Dessa maneira, o conteúdo de glicogênio e de trealose foi analisado nas linhagens mutantes *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO} de *N. crassa*, elucidando a possível participação destas proteínas na regulação do metabolismo de carboidratos do fungo.

Materiais e Métodos

1. Linhagens estudadas

1.1- *Neurospora crassa*

1. Linhagem selvagem FGSC#2489 A
2. Linhagens mutantes:
 - FGSC#11355 A, linhagem mutante na ORF NCU03043 (NCU03043::*hyg*), anotado no banco de dados do fungo com fator de transcrição FLBC.
 - FGSC#13536 A, linhagem mutante na ORF NCU05964 (NCU05964::*hyg*), anotada no banco de dados do fungo como “regulador do desenvolvimento VOSA”.
 - FGSC#11204 A, linhagem mutante na ORF NCU01033 (NCU01033::*hyg*), anotada no banco de dados do fungo como uma proteína hipotética, denominada como *WetA-like* neste trabalho.
 - FGSC#15901 A, linhagem mutante na ORF NCU02612 (NCU02612::*hyg*), anotada no banco de dados do fungo como uma proteína hipotética, denominada como *AbaA-like* neste trabalho.

As linhagens foram adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center*, Kansas City, MO, USA.

2. Meios de cultura

2.1. Meios de cultivo para *N. crassa*

2.1.1. Meio Mínimo de Vogel (VM)

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956), acrescido de sacarose 2%, biotina (0,1 mg/mL) e, para o cultivo em meio sólido, 2% de ágar. As diferentes linhagens foram crescidas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM e para as linhagens FGSC#13536, FGSC#11204 e FGSC#15901, foram adicionados 200 µg de higromicina B (0,2 mg/mL, Invitrogen), a 30°C por 3 dias e em seguida, expostas à luz de 9 a 10 dias. Após esse período os conídios foram coletados, adicionando-se aproximadamente 10 mL de água destilada estéril à garrafa, seguida da filtração em gaze estéril para a retenção das hifas. A suspensão contendo os conídios foi então contada em câmara de Neubauer.

O meio VM é um meio quimicamente definido, com pH 5,8, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 50x concentrada. Esta solução estoque é feita a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 ml de água destilada:

125 g citrato de sódio. $2\text{H}_2\text{O}$

250 g KH_2PO_4

100 g NH_4NO_3

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

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

5 mL de solução de elementos traços

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

A solução de elementos traço utilizada no preparo do meio VM é feita a partir da dissolução dos compostos apresentados abaixo em 95 mL de água destilada:

5 g ácido cítrico. H_2O

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

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

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

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

0,05 g H_3BO_3 (anidro)

0,05 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2.1.2. *Synthetic Cross medium (SC)*

O meio utilizado para indução da microconidiação da linhagem selvagem foi o meio SC (WESTERGARD, MITCHELL, 1947) em concentração 0,1x, acrescido de sacarose 0,5%, iodoacetato de sódio 1 mM e 2% de ágar (EBBOLE, SACHS, 1990).

O meio SC trata-se de um meio quimicamente definido com pH 6,5. É preparado como uma solução estoque 2 x concentrada, a qual é feita através da dissolução completa dos sais a seguir em 800 mL de água destilada:

2 g KNO_3

1,4 g K_2HPO_4

1 g KH_2PO_4

0,2 g NaCl

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

0,2 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 mL de solução estoque de biotina (0,1 mg/ mL)

0,2 mL de solução estoque de elementos traços

Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 1 L com água destilada, 667 µl de clorofórmio foram adicionados como agente conservante, e a solução foi armazenada a 4°C.

2.2. Meio de cultivo para *E. coli*

O meio de cultivo para o crescimento foi o meio 2YT com adição de glicose.

1,6% triptona

1% extrato de levedura

0,5% NaCl

0,2% glicose

3. Propagação das linhagens de *N. crassa*

3.1. Obtenção de conídios

As diferentes linhagens foram crescidas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM sólido e, para as linhagens FGSC#13536 (*vosA*^{KO}), FGSC#15901 (*abaA-like*^{KO}) e FGSC#11204 (*wetA-like*^{KO}), acrescido de higromicina B (0,2 mg/mL), a 30°C por 3 dias e, então, expostas à luz por um período total de 9 a 10 dias. Após esse período, os conídios foram coletados, adicionando-se um volume aproximado de 10 mL de água destilada estéril à garrafa, seguida por uma etapa de filtração em gaze estéril para a retenção das hifas. A suspensão conidial recolhida foi então contada em câmara de Neubauer.

Para a obtenção de microconídios, as linhagens selvagem e mutante *flbC*^{KO} foram crescidas em garrafas de vidro à temperatura ambiente por um período de 7 a 10 dias. Após esse período, os microconídios foram coletados através da adição de aproximadamente 10 mL de água destilada estéril seguida da filtração em sistema Millex-SV 5 µm para a retenção de hifas. A suspensão contendo os microconídios foi coletada em tubo tipo Falcon estéril e contada em câmara de Neubauer.

3.2. Crescimento vegetativo e indução do desenvolvimento assexual

O crescimento vegetativo foi realizado nas linhagens selvagem e mutantes. Para isto, conídios (10⁷ células/ mL)/ pedaços de hifas foram inoculados em meio VM e mantidos sob agitação constante a 200 rpm, 30 °C. Alíquotas foram coletadas nos tempos de 12, 24, 30,

36, 48, 60 e 72 h, filtradas e congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior extração de RNA e também para a quantificação de carboidratos de reserva.

A indução do desenvolvimento assexual foi realizada nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO}, com base no protocolo descrito por Greenwald *et al.* (2010), onde foram inoculados uma suspensão de conídios (10⁸ células/ mL)/ pedaços de hifa em 4 L de meio VM para a linhagem selvagem e frascos contendo 200 mL de meio VM para linhagem *flbC*^{KO} e mantidos a 200 rpm, 20 h, 25°C. Alíquotas de 50 mL foram coletadas e filtradas, sendo que a primeira alíquota (tempo 0 h) foi imediatamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C. As demais amostras foram colocadas na superfície de placas de petri contendo meio VM sólido recoberto com uma membrana de celofane e expostas à luz constante (luz branca) e temperatura ambiente. As amostras foram coletadas nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 h. O tapete micelial formado sobre a membrana de celofane foi congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C para a posterior extração de RNA total.

4. Análises morfológicas das linhagens mutantes

Foram realizadas análises fenotípicas do fungo nas linhagens selvagem FGSC#2489 e mutantes *vosA*^{KO}, *flbC*^{KO} e *wetA-like*^{KO}.

4.1. Crescimento em meio sólido

Para analisar o aspecto macroscópico das linhagens, tais como produção do pigmento melanina, hifas aéreas e conidiação, as linhagens selvagem e mutantes foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio VM sólido e mantidas a 30°C por 3 dias. Em seguida, os frascos foram transferidos para temperatura ambiente por um período de 5 dias. Após esse período, o aspecto macroscópico das linhagens foi analisado.

4.2. Análise das extremidades das hifas

A visualização das extremidades das hifas das linhagens selvagem e mutantes foi realizada em placas de Petri contendo 30 mL de meio VM sólido acrescido de sacarose 2%. Para tal, foram inoculados 10 µL de uma suspensão conidial (10⁷ células/ mL)/pedaços de hifas no centro das placas, as quais foram incubadas a 30°C por 12 h. As imagens foram obtidas com o auxílio de um estereomicroscópio trinocular SteREO Discovery.V8 (Zeiss) com câmera fotográfica acoplada.

4.3. Germinação de microconídios da linhagem *flbC*^{KO}

A linhagem *flbC*^{KO} apresenta severos defeitos de conidiação produzindo apenas poucos microconídios (CORROCHER, 2012), tendo sido necessária a indução da microconidiação da linhagem selvagem para efeito comparativo nas análises morfológicas. Para os experimentos de germinação, foram cortados discos de 2 cm de diâmetro de meio VM sólido, os quais foram depositados em placas de Petri. Uma suspensão de microconídios das linhagens selvagem e mutante (10^5 células/mL) foi adicionada sobre os discos e estes foram recobertos com uma lamínula e incubados a 30 °C pelos tempos de 12, 18, 24, 36 e 48 h. Após esse período, as lamínulas foram retiradas e submetidas a diferentes tratamentos.

4.3.1. Visualização da parede celular e septos

A análise da morfologia das hifas foi realizada por microscopia de fluorescência. As células foram tratadas com calcofluor pela adição de 100 µL de uma solução 1 mg/mL de calcofluor sobre a lamínula, a qual foi incubada à temperatura ambiente por 15 min. Em seguida, a lamínula foi lavada 2 vezes com PBS 1x (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) e analisada por meio de microscopia de fluorescência utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss).

4.3.2. Visualização dos núcleos

Para a visualização dos núcleos, as lamínulas foram incubadas com solução 3,7% (v/v) de formaldeído, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0 e 0,2% (v/v) de triton X-100 à temperatura ambiente por 30 min para fixação das células e então lavadas com PBS 1x. Em seguida, foram adicionados 100 µL de uma solução 1 µg/mL de DAPI sobre a lamínula, a qual foi incubada à temperatura ambiente por 5 min. Após esse período, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x e analisadas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss).

4.4. Germinação de conídios

4.4.1. Germinação dos conídios em cultura líquida

Para esta análise, conídios (10^7 células/mL) foram inoculados em frascos contendo meio VM líquido e mantidos sob agitação constante de 200 rpm a 30 °C. Nos tempos de 2, 4,

6, 8, 10 e 12 h, amostras foram coletadas e a germinação dos conídios foi analisada por microscopia utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss).

4.4.2. Germinação dos conídios em placas de Petri

A germinação dos conídios também foi realizada em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo uma lamínula depositada no centro, a qual foi recoberta com 2 mL de meio VM líquido. Uma suspensão de conídios (10^7 células/mL) foi adicionada ao meio de cultura e as placas foram incubadas a 30°C pelos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h. Em seguida, as lamínulas foram retiradas e lavadas com PBS 1x e tratadas com solução 1 mg/mL de calcofluor para a visualização de parede celular e septos ou com solução 1 µg/mL de DAPI para a visualização de núcleos.

5. Análise da viabilidade dos conídios

Para isto, conídios recém coletados foram diluídos em placas de 96 poços onde em cada poço foram colocados 180 µL de meio VM líquido, com exceção da primeira coluna, onde foi colocado 200 µL de suspensão conidial numa densidade de 10^8 células/mL. Diluições seriadas foram realizadas a partir da amostra inicial até uma atingir uma densidade de 10^1 células/mL. Posteriormente, 5 µL de cada diluição foram transferidos para placas de Petri contendo meio VM acrescido de sorbose 2%, glicose 0,05% e frutose 0,05%. As placas foram incubadas a 30°C por 24 h.

A análise de viabilidade dos conídios também foi realizada utilizando o corante azul de metileno. Para isto, foram adicionados 950 µL do corante azul de metileno em um tubo de 1 mL, seguido da adição de 50 µL de uma suspensão conidial fresca ao tubo contendo o corante e então incubado a temperatura ambiente por 10 min. Após esse período, as células coradas de azul foram contadas em câmara de Neubauer e a taxa de sobrevivência foi expressa em percentual de células totais.

6. Análise do crescimento por massa seca

Foi verificado que a linhagem *vosA*^{KO} possui um retardo nos estágios iniciais do germinação em relação à linhagem selvagem. Desse modo, a análise do peso seco durante o crescimento da linhagem mutante foi realizado e comparado à linhagem selvagem. Para tal, uma suspensão conidial das linhagens selvagem e mutante (10^7 células/mL) foram inoculadas em meio VM líquido e mantidas sob agitação constante de 200 rpm, 30°C, nos

tempos de 12, 24, 36, 48 e 60 h. Os micélios obtidos em cada período de tempo foram filtrados e secos em estufa a 98°C por um período de 16 h e pesados em balança analítica.

7. Determinação do conteúdo de glicogênio e trealose

7.1. Preparo do extrato celular

Os conteúdos de glicogênio e trealose foram determinados ao longo do crescimento vegetativo. Para tal, micélios das linhagens foram coletados nos tempos de 12, 24, 30, 36, 48 e 60 h e congelados em nitrogênio líquido. O preparo do extrato celular bruto foi realizado pulverizando as amostras de micélio em um gral de porcelana com nitrogênio líquido. Aproximadamente 200 mg de cada uma das amostras foram transferidas para tubos Eppendorf de 1,5 mL contendo 1,0 mL de tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 10 µg/mL TLCK, 50 µg/mL antipaína e 1 µg/mL pepstatina A), homogeneizadas em agitador *vortex* e centrifugadas a 10.000 x *g*, 10 min, 4°C. As frações sobrenadantes foram recolhidas em novos tubos e utilizadas para a determinação do conteúdo de glicogênio e de proteínas totais (HARTREE, 1972) utilizando BSA como padrão.

7.2. Determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio foi determinado através da digestão do glicogênio com α -amilase e amiloglicosidase após precipitação com etanol, de acordo com protocolo descrito por Hardy e Roach (1993). Para isto, as proteínas contidas em 100 µL de cada uma das amostras foram precipitadas com 25 µL de uma solução TCA 50% a 5.000 x *g*, 10 min, 4°C. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos, misturados com 4 volumes de etanol absoluto gelado durante 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%, secos ao ar, e ressuspensos em 400 µL de uma solução tampão (50 mM acetato de sódio pH 5,2, 5 mM CaCl₂) contendo 1 µL de cada uma das enzimas amiloglicosidase (30 mg/mL) e α -amilase (10 mg/mL) 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) em um comprimento de onda de 505 nm no espectrofotômetro Beckman, modelo DU-640 nm. O conteúdo de glicogênio das amostras foi calculado de acordo com uma curva padrão de glicogênio e expresso em µg de glicogênio/mg de proteínas totais. A curva padrão de glicogênio foi preparada a partir de

uma solução de glicogênio puro (Sigma) em solução acetato (50 mM acetato de sódio, pH 5,2, 5 mM CaCl_2) na concentração de 10 mg/mL.

7.3. Determinação do conteúdo de trealose

A quantificação de trealose foi realizada através da digestão de trealose utilizando a enzima trealase como descrito por Neves *et al.* (1991). Para isto, 250 μL de 300 mM acetato de sódio, pH 5,5 contendo 30 mM CaCl_2 foram adicionados a 100 μL do extrato proteico. Em seguida, foram adicionados 50 μL da enzima trealase (1,5 U), purificada do fungo *Humicola grisea*, e as amostras foram incubadas a 50 °C por 16 h. Após esse período, foi realizada a inativação da enzima trealase, aquecendo as amostras a 100 °C por 10 min, seguida de centrifugação a 10.000 $\times g$, 5 min, temperatura ambiente. O sobrenadante foi recolhido em tubos limpos. Um volume de 12,5 μL de cada uma das amostras digeridas foi utilizado para a determinação do conteúdo de glicose livre, utilizando o kit Glicose PAP Liquiform (Labtest) em um comprimento de onda de 505 nm no espectrofotômetro Beckman, modelo DU-640 nm. O conteúdo de trealose das amostras foi calculado com base em uma curva padrão de trealose e expressa em μg de trealose/mg de proteína total. A curva padrão de trealose foi preparada a partir de uma solução 5 mM de trealose pura (Calbiochem) em solução de 300 mM acetato de sódio pH 5,5, 30 mM CaCl_2 .

8. Extração de RNA total e análise da expressão gênica

8.1. Extração de RNA total

O procedimento utilizado para a extração de RNA total foi o que utiliza cloreto de lítio como descrito por SOKOLOVSKY *et al.* (1990). Uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizada em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para micro tubos 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. A suspensão foi homogeneizada em *vortex* durante 5 min, em temperatura ambiente e centrifugada a 10.000 $\times g$, 10 min, 4 °C. 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 $\times g$, 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 coletado a 10.000 $\times g$, 10 min, 4 °C. O precipitado foi solubilizado em 300 μL de água tratada com DEPC e novamente precipitado com 30 μL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 750 μL de etanol absoluto gelado a 4 °C, durante 5 min. O RNA total foi

coletado a 10.000 x *g*, 10 min, 4°C, lavado duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a 10.000 x *g*, 10 min, 4°C, seco e dissolvido em 50-100 µL de água previamente tratada com DEPC. A concentração do RNA foi quantificada a 260 nm utilizando o espectrofotômetro Beckman, modelo DU-640 e a pureza das amostras foi analisada através da relação das absorbâncias a 260/280 nm.

8.2. PCR quantitativo

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR). Inicialmente, as amostras de RNA (20 µg) foram tratadas com DNase RQ1 RNase-Free (Promega®). Após essa primeira etapa, utilizou-se para a síntese do cDNA o kit SuperScript III First Strand (Invitrogen®) e oligo dT. As análises de qPCR foram realizadas no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems®) utilizando como fluoróforo SYBR® Green e como controle endógeno o gene *tub-2*. Os oligonucleotídeos específicos para os genes analisados e *tub-2* foram desenhados utilizando a plataforma da IDT (<http://www.idtdna.com/>) e estão apresentados na Tabela 1. Os experimentos foram realizados pelo Método Comparativo CT ($\Delta\Delta CT$) (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001). Foram realizadas 3 réplicas biológicas para os experimentos e para cada experimento foram analisadas, no mínimo, 3 réplicas experimentais. Os dados analisados com o *software* StepOne v2.1 (Applied Biosystems®).

Tabela 1– Oligonucleotídeos utilizados nas análises por qPCR.

Nome	Sequência
qflbC-F	5'-CAGACTCGTACGGCTTCCCTCAG-3'
qflbC-R	5'-CTGATCGACCCATCGACTGAACCG-3'
qabaA-F	5'-CAATACCACTCACATCCTAGTC-3'
qabaA-R	5'-ACAATCTCGTCCCACTCT-3'
qwetA-F	5'-CATCATCGCTTTCTCCTCCTC-3'
qwetA-R	5'-AGGAGCGAGGTTTGGATTAG-3'
qgpn-F	5'-TGCCAATATCGAAATCACCCGCGA-3'
qgpn-R	5'-TCTCGATGGCCTCAAACACCTTGA-3'
qgdn-F	5'-TCTGCGATGCCGAGTTGT-3'
qgdn-R	5'-ACTCGTTGCCCTCGAAGT-3'
Oligo-dTV	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'
4054Tub-F	5'-CCTCCACCTTCGTGGTAAGTCC-3'
4054Tub-R	5'-GGTACTGCTGGTACTCGGAGACG-3'

9. Ensaio de produção e purificação de proteína recombinante

A proteína FLBC já havia sido produzida na forma recombinante em nosso laboratório por mestrandia (Corrocher, 2012), tanto fusionada à cauda poli-His (His::FLBC) como fusionada à proteína GST (GST::FLBC) e as condições de produção e purificação da proteína recombinante His::FLBC já haviam sido padronizadas. Os procedimentos para a análise da solubilidade da proteína recombinante GST::FLBC e a otimização das condições de purificação estão descritas a seguir.

9.1. Análise de solubilidade em pequena escala

Os clones transformantes foram inoculados em 5 mL de meio 2YT + 0,2% de glicose, adicionado de ampicilina (100 µg/µL) e cloranfenicol (34 µg/µL) crescidos por 16 h a 37°C, 250 rpm. Em seguida, 30 µL do pré-inóculo foi transferido para um frasco contendo 30 mL de meio 2YT + 0,2% de glicose nas mesmas condições acima até atingir uma D.O._{600nm} de aproximadamente 0,6-0,8. Foi coletada uma alíquota de 1 mL da cultura (amostra não induzida, NI), e as células foram coletadas por centrifugação (18.000 x g 30 seg, 4°C) e em seguida, armazenadas a -20°C. Ao restante da cultura, foram adicionados 0,4 mM de IPTG para a indução da proteína recombinante (250 rpm, 4 h, 30°C). Após a indução, as células foram coletadas (30.000 x g, 3 min, 4°C) e armazenadas a -20°C. Os precipitados celulares foram ressuspensos em 3 mL de tampão A (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) acrescido de 0,5% tween-20, 0,5% triton x-100 e de inibidores de proteases (1 mM PMSF, 10 mM benzamidina e 1 mM DTT). As células foram lisadas em sonicador (SONICS, VibraCell) com 5 pulsos de 30 seg e intervalos de 30 seg no gelo (potência 30%). O lisado celular foi centrifugado (30.000 x g, 20 min, 4°C) para separação do sobrenadante, o qual foi recolhido em tubo limpo. O precipitado foi ressuspenso em 1 mL de mesmo tampão acima, assim como as células não induzidas (200 µL).

Após a quantificação de proteínas, um volume contendo aproximadamente 10 µg de proteína total das amostras não induzida (NI), sobrenadante (S) e precipitado (P) foi separado por SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 200 V durante 50 min, no sistema de eletroforese vertical Mini-Protean III (Bio-Rad) e o gel foi corado com Coomassie-Blue Brilliant R-250.

9.2. Ensaio de *Western Blot*

Para a confirmação da produção da proteína recombinante, o ensaio de *Western blot* foi realizado. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de

nitrocelulose em um sistema Mini *Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell* (BioRad) usando o tampão de transferência (20 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM glicina, 200 mL/L de metanol) por 1 h, 100 V, 250 mA. A membrana foi então incubada com uma solução 6% de leite em pó desnatado em tampão 1x TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% tween-20) com suave agitação durante 2 h para permitir o bloqueio da mesma. Após esse período, a membrana foi lavada com 1X TBST (3 vezes por 5 min) e incubada com anticorpo monoclonal anti-GST conjugado com peroxidase (GE, diluição 1:5.000 em 1X TBST + 3% leite) por 1 h à temperatura ambiente, com suave agitação. Em seguida, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com 1X TBST e procedeu-se à revelação com 5 mL de solução reveladora de peroxidase (100 mM Tris-HCl, 0,2 mM ácido p-cumárico, pH 8,5) adicionado de 50 µL de luminol (125 mM) e 1,5 µL de peróxido de hidrogênio concentrado.

9.3. Produção e purificação da proteína recombinante

Para a produção das proteínas GST e GST::FLBC em maior escala, células de *E. coli* BL21 (DE3)pLys-S carregando as construções pGEX-4T1 e pGEX-FLBC foram crescidas em 500 mL de meio 2YT + 0,2% de glicose a 250 rpm, 37°C até uma D.O._{600nm} de aproximadamente 0,6-0,8. Em seguida, a produção das proteínas GST e GST::FLBC foi induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG a 250 rpm, 4 h, 37°C. Após esse período, as células foram coletadas por centrifugação (9.300 x *g*, 5 min, 4°C) e ressuspensas em 60 mL de tampão A gelado (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) acrescido de 0,5% tween-20, 0,5% triton x-100 e de inibidores de proteases (1 mM PMSF, 10 mM benzamidina e 1 mM DTT). As células foram lisadas em sonicador (SONICS, VibraCell) com 5 pulsos de 30 seg e intervalos de 30 seg no gelo, com potência de 30%. Os lisados celulares foram centrifugados (30.000 x *g*, 20 min, 4°C), os sobrenadantes recolhidos em tubos limpos, filtrados em filtro de 0,22 µm e submetidos à cromatografia de afinidade com coluna GSTrap-HP (GE), utilizando o sistema de purificação Akta Prime.

Para a purificação das proteínas, a coluna foi inicialmente equilibrada em tampão A (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3) adicionado de inibidores de protease (1 mM PMSF, 10 mM benzamidina e 1 mM DTT). Cerca de 60 mL do sobrenadante, obtido anteriormente, foi aplicado na coluna e a mesma foi lavada com o tampão A. A seguir, foi aplicado o tampão B (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM glutatona, acrescido de 1 mM DTT) para a eluição da proteína recombinante. Frações de 1 mL foram coletadas durante a etapa de eluição das proteínas e analisadas em gel SDS-PAGE 10% para a identificação das frações cromatográficas contendo a proteína de interesse. As frações que mostraram maior grau de pureza da proteína foram misturadas e concentradas em Amicon 30.000 MW. Durante a concentração o tampão foi sendo gradativamente trocado

para o utilizado no ensaio de DNA gel *shift* (10 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7,9, 15% glicerol, acrescido de 0,5 mM DTT). No final, as proteínas foram armazenadas em pequenas alíquotas e armazenadas a -80°C.

10. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir de micélio da linhagem selvagem obtido após crescimento vegetativo a 250 rpm, 30°C por 24 h. 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 µL de tampão de extração de DNA genômico (200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 1% SDS) e 500 µL de uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e homogeneizado em vórtex. O sobrenadante foi separado por centrifugação (16.000 x g, 10 min, 4°C) e transferido para novo microtubo e precipitado em 50 µL de 3 M acetato de sódio, pH 5,2 e 950 µL de isopropanol a -80°C por 30 min. O precipitado foi recolhido (16.000 x g, 10 min, 4°C) e ressuspensão em 100 µL de água e digerido com uma solução contendo RNase A (10 mg/mL) a 37°C, 30 min. Foi realizada nova extração com 200 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1, homogeneizado em vórtex e centrifugado (16.000 x g, 10 min, 4°C). A fase aquosa foi recolhida em novo microtubo e realizada uma nova precipitação a baixa temperatura com 40 µL de 7,5 M acetato de amônio e 750 µL de etanol absoluto gelado, e a seguir, recolhido (16.000 x g, 10 min, 4°C) e lavado 3 vezes com 700 µL de etanol 70%, seco ao ar, e ressuspensão em 50 a 100 µL de água. A concentração de DNA foi quantificada em NANOVue™ PLUS (GE) no comprimento de onda de 260 nm e a pureza da amostra foi analisada através da relação das absorbâncias a 260/280 nm.

11. Ensaios de DNA gel *shift* (EMSA)

Os ensaios de alteração da mobilidade de DNA em gel foram realizados para verificar a ligação das proteínas recombinantes His::FLBC e GST::FLBC às regiões promotoras dos genes.

11.1. Preparo das sondas de DNA

Oligonucleotídeos foram desenhados para a amplificação por PCR de fragmentos de DNA da região promotora dos genes *vosA* (*pvosA*), *gdn* (*pgdn*) e *gpn* (*pgpn*), os quais apresentam o *motif* de ligação da proteína FlbC de *A. nidulans*. Também foram desenhados

oligonucleotídeos para a amplificação de fragmentos de DNA da região promotora dos genes *wetA* (*pwetA*), *abaA* (*pabaA*), *gdn* (*pgdn*) e *gpn* (*pgpn*), os quais apresentam o *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* (Tabela 2).

Os fragmentos de DNA foram amplificados por PCR em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf). Foram feitas 6 reações para cada sonda, utilizando-se para cada reação 1 µL de DNA genômico (1 µg/µL), 0,5 µL (1,25 U) da enzima Taq Polimerase recombinante (Invitrogen), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão 10x, 1 µL de dNTP (10 mM cada) e 2,5 µL de MgCl₂ (50 mM). A mistura foi homogeneizada e acrescida de 3 µL de α-[³²P]dATP (10⁴ cpm) e submetida à PCR, nos seguintes ciclos: desnaturação (96°C, 1 min), anelamento (49,5-55,6°C, 1 min) e extensão (72°C, 30 seg), por 30 ciclos, em um volume final de 50 µL para cada reação.

Os produtos das reações foram purificados pela precipitação com 1 mL de isopropanol, 1/10 do volume da reação com 3,0 M NaOAc, pH 5,2 e 1/10 do volume da reação com glicogênio (20 mg/mL) a -80°C/16 h. Os precipitados foram recolhidos por centrifugação (20.800 x *g*, 30 min, 4°C), lavados duas vezes com etanol 70% e ressuspensos em água. Os produtos purificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose *low melting point* 2% (Sigma) em tampão TAE 1x (400 mM Tris-HCl, pH 8,0; 200 mM ácido acético glacial; 10 mM EDTA) contendo 0,5 µg/mL brometo de etídio. As bandas correspondentes aos tamanhos dos fragmentos esperados foram excisadas do gel e solubilizadas a 65°C, 10 min. A seguir, foi realizada a adição de 200 µL de fenol saturado, a mistura foi homogeneizada e centrifugada (18.000 x *g*, 5 min, temperatura ambiente). A fase aquosa foi transferida para tubo limpo e adicionado 500 µL de solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizada e centrifugada (18.000 x *g*, 5

Tabela 2– Oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeos	Sequências	Tamanho esperado	Localização do <i>motif</i> na região promotora	<i>Motif</i> identificado
<i>pvosA</i> -F <i>pvosA</i> -R	5'-GCCTAAGCGATTCCGTC-3' 5'-CCAAGCACAAAGGCAGGC-3'	188 pb	-798 pb	<i>A. nidulans</i>
<i>pgdn</i> -F <i>pgnd</i> -R	5'-TAACTCTCACAGCGGTTCG-3' 5'-GCTGACCGCAACAAGACC-3'	204 pb	-1593 pb	<i>A. nidulans</i>
<i>pwetA</i> -F <i>pwetA</i> -R	5'-GGAGCCCTTGTACCGCCGA-3' 5'-AGGATGTGGCACTGGAAGAG-3'	212 pb	-2220 pb	<i>N. crassa</i>
<i>pabaA</i> -F <i>pabaA</i> -R	5'-GGATGGTGAAAGTGATGATG-3' 5'-AGCCAGTCATCATCAGTAGC-3'	200 pb	-2774 pb	<i>N. crassa</i>
<i>pgdn</i> -F1 <i>pgdn</i> -R1	5'-CGGACAAGCAGGGAGAAGCG-3' 5'-GGAAAAAGGAACGAAGCGAG-3'	201 pb	-1916 pb	<i>N. crassa</i>
<i>pgdn</i> -F2 <i>pgdn</i> -R2	5'-GGTCTTGTTGCGGTCAGCGTC-3' 5'-CAAGTTGCGAGTCGAGAGAGC-3'	201 pb	-1356 pb	<i>N. crassa</i>
<i>pgpn</i> -F <i>pgpn</i> -R	5'-CGGGAGGTTGGGAGCAGAGG-3' 5'-CTGCCACTCCTTACTAACTTC-3'	180 pb	-1821 pb	<i>N. crassa</i>

min, temperatura ambiente). A fase aquosa foi transferida para tubo limpo e precipitada com 1/10 do volume do tubo em 3 M NaOAc pH 5,2, etanol absoluto gelado e 10 µL de glicogênio (20 mg/mL) e armazenada a -80°C, 16 h. Após esse período, os tubos foram centrifugados (20.800 x g, 30 min, 4°C), os precipitados foram lavados com etanol 70% gelado, ressuspensos em água e quantificados por absorbância a 260 nm, utilizando aparelho NANOVue™ PLUS (GE). A radioatividade foi quantificada por cintilação líquida em um cintilador Beckman, modelo LS6500 e as sondas foram armazenadas a -20°C.

11.2. Preparo dos competidores específicos

Os competidores específicos (CE) foram preparados como descrito para as sondas radioativas, utilizando-se os mesmos pares de oligonucleotídeos para preparação de cada sonda, porém, sem marcação radioativa. A partir de dois pares de oligonucleotídeos simples fita (Tabela 3) foram preparados dois oligonucleotídeos de DNA dupla-fita, oligoFibC (27 pb), contendo o *motif* de ligação da proteína FibC de *A. nidulans* e oligoFLBC (30 pb), contendo o *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa*. Os oligonucleotídeos de DNA dupla-fita foram preparados por meio de desnaturação e renaturação gradativa dos oligonucleotídeos simples fita e checados por eletroforese em gel de poliacrilamida 15% não desnaturante, em tampão TBE 1x (0,89 M Tris HCl, 0,025 M EDTA, 0,89 M ácido bórico, pH 8,0). Após eletroforese, o gel foi corado com azul de metileno (100 mg/mL). Os competidores específicos e o oligonucleotídeo dupla-fita foram quantificados através de absorbância a 260 nm em aparelho NANOVue™ PLUS (GE).

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados.

Oligonucleotídeo	Sequência
oligoFibC-F	5'-TTGAACTGACT GACG AAACAGAGGGGA-3'
oligoFibC-R	'5'-TCCCCTCTGTT TCGT CAGTCAGTTCAA-3'
oligoFLBC-F	5'-AGCGACAGAG GTGCCG ATCCGATCGGTTCC-3'
oligoFLBC-R	5'-GGAACCGATC GGATCGGC ACCTCTGTCTCGCT-3'

11.3. Ensaio de ligação DNA-proteína

A fim de se verificar a menor quantidade da proteína recombinante a ser utilizada nos ensaios de DNA gel *shift*, foram realizadas reações com quantidades variadas de His::FLBC e GST::FLBC (1, 3, 5, 10 e 15 µg) em 1x tampão de ligação (25 mM HEPES-KOH, pH 7,9, 20 mM KCl, 10% v/v glicerol, 1 mM ditioneitol, 0,2 mM EDTA, 50 mM PMSF, 200 µg/mL benzamidina, 100 µg/mL antipaína, 100 µg/mL pepstatina A, 200 µg/mL NaF, 100 mM DTT) contendo 1 µg/µL de poli(dI-dC)•(dI-dC) como competidor inespecífico e adicionado de 1 µL

de sonda radioativa (10^3 a 10^4 cpm). As reações foram incubadas por 20 min à temperatura ambiente e aplicadas em gel de poliacrilamida 5% não desnaturante em tampão 0,5 x TBE, a 250 V, 10 mA, 10°C. Após a eletroforese, o gel foi seco e autoradiografado.

Para os ensaios de competição, um excesso molar do competidor específico (sonda não marcada) foi adicionado à reação de ligação, numa concentração de 10, 20 e 30x superior à sonda radioativa 20 min antes da adição desta. Após incubação com a sonda (20 min), as reações foram submetidas à eletroforese como descrito acima. Ensaios de competição específica, utilizando um excesso molar dos oligonucleotídeos dupla-fita oligoFLBC e oligoFibC numa concentração de 10 e 20x superior à sonda, também foram realizados.

12. Análise de bioinformática das proteínas estudadas

As sequências polinucleotídicas das ORFs que codificam as proteínas estudadas bem como suas sequências polipeptídicas foram obtidas no site do genoma do fungo (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>). A detecção e caracterização dos domínios presentes nas proteínas foram feitas 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>).

As sequências polipeptídicas foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando a ferramenta Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). 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).

As regiões promotoras dos genes estudados foram analisadas quanto à presença de sítios de ligação da proteína FbC/FLBC de *A. nidulans* e de *N. crassa*, respectivamente. A análise *in silico* foi realizada manualmente.

Resultados e Discussão

1. A proteína FLBC

A linhagem mutante na ORF NCU03043 corresponde à linhagem nocauteada no gene *flbC* (*flb* for *fluffy low brlA* expression) (COPPIN, 2002), a qual codifica para uma proteína anotada no banco de dados do fungo *N. crassa* como fator de transcrição FLBC contendo dois domínios repetidos de ligação ao DNA *zinc finger* do tipo C₂H₂, na porção C-terminal, do resíduo de aminoácido 328 ao 355 (Figura 5). O alinhamento de sequências mostrou que a proteína FLBC de *N. crassa* é conservada em fungos filamentosos (Figura 5) possuindo alta identidade com as proteínas FlbC de *A. nidulans* (51%), FlbC de *A. fumigatus* (63%) e com a proteína Fle1 do fungo *P. anserina* (68%). O resultado apresentado na figura mostra o domínio de ligação ao DNA *zinc finger* do tipo C₂H₂ na porção C-terminal conservado entre as diferentes proteínas. Foram identificados dois sinais de localização nuclear clássicos na proteína FLBC de *N. crassa* (312KKHK316, 360RRHK364), presentes também nas sequências polipeptídicas das outras proteínas, sugerindo que estas possam migrar para o núcleo, como descrito para a proteína FlbC de *A. nidulans*, a qual se localiza no núcleo após a indução da conidiação por exposição ao ar (KWON *et al.*, 2010).

Resultados previamente obtidos em nosso laboratório mostraram que o nocaute do gene *flbC* em *N. crassa* causa severas alterações fenotípicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento do fungo, entre eles a redução da capacidade de conidiação, apresentando poucos microconídios, hifas aéreas reduzidas, alteração da morfologia das hifas, apresentando um aumento de septação e produção acentuada do pigmento melanina (CORROCHER, 2012). Também mostrou que a linhagem mutante apresenta uma desregulação no metabolismo de glicogênio, apresentando níveis elevados de glicogênio antes e após o choque térmico e um alto nível do transcrito *gsn* após o choque térmico quando comparada à linhagem selvagem (GONÇALVES *et al.*, 2011, CORROCHER, 2012). No fungo *P. anserina*, a proteína Fle1 é requerida para a iniciação da diferenciação sexual. O nocaute do gene *fle1* aumentou a produção de órgãos femininos (protoperitécio) e a produção de microconídios, causando também alterações morfológicas das hifas, como ondulações e formação de hifas helicoidais (COPPIN, 2002). O fator de transcrição FlbC exerce papel regulatório no processo de ativação da conidiação em *A. nidulans*, através da ligação a sítios específicos presentes nos promotores dos genes *brlA*, *abaA* e *vosA* envolvidos no processo de conidiação. A Figura 6 mostra a cascata dos genes envolvidos na conidiação em *A. nidulans* (KWON *et al.*, 2010).

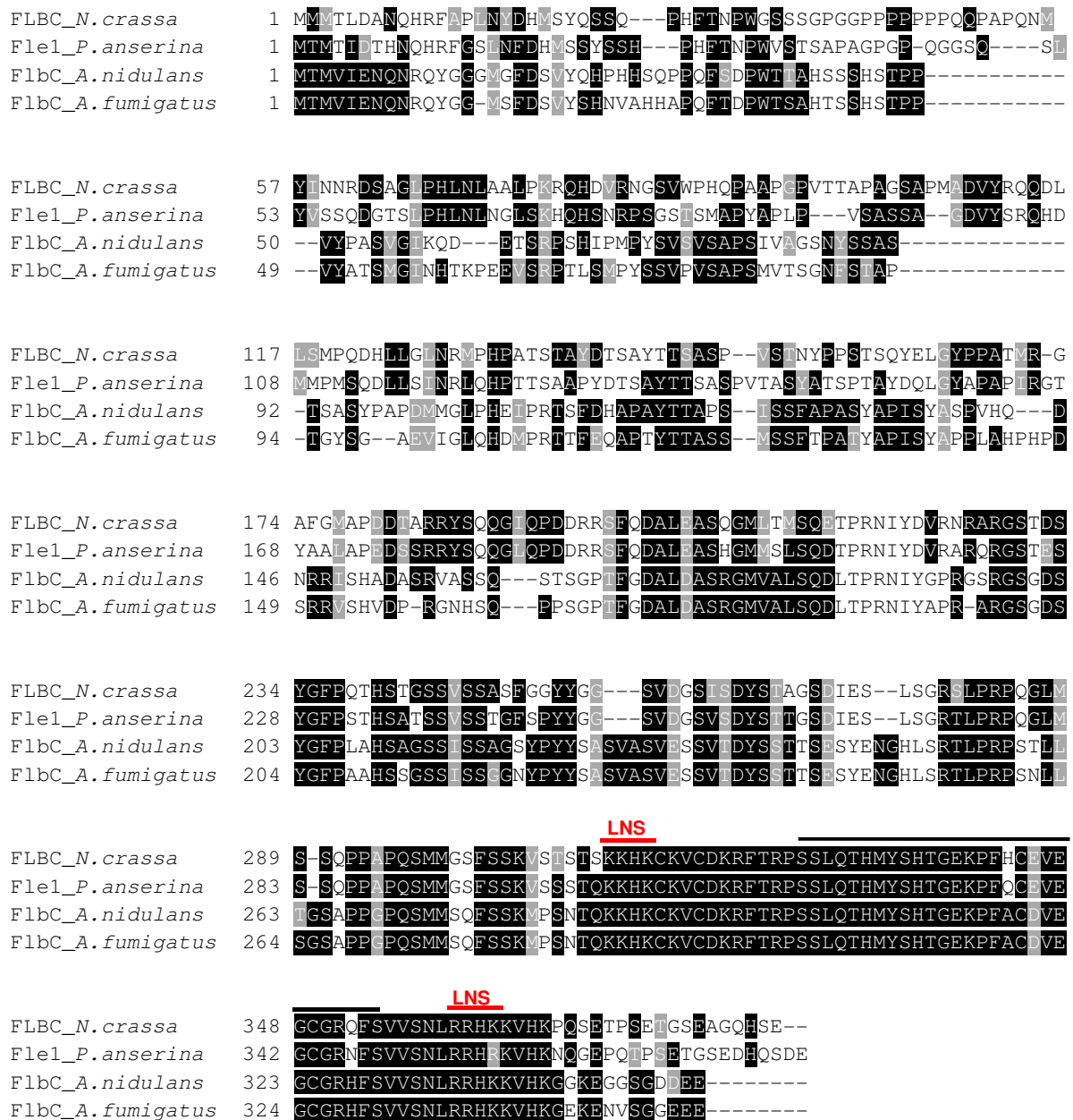


Figura 5- Alinhamento múltiplo das sequências polipeptídicas da proteína FLBC codificada pela ORF NCU03043 de *N. crassa* com as proteínas FlbC dos fungos *A. nidulans* (XP_660025.1), *A. fumigatus* (XP_755710.1) e Fle1 de *P. anserina* (XP_001907229.1). A barra preta indica o domínio C₂H₂ zinc finger presente na porção C-terminal. As barras vermelhas indicam os sinais de localização nuclear (LNS). Alinhamento múltiplo realizado por ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e os aminoácidos idênticos e conservados foram identificados por Boxshade. Os LNSs foram identificados pelo PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>).

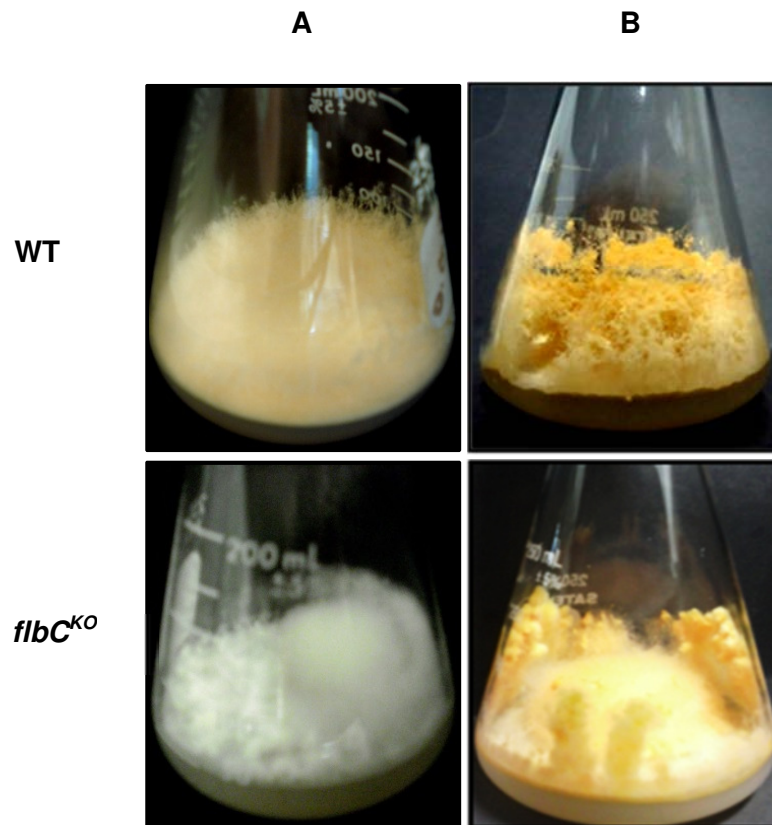


Figura 7– Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutante em meio sólido. Conídios foram inoculados no centro do meio de cultura. As linhagens foram mantidas inicialmente a 30 °C por 3 dias **(A)** e, posteriormente, à temperatura e luminosidade ambiente por mais 5 dias **(B)**.

2.2. Análise da extremidade das hifas

A análise da extremidade das hifas das linhagens selvagem e mutante foi realizada em placas de Petri contendo meio VM sólido, na qual conídios/pedaços de hifas das linhagens foram inoculados no centro das placas e incubados a 30 °C por 20 h. As imagens apresentadas na Figura 8 mostram uma alta ramificação na linhagem mutante e também a formação de aglomerados irregulares de hifas.

2.3. Análise da germinação de microconídios da linhagem *flbC*^{KO}

A linhagem mutante *flbC*^{KO} produz poucos microconídios e para efeito comparativo, foi necessária a indução da microconidiação na linhagem selvagem. A germinação dos microconídios das linhagens selvagem e mutante foi realizada em placas de petri contendo pequenos discos de meio VM sólido, onde microconídios das linhagens foram inoculados (10^5 células/mL) e então recobertos por uma lamínula. Após incubação a 30 °C, amostras foram removidas em diferentes tempos e as células foram tratadas com DAPI, para

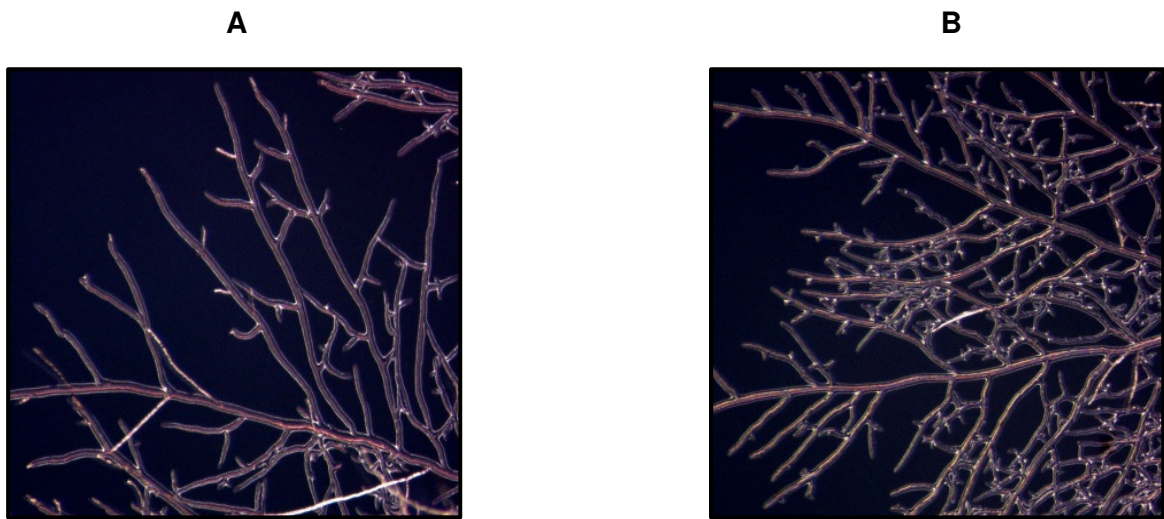


Figura 8— Análise da extremidade das hifas nas linhagens selvagem e mutante. Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM e as placas foram incubadas por 24 h a 30 °C. Fotos tiradas com estereomicroscópio trinocular SteREO Discovery.V8 (Zeiss) com aumento de 50x. **(A)** linhagem selvagem (FGSC#2489), **(B)** linhagem *flbC*^{KO}.

visualização dos núcleos e com calcofluor para a visualização da parede celular e septos. As imagens obtidas após tratamento das células com calcofluor (Figura 9) mostram que apenas após 24 h de crescimento foi possível observar a germinação dos microconídios das duas linhagens. A linhagem mutante apresentou um aumento na septação e ramificação das hifas, além de um inchaço destas e formação de estruturas globosas denominadas “*fluffy*”, as quais foram descritas para a linhagem mutante de *A. nidulans* nesta proteína (ADAMS *et al.*, 1992). Após 48 h de crescimento foi possível observar regiões de constricção citoplasmática nas hifas da linhagem mutante. Também foi possível observar a produção de conídios pela linhagem selvagem, a qual não ocorreu na linhagem mutante. A Figura 10 apresenta as imagens obtidas por microscopia de fluorescência das hifas das linhagens após tratamento com DAPI. Em 48 h, a linhagem mutante apresentou um discreto aumento do número de núcleos e um nível de organização alterado em relação ao observado na linhagem selvagem, sendo possível observar também o inchaço das hifas.

Os resultados de crescimento e morfologia mostram que a proteína FLBC de *N. crassa* desempenha importante papel no desenvolvimento do fungo e o nocaute do gene *flbC* implica na ausência de conidição e alteração na morfologia das hifas, resultados semelhantes aos descritos para os fungos *A. nidulans* (KWON *et al.*, 2010) e *P. anserina* (COPPIN, 2002).

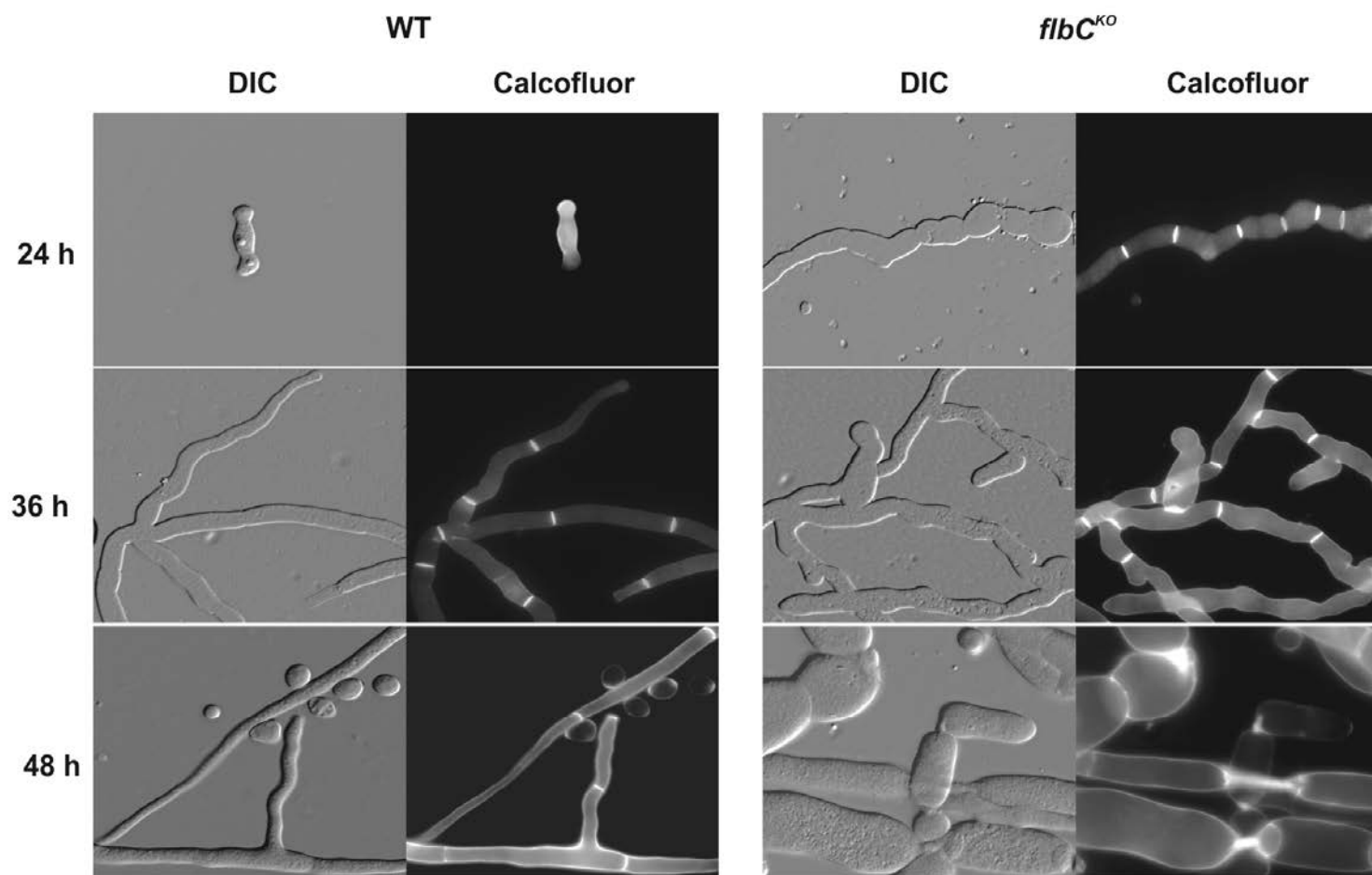


Figura 9– Análise morfológica durante a germinação de microconídios das linhagens selvagem e *flbC*^{KO}. Microconídios corados com solução 1 mg/mL de calcofluor. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 63x de aumento.

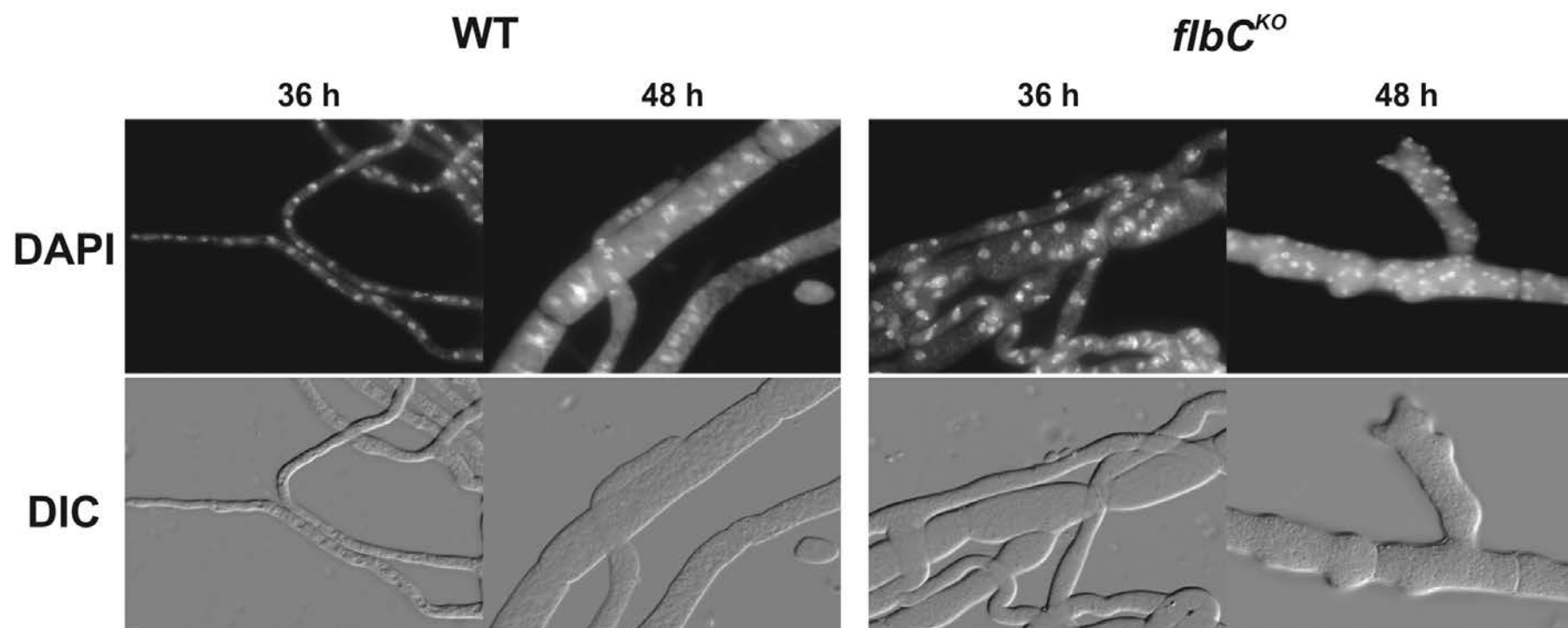


Figura 10- Análise morfológica durante a germinação de microconídios das linhagens selvagem e *flbC*^{KO}. Células foram fixadas com solução 3,7% (v/v) de formaldeído, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 0,2%(v/v) triton X-100 e coradas com solução 10 µg/mL de DAPI. Fotos tiradas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 63 x de aumento.

3. Análise do conteúdo de carboidratos de reserva na linhagem *flbC*^{KO}

As linhagens mutante e selvagem foram avaliadas quanto ao conteúdo de glicogênio e trealose durante o crescimento vegetativo do fungo, a fim de correlacionar o metabolismo de carboidratos com o desenvolvimento celular do fungo *N. crassa*. Para as análises, conídios/pedaços de hifas foram inoculados em frascos contendo meio VM líquido e as amostras retiradas a cada 12 h. A linhagem mutante apresentou um perfil de acúmulo de glicogênio diferente do observado na linhagem selvagem, apresentando níveis elevados do carboidrato durante todo o período de tempo analisado (Figura 11A). Além disso, não apresentou um pico de acúmulo ao redor de 48 h de crescimento, característico da linhagem selvagem. A quantificação do conteúdo de trealose também foi realizada e os resultados mostraram um perfil de acúmulo de trealose da linhagem mutante semelhante ao da linhagem selvagem, porém, apresentando níveis mais elevados do carboidrato (Figura 11B).

Os resultados obtidos sugerem que a proteína FLBC de *N. crassa* possa desempenhar um importante papel na regulação do metabolismo de carboidratos do fungo, através da regulação direta ou indireta dos genes responsáveis pela síntese e degradação dos carboidratos. Desse modo, ensaios de mobilidade em gel foram realizados para verificar a capacidade de ligação da proteína FLBC à região promotora dos genes envolvidos no metabolismo de glicogênio.

4. Produção e purificação da proteína FLBC recombinante

Como descrito em Materiais e Métodos, a proteína recombinante HIS::FLBC havia sido purificada anteriormente em nosso laboratório. Neste trabalho será descrita a produção e purificação da proteína recombinante GST::FLBC. A construção plasmidial (pGEX-*flbC*) para a produção da proteína já estava disponível no laboratório.

4.1. Análise da solubilidade

O ensaio de solubilidade da proteína recombinante foi realizado a partir de 6 clones carregando a construção pGEX-*flbC*. Para tal, as células foram induzidas e amostras foram coletadas antes (NI) e depois da indução. As células coletadas foram lisadas com PBS e centrifugadas para separação do sobrenadante (S) e precipitado (P). As amostras foram analisadas em gel SDS-PAGE. A Figura 12 mostra a banda correspondente à proteína recombinante GST::FLBC, com aproximadamente 66 kDa, indicada por setas. Os resultados obtidos revelaram que a proteína GST::FLBC foi produzida em maior quantidade no

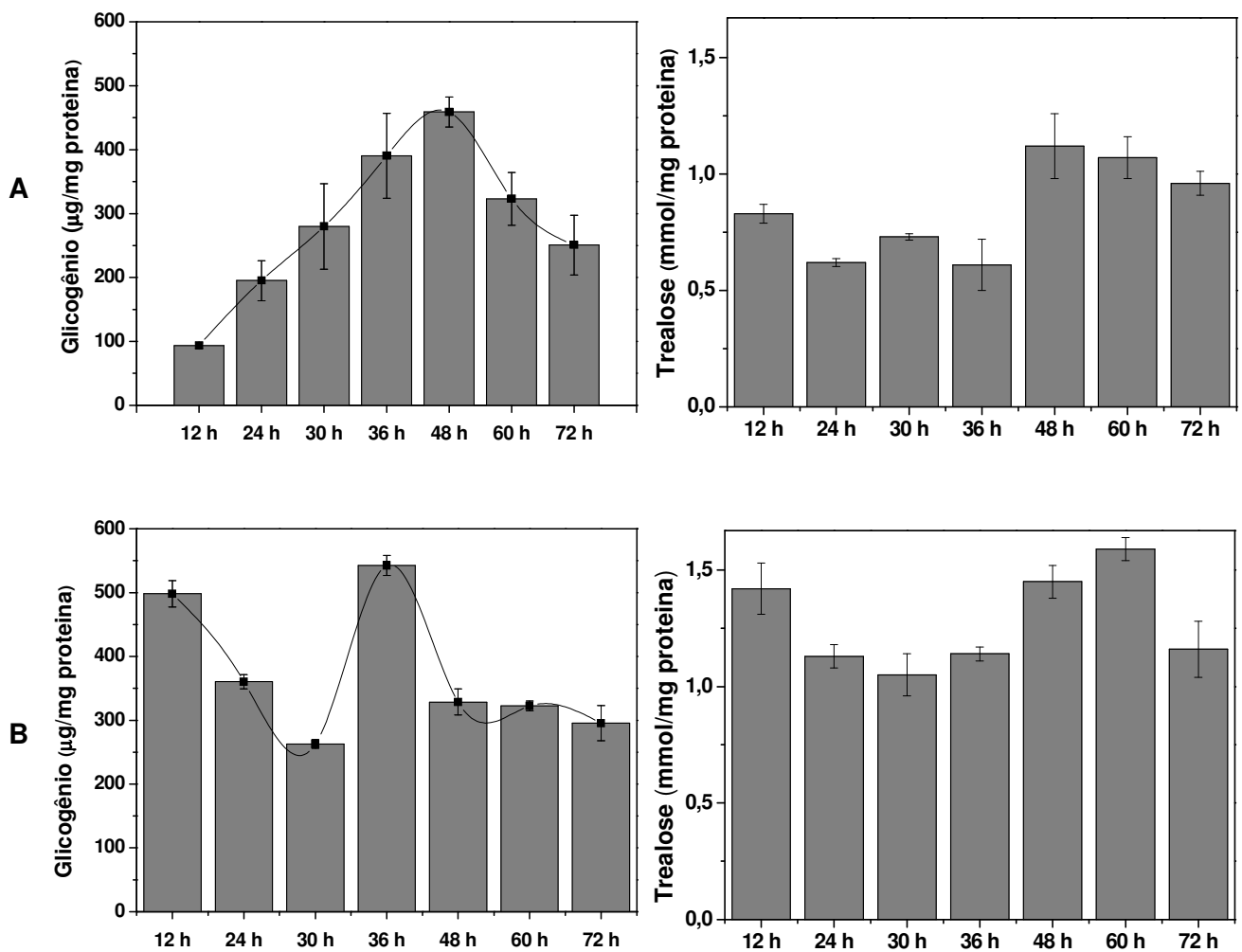


Figura 11- Quantificação do conteúdo de carboidratos de reserva nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO} durante o crescimento vegetativo. Conídios inoculados em meio VM líquido sob agitação constante a 30 °C. Amostras coletadas a cada 12 h. Análise do acúmulo de glicogênio (**A**) linhagem selvagem (**B**) linhagem *flbC*^{KO}.

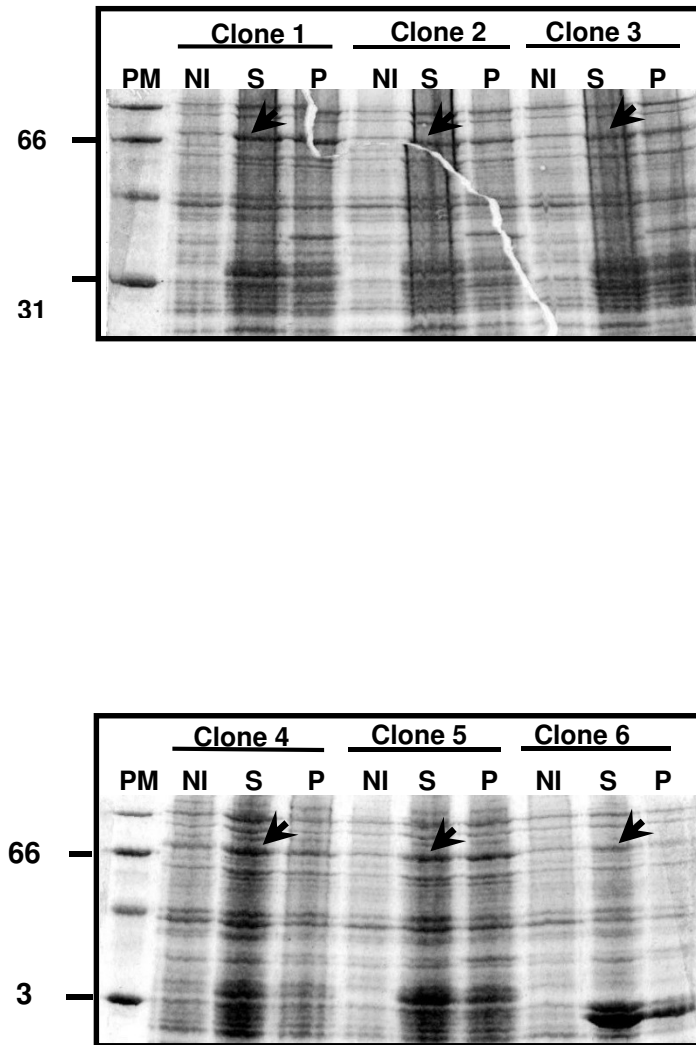


Figura 12- Análise da solubilidade da proteína GST::FLBC em clones de *E. coli* BL21. Células crescidas em meio 2YT a 37°C. Indução da proteína recombinante pela adição de 0,4 mM de IPTG. Células lisadas em sonicador SONICS, VibraCell. A seta indica a banda correspondente à proteína recombinante. Eletroforese SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. **PM**, Peso Molecular (kDa), **NI**, amostra não-induzida; **S**, sobrenadante; **P**, precipitado.

sobrenadante e que o clone 4 foi o melhor clone produtor da proteína, sendo então escolhido para a produção e purificação em maior escala.

4.2. Purificação da proteína recombinante

A proteína GST::FLBC foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna GSTrap no sistema de purificação Akta Prime. A Figura 13A mostra o perfil cromatográfico obtido durante a purificação da proteína recombinante. O cromatograma apresenta um pico após eluição com glutathione e as frações recolhidas (indicadas por setas) foram analisadas em SDS-PAGE (Figura 13B). O resultado mostrou que a proteína recombinante foi eluída em maior quantidade nas primeiras frações recolhidas após a eluição, porém foram observadas bandas de contaminação de aproximadamente 30 kDa. As frações recolhidas foram concentradas em Amicon, sendo que as frações 4 a 7 (F4) e 8 a 15 (F5) foram reunidas e então concentradas (Figura 13C). As frações F2, F3, F4 e F5 foram submetidas à análise por *Western blot* (Figura 13D) utilizando-se anticorpo anti-GST conjugado com peroxidase. Os resultados mostraram que as bandas de contaminação são provavelmente a proteína GST livre e produtos de degradação da proteína recombinante.

A proteína GST não fusionada também foi produzida e purificada para ser utilizada como controle negativo nos ensaios de ligação DNA-proteína. A proteína foi eluída com glutathione e as frações recolhidas foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 14A). As frações 1, 3, 4 e 5 (F1) foram reunidas e concentradas em Amicon, assim como a fração 2 (F2) (Figura 14B).

5. Ensaios de ligação DNA-proteína

A fim de elucidar o possível envolvimento do fator de transcrição FLBC de *N. crassa* na regulação do metabolismo de glicogênio, uma análise *in silico* da região promotora dos genes envolvidos na síntese e degradação de glicogênio foi realizada. As análises iniciais utilizando como referência o *motif* (Figura 15A) de ligação da proteína FlbC de *A. nidulans* (KWON *et al.*, 2010) mostraram a presença do *motif* apenas nos promotores dos genes responsáveis pela degradação do glicogênio *gdn* (codifica a enzima desramificadora do glicogênio) e *gpn* (codifica a enzima glicogênio fosforilase), sendo que neste último o *motif* está incompleto.

Mais recentemente, o provável *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* foi identificado pelo grupo de pesquisa do Dr. Larrondo (Universidade Pontifícia Católica do Chile) e por meio de uma colaboração foi disponibilizado para o nosso grupo. A sequência nucleotídica do mesmo está apresentada na Figura 15B. Através da análise comparativa

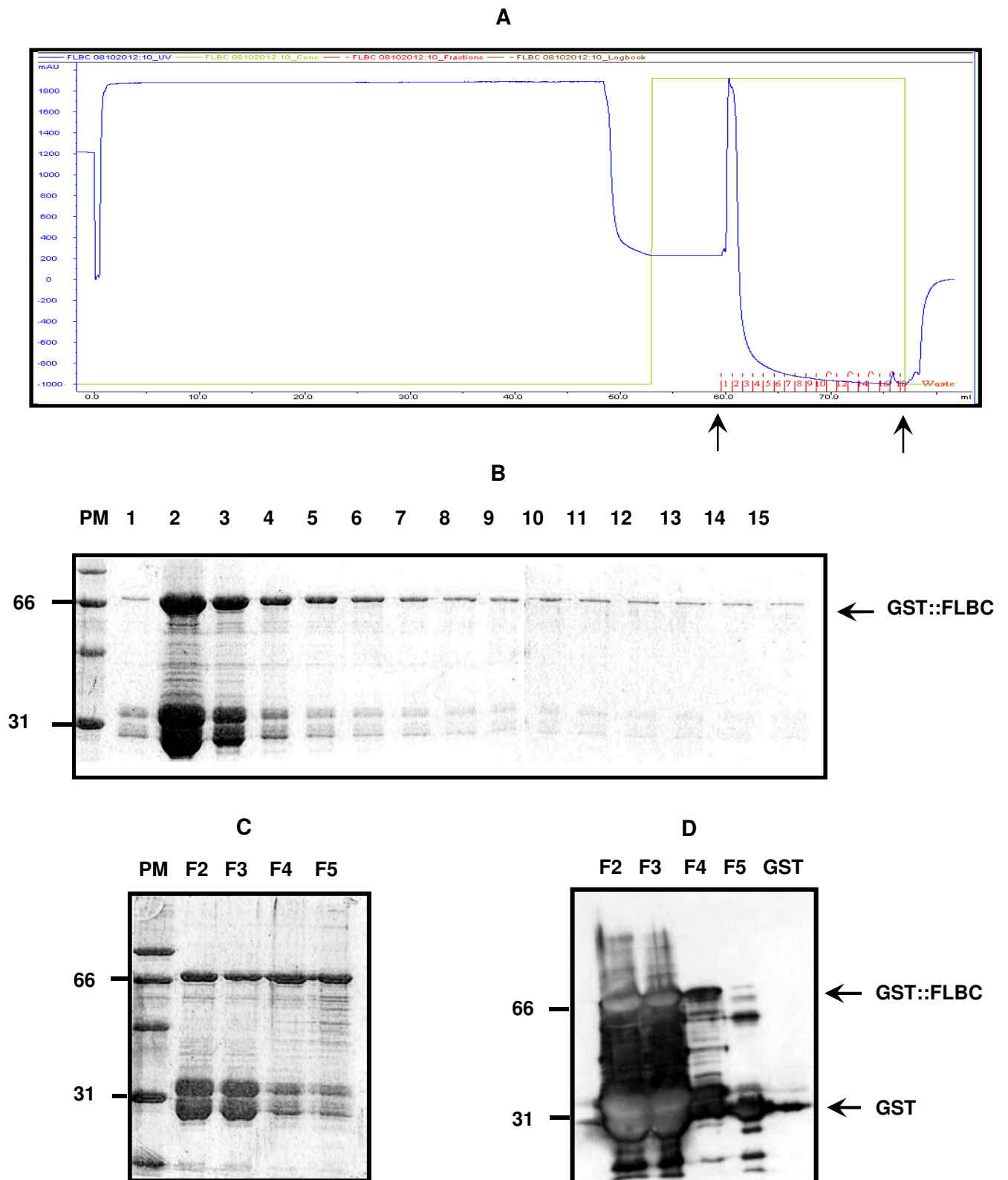


Figura 13- Purificação da proteína recombinante GST::FLBC. Células crescidas em meio 2YT a 37 °C. Produção da proteína recombinante induzida pela adição de 0,4 mM de IPTG. Células lisadas em sonicador SONICS, VibraCell. **(A)** Cromatograma das etapas de purificação em coluna GSTrap utilizando 10 mM de glutatona utilizando sistema de purificação Akta Prime. **(B)** Análise eletroforética das frações eluídas (1 a 15). **(C)** Análise eletroforética das frações concentradas em Amicon 30.000 MW da proteína recombinante (F2, fração 2; F3, fração 3; F4, frações 4 a 7; F5, frações 8 a 15). Eletroforese realizada em SDS-PAGE, gel corado com Comassie Brilliant Blue R-250. **(D)** Análise por *Western Blot* com anticorpo anti-GST. **PM**, Peso Molecular em kDa.

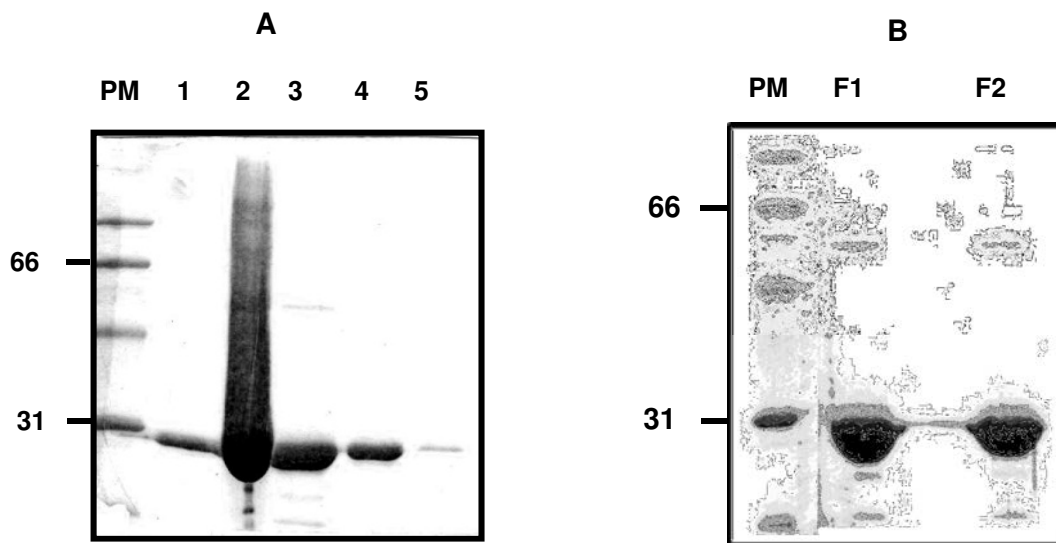


Figura 14- Purificação da proteína GST por cromatografia de afinidade utilizando coluna GSTrap em sistema de purificação Akta Prime. Frações eluídas em 10 mM de glutatona. **(A)** Análise eletroforética das frações eluídas (1 a 5). **(B)** Análise eletroforética das frações concentradas em Amicon 30.000 MW da proteína GST (F1, frações 1, 3, 4 e 5; F2, fração 2). **PM**, Peso Molecular em kDa. Eletroforese realizada em SDS-PAGE, gel corado com Comassie Brilliant Blue R-250.

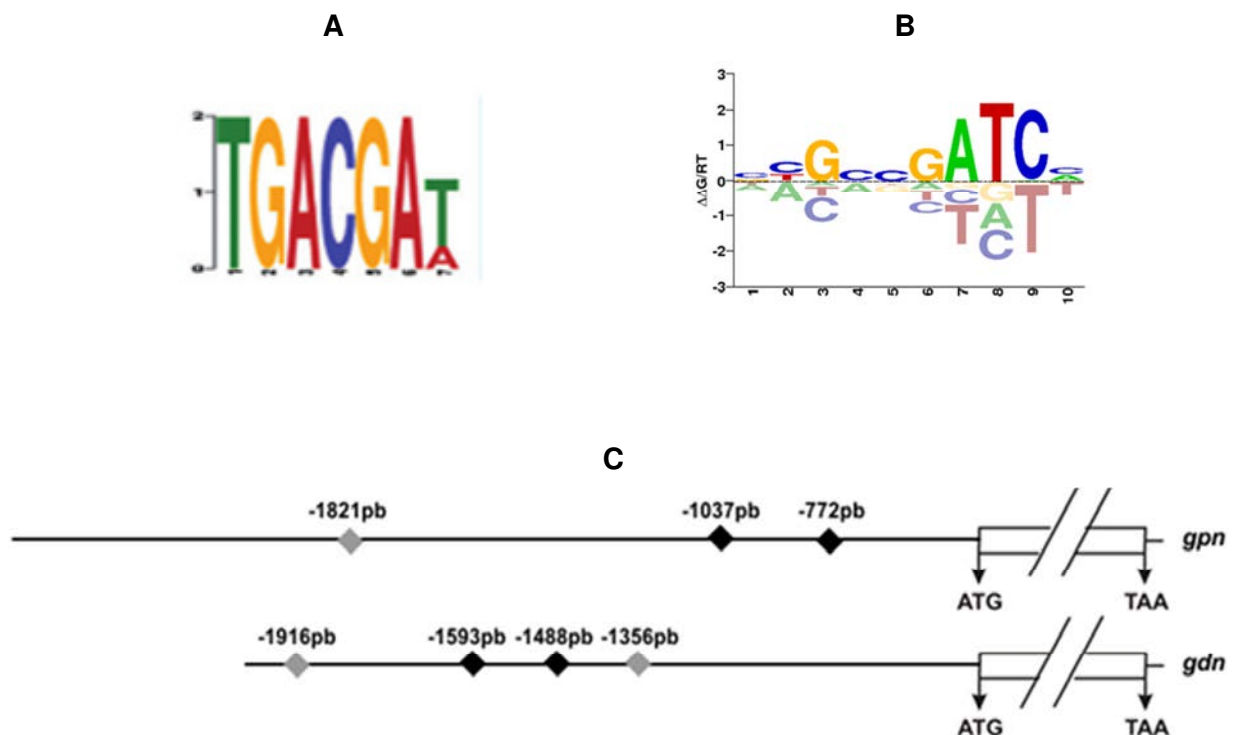


Figura 15- Domínio de ligação da proteína FlbC de *A. nidulans* (KWON *et al.*, 2010) **(A)** e da proteína FLBC de *N. crassa* **(B)**. **(C)** Análise da região promotora dos genes *gpn* e *gdn*. Os losangos cinza representam os *motifs* FLBC e os losangos pretos representam os *motifs* FlbC. Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNA contendo os *motifs* identificados são mostrados na Tabela 2.

entre os dois *motifs*, pode ser observado que o *motif* de *N. crassa*, além de apresentar uma sequência nucleotídica maior, difere do *motif* de ligação da proteína de *A. nidulans* em apenas um nucleotídeo no *core* da sequência, com a presença de uma citosina no lugar de uma adenina. Com base nessas informações, uma nova análise *in silico* da região promotora dos genes envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio foi realizada, confirmando a presença do *motif* de ligação FLBC na região promotora dos genes *gpn* e *gdn*. Entretanto, os dois *motifs* identificados na região promotora do gene *gdn* diferem em um nucleotídeo no *core* do *motif*, com a presença de uma adenina ao invés de uma citosina, e também nas vizinhanças do *motif*. A Figura 15C mostra o esquema da região promotora dos genes *gpn* e *gdn* e a localização dos *motifs* FlbC de *A. nidulans* e FLBC de *N. crassa* identificados.

A partir das informações obtidas, foram realizados ensaios de alteração de mobilidade em gel para verificar a capacidade de ligação da proteína a ambos os *motifs* encontrados na região promotora dos genes envolvidos na degradação do glicogênio.

5.1. Ensaio de DNA gel *shift* (EMSA)

As reações de mobilidade em gel foram realizadas para verificar a capacidade de ligação da proteína FLBC aos diferentes *motifs* encontrados na região promotora dos genes *gpn* e *gdn*. Para tal, reações contendo 10 µg das proteínas recombinantes His::FLBC e GST::FLBC foram analisadas. Entretanto, não foi observada a formação de complexos DNA-proteína em ambos *motifs* analisados ao utilizar a proteína His::FLBC. Assim, as demais análises foram realizadas utilizando a proteína recombinante GST::FLBC.

Inicialmente, reações com concentrações crescentes da proteína recombinante (1 a 15 µg) foram realizadas com os *motifs* FLBC de *N. crassa* e FlbC de *A. nidulans*, identificados na região promotora dos genes *gpn* e *gdn*. Foi observada a formação de um complexo DNA-proteína nas reações contendo o *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* e ausência de complexos nas reações utilizando as sondas contendo o *motif* FlbC de *A. nidulans* (resultados não mostrados). Os resultados indicaram que o *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* não é o mesmo para a proteína de *A. nidulans* e que a substituição de apenas um nucleotídeo (C/A) no *core* da sequência consenso possa ser responsável pela alta especificidade da ligação do fator de transcrição ao DNA.

Ensaio de competição específica foram realizados através da utilização de sondas contendo o *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* e incubação com a proteína recombinante durante 20 min e um excesso molar de 10, 20 e 30 x do competidor específico (sonda não marcada) em relação às sondas utilizadas. A Figura 16 apresenta o resultado desta análise e podemos observar que houve uma diminuição da intensidade do complexo

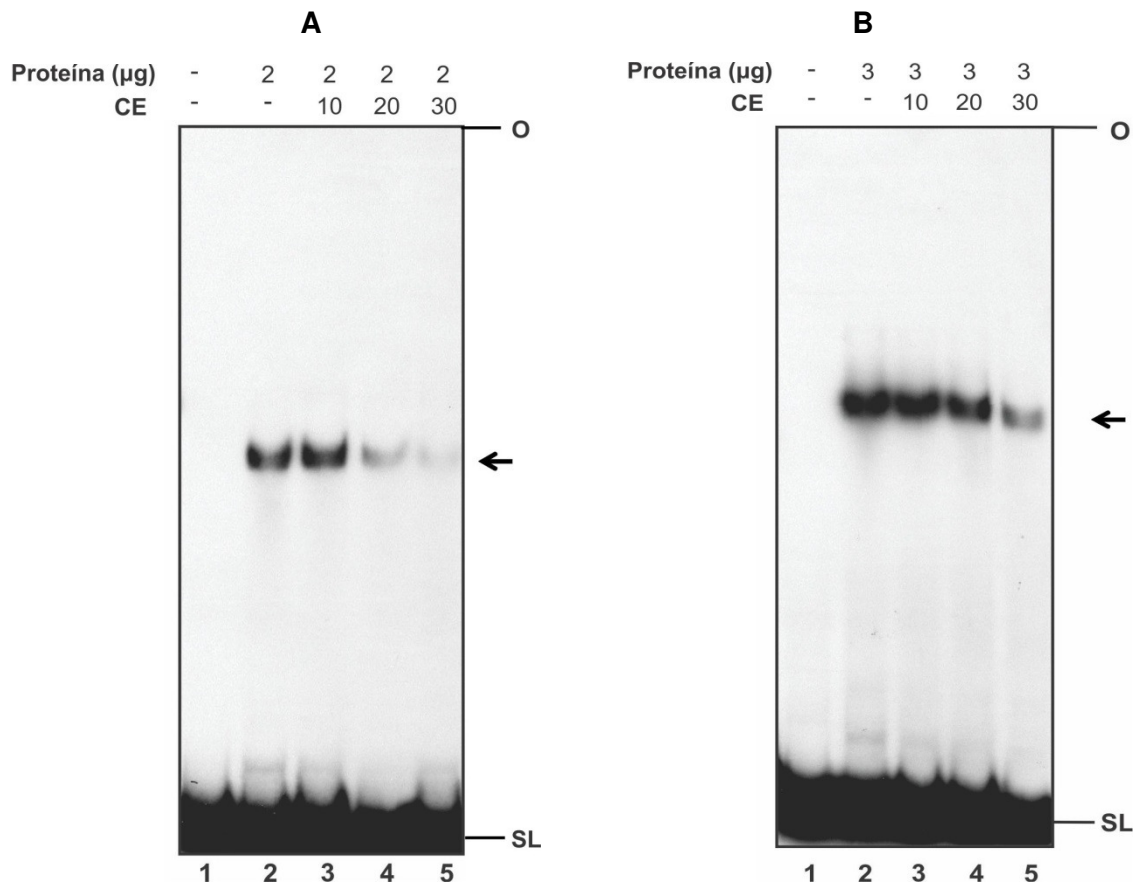


Figura 16- Ensaio de EMSA mostrando a ligação da proteína GST::FLBC ao *motif* FLBC de *N. crassa*. Diferentes concentrações de competidor específico (CE) foram testadas (10, 20 e 30 x de excesso molar à sonda), utilizando-se de 2,0 e 3,0 µg da proteína GST::FLBC. **(A)** Sonda *pgdn*. **(B)** Sonda *pgpn*. Os complexos DNA-proteína estão indicados pelas setas. **Canaleta 1**- sonda sem adição de proteína. **SL**- sonda livre. **O**- origem do gel. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, em tampão TBE 0,5 x.

formado com 20 e 30 x de excesso molar do competidor específico para as sondas *pgdn* e *pgpn*, respectivamente, indicando uma alta especificidade da interação DNA-proteína.

Para verificar a especificidade do sítio de ligação da proteína FLBC, oligonucleotídeos dupla-fita de DNA (oligoFLBC e oligoFibC) foram utilizados como competidores específicos nas reações de ligação com as sondas *pgpn* e *pgdn*. As Figuras 17 e 18 mostram o desaparecimento do complexo DNA-proteína quando um excesso molar do oligonucleotídeo oligoFLBC foi utilizado, enquanto que, houve uma diminuição da intensidade do complexo formado quando um excesso molar do oligonucleotídeo oligoFibC foi utilizado. Estes resultados indicaram que o sítio de reconhecimento da proteína FLBC de *N. crassa* é altamente específico. Adicionalmente, reações de ligação foram realizadas utilizando a sonda contendo o segundo *motif* de ligação da proteína FLBC, identificado na região promotora do gene *gdn*, o qual difere na sequência nucleotídica em relação às demais sondas no *core* do *motif* e em suas vizinhanças. A Figura 19 mostra o resultado

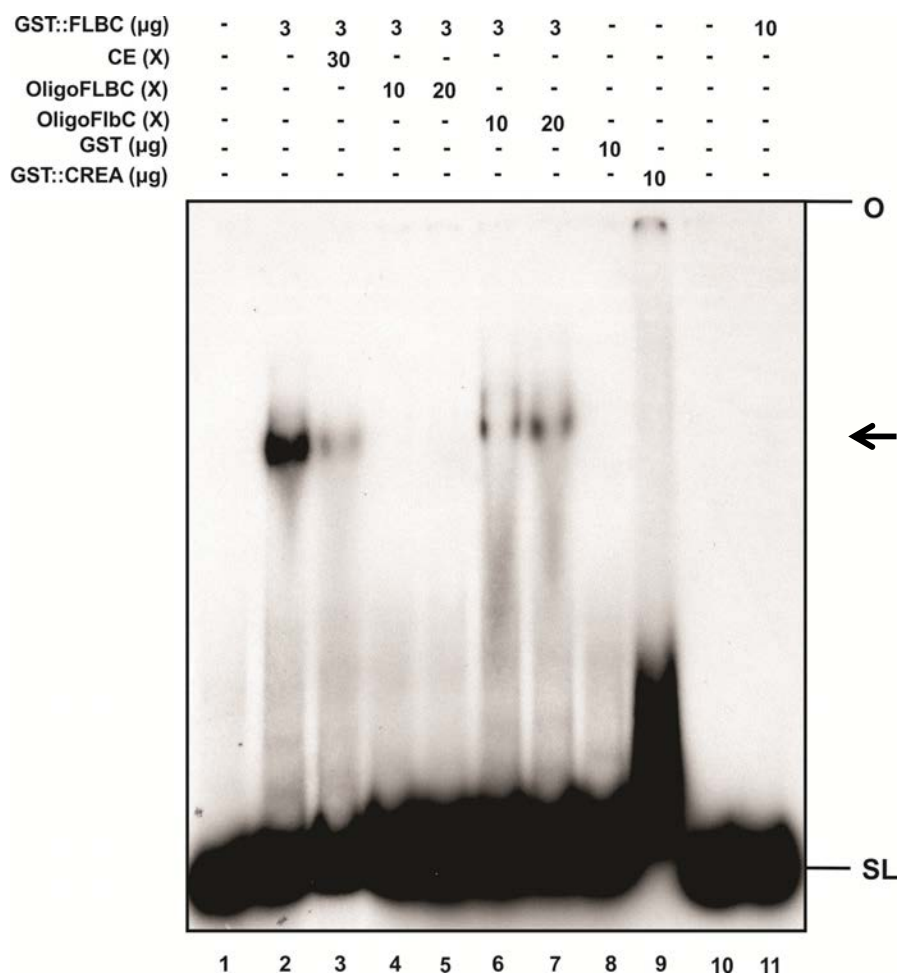


Figura 17- Ensaio de EMSA mostrando a ligação da proteína GST::FLBC ao *motif* de *N. crassa* presente na sonda *pgpn*. Diferentes concentrações dos oligoFlbC e oligoFLBC foram testadas (10 e 20 x de excesso molar à sonda), utilizando-se de 3,0 µg da proteína GST::FLBC. O complexo DNA-proteína é indicado pela seta. **Canaleta 1-** Sonda sem adição de proteína. **Canaleta 10-** Sonda inespecífica (sem sítio de ligação para proteína FLBC) sem adição de proteína. **SL-**Sonda livre. **O-** Origem do gel. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, em tampão TBE 0,5 x.

desta análise e foi possível observar uma diminuição acentuada da intensidade do complexo formado quando um excesso molar do oligonucleotídeo oligoFLBC foi adicionado à reação de ligação. Entretanto, não foi observada nenhuma alteração na intensidade do complexo DNA-proteína formado ao utilizar o oligonucleotídeo oligoFlbC, indicando novamente se tratar de um sítio de reconhecimento da proteína FLBC de *N. crassa* altamente específico. Como controles negativos das reações foram utilizados as proteínas GST, GST::CREA (Figura 17, canaleta 9) e His::PACC (Figura 18, canaleta 10) e uma sonda marcada radioativamente, a qual não possui sítios de ligação para as proteínas de *N. crassa* ou *A. nidulans* (sonda *pdeb*). Foi observado um retardo na migração quando a proteína

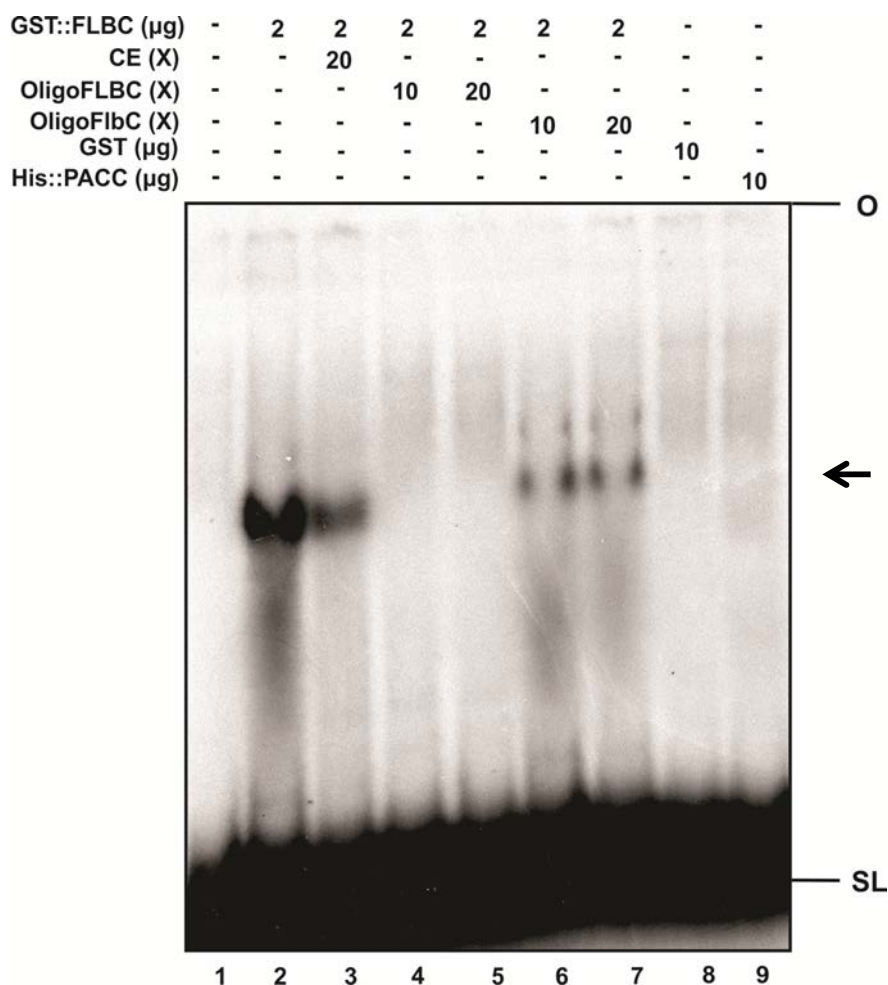


Figura 18- Ensaio de EMSA mostrando a ligação da proteína GST::FLBC ao *motif* de *N. crassa* presente na sonda *pgdn*. Diferentes concentrações dos oligoFlbC e oligoFLBC foram testadas (10 e 20 x de excesso molar à sonda), utilizando-se de 2,0 µg da proteína GST::FLBC. O complexo DNA-proteína é indicado pela seta. **Canaleta 1-** Sonda sem adição de proteína. **SL-**Sonda livre. **O-** Origem do gel. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, em tampão TBE 0,5 x.

GST::CREA foi usada (Figura 17, canaleta 9), devido à presença de uma parte do *motif* do fator de transcrição CREA na extremidade da sonda, o qual pode ter sido suficiente para a interação com a proteína CREA.

Os resultados obtidos sugeriram que não somente a sequência nucleotídica do *core* do *motif* é importante para a especificidade de interação da proteína FLBC de *N. crassa*, mas também as vizinhanças do *core*. A troca de uma adenina, presente no *motif* de *A. nidulans*, por uma citosina, presente no *motif* para *N. crassa*, pode ser suficiente para impedir o reconhecimento do fator de transcrição FLBC de *N. crassa* à região promotora dos genes *gpn* e *gdn* onde foram identificados *motifs* para a ligação da proteína FlbC de *A. nidulans* (resultados não apresentados). Em contrapartida, quando o oligonucleotídeo oligoFlbC foi utilizado em ensaios de competição, ele foi capaz de se ligar inespecificamente

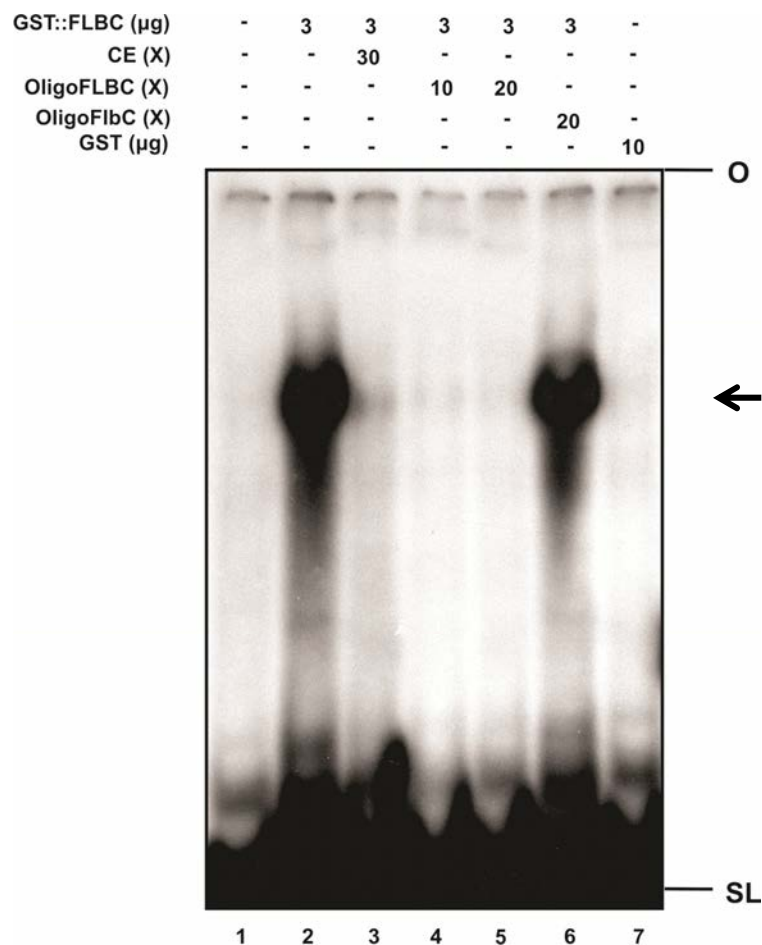


Figura 19- Ensaio de EMSA mostrando a ligação da proteína GST::FLBC ao segundo *motif* de *N. crassa* presente na sonda *pgdn*. Diferentes concentrações dos oligoFlbC e oligoFLBC foram testadas (10 e 20 x de excesso molar à sonda), utilizando-se de 3,0 µg da proteína GST::FLBC. O complexo DNA-proteína é indicado pela seta. **Canaleta 1-** Sonda sem adição de proteína. **SL-**Sonda livre. **O-** Origem do gel. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, em tampão TBE 0,5 x.

à proteína FLBC de *N. crassa*, sugerindo que a vizinhança do *core* do *motif* influencia na ligação com a proteína.

6. Análises de expressão gênica

Baseado nos resultados de ligação DNA-proteína e considerando que os promotores dos genes *gpn* e *gdn* mostraram ligação *in vitro* à proteína FLBC, as análises de expressão gênica foram realizadas apenas para estes dois genes. A análise da expressão do gene *flbC* e dos dois genes foi realizada durante o crescimento vegetativo e após a indução do desenvolvimento assexual do fungo *N. crassa* pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

6.1. Análise da expressão do gene *flbC*

As análises durante o crescimento vegetativo foram realizadas em amostras de micélio coletadas em diferentes tempos do crescimento em meio líquido. Os resultados obtidos mostraram a presença do transcrito a partir de 12 h de crescimento vegetativo e um aumento na expressão em 60 h de crescimento (Figura 20A). A indução do desenvolvimento assexual foi realizada através da exposição à luz de amostras miceliais obtidas após 20 h de crescimento em meio líquido. As amostras foram colocadas na superfície de meio VM sólido sobre uma membrana de celofane e expostos à luz em diferentes tempos (GREENWALD, 2010). O RNA total foi extraído das amostras de micélio e submetido à análise da expressão gênica. Os resultados apresentados na Figura 20B mostram que o transcrito *flbC* foi detectado após 4 h e atingiu uma expressão máxima em 48 h. Os resultados são semelhantes ao descrito por Kwon *et al.* (2010) em *A. nidulans*, o qual mostrou que o transcrito do gene *flbC* foi detectado após 6 h, mantendo níveis elevados até 24 h após a indução do desenvolvimento assexual.

6.2. Análise da expressão dos genes *gpn* e *gdn*

A análise da expressão dos genes envolvidos no processo de degradação do glicogênio foi realizada nas linhagens selvagem e mutante *flbC^{KO}* durante o crescimento vegetativo. Os resultados mostraram que o transcrito *gpn* foi detectável a partir de 12 h em ambas as linhagens e que a expressão máxima foi observada em 24 h na linhagem selvagem e em 48 h na linhagem mutante (Figura 21A). O transcrito *gdn* foi detectável em 12 h e mostrou expressão máxima em 24 h na linhagem selvagem, enquanto que a linhagem mutante apresentou baixos níveis até 48 h, apresentando expressão máxima em 60 h (Figura 21B).

Os resultados obtidos nas análises do conteúdo de glicogênio mostraram que os níveis de acúmulo do carboidrato na linhagem mutante permaneceram elevados durante todo o período de tempo analisado. Com base nos dados obtidos e analisando a expressão dos genes *gpn* e *gdn*, os quais mostraram ligação *in vitro* à proteína FLBC, foi possível concluir que a ausência de FLBC causa uma desregulação na expressão dos genes envolvidos no processo de degradação do glicogênio, onde FLBC atua como um repressor do gene *gpn*, e sua ausência ocasiona uma ativação da expressão do gene *gpn* (Figura 21A). Adicionalmente, o fator de transcrição FLBC atua como um regulador positivo do gene *gdn*, o qual mostrou uma expressão tardia no mutante *flbC^{KO}* em relação à linhagem selvagem (Figura 21B).

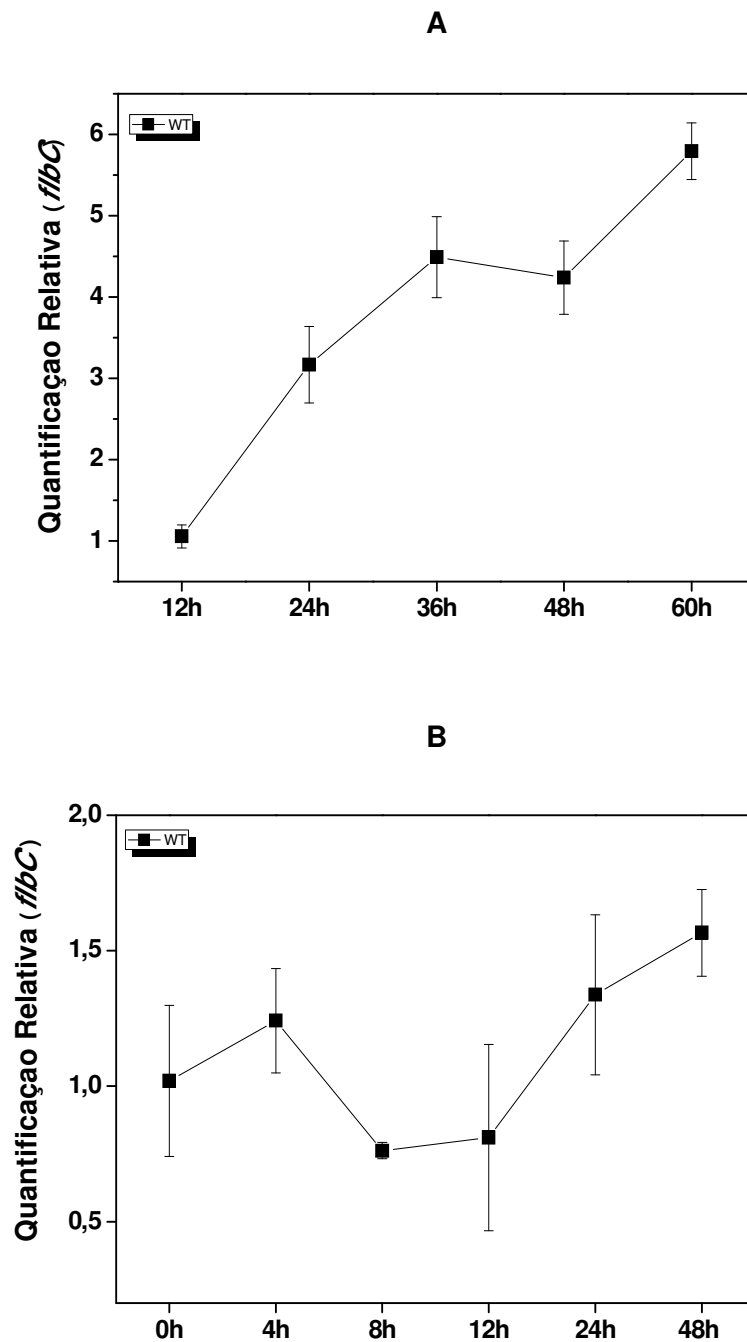


Figura 20– Análise da expressão do gene *flbC* na linhagem selvagem por qPCR. **(A)** Expressão do gene *flbC* durante o crescimento vegetativo. Conídios inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação a 30°C. Amostras foram coletadas a cada 12 h. Os valores apresentados foram normalizados em relação ao tempo de 12 h. **(B)** Expressão do gene *flbC* após indução do desenvolvimento assexual. Amostras miceliais expostas à luz e temperatura ambiente em diferentes tempos, após crescimento de 20 h em meio VM líquido. Extração de RNA das amostras realizada como descrito por SOKOLOVSKY *et al.* (1990). Síntese de cDNA realizada por RT-PCR. Os valores apresentados foram normalizados em relação ao tempo de 0 h.

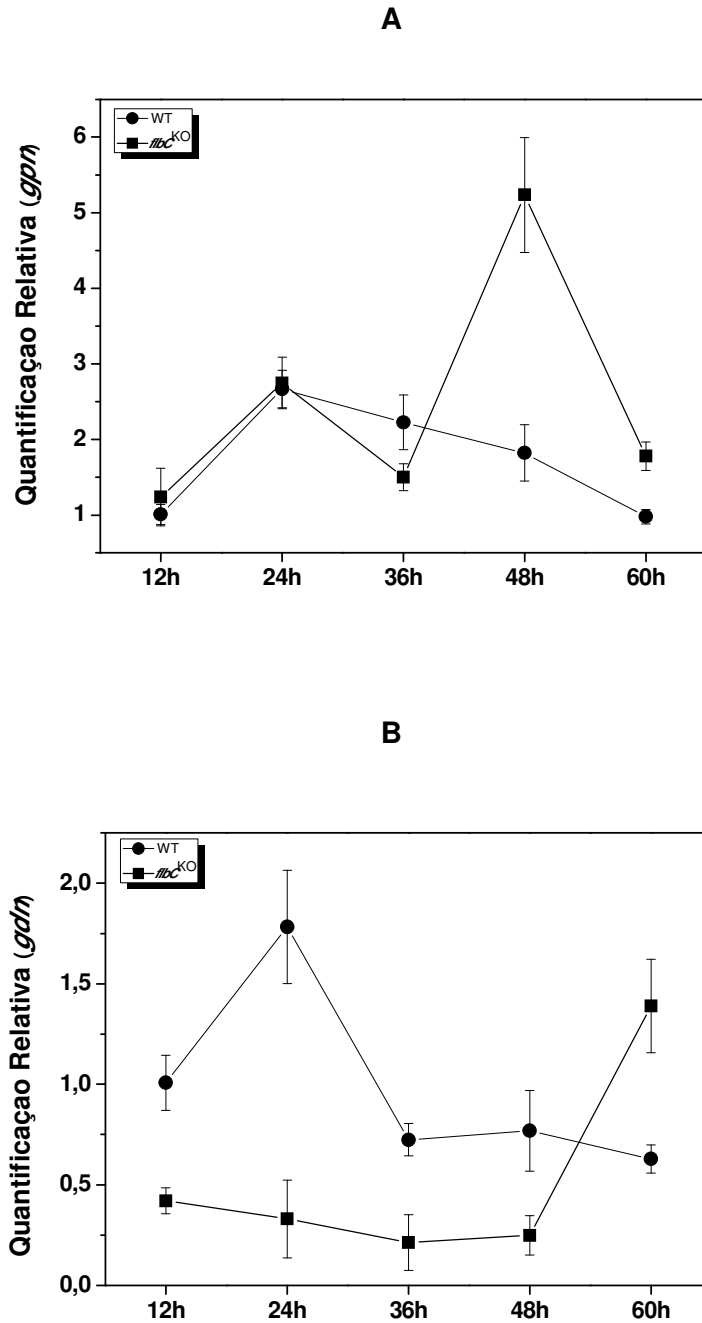


Figura 21– Análise da expressão dos genes do metabolismo de glicogênio nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO} durante o crescimento vegetativo. Conídios inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação constante a 30°C. Amostras coletadas a cada 12 h. Extração de RNA das amostras realizada como descrito por SOKOLOVSKY *et al.* (1990). Síntese de cDNA realizada por RT-PCR. **(A)** Expressão do gene *gpn*. **(B)** Expressão do gene *gdn*. Os valores apresentados foram normalizados em relação ao tempo de 12 h.

7. Participação do fator de transcrição FLBC no desenvolvimento no fungo *N. crassa*

Como mostrado anteriormente, a deleção do gene *flbC* no fungo *N. crassa* causa severas alterações fenotípicas relacionadas ao desenvolvimento do fungo, tais como redução de hifas aéreas, reduzida capacidade de conidiação, apresentando apenas microconídios, aumento do número de septos e desorganização dos núcleos nas hifas. Em *A. nidulans*, a proteína FlbC, caracterizada por Kwon *et al.* (2010), desempenha importante papel no desenvolvimento do fungo, atuando na regulação dos genes centrais da cascata de conidiação, se ligando fisicamente à região promotora dos genes *brlA*, *abaA* e *vosA*, mas não em *wetA* (Figura 6). A ausência do gene *flbC* causa um atraso na conidiação e na germinação dos conídios além de uma redução da expressão dos genes *brlA* e *vosA*.

Utilizando as sequências polipeptídicas das proteínas BrlA, AbaA, WetA e VosA de *A. nidulans* como *query* uma análise por Blast foi realizada para verificar a existência de genes homólogos no genoma de *N. crassa*. Foram encontrados genes ortólogos somente para os genes *vosA*, *wetA* e *abaA*, mas não *brlA* (Figura 22), sugerindo que a cascata de conidiação regulada por FlbC em *A. nidulans* seja diferente em *N. crassa* (KWON *et al.*, 2010).

A proteína VOSA, codificada pela ORF NCU05964 e anotada no banco de dados do fungo como “regulador do desenvolvimento VOSA”, possui um domínio *velvet* na porção N-terminal, do resíduo de aminoácido 13 ao 189 (Figura 23). Este domínio está presente nas proteínas da família *velvet* VeA, VelB, VosA e VelC, as quais formam o complexo *velvet* de proteínas, que conecta o metabolismo secundário com processos de desenvolvimento, tanto assexual como sexual. Os componentes deste complexo são encontrados em todos os fungos filamentosos e regulam vias importantes em fungos patógenos de plantas e de humanos (BAYRAM, BRAUS, 2012). O domínio *velvet* compreende aproximadamente 150 resíduos de aminoácidos com vários resíduos de prolina no meio do *motif*, o qual corresponde a um provável domínio de ligação a DNA, definindo uma nova classe de fatores de transcrição específicos de fungos (NI, YU, 2007). Algumas proteínas *velvet* interagem com outras da mesma família, o que pode sugerir que este domínio também representa um domínio de interação proteína-proteína. Em *A. nidulans*, o complexo VosA-VelB atua como um repressor da diferenciação assexual durante o crescimento vegetativo em cultura líquida submersa ou durante o desenvolvimento do fungo na ausência de luz (BAYRAM, BRAUS, 2012). Em *N. crassa*, Smith *et al.* (2010) demonstrou que *vosA* é regulado por luz, através de regulação direta pelo complexo WCC. O alinhamento de sequências mostrou que a proteína VOSA de *N. crassa* é conservada em fungos filamentosos (Figura 23) e possui 44% de identidade com a proteína VosA de *A. nidulans*, 46% com a proteína de *A. fumigatus* e 52% com a proteína de *Magnaporthe oryzae*. O resultado mostrou a presença do domínio

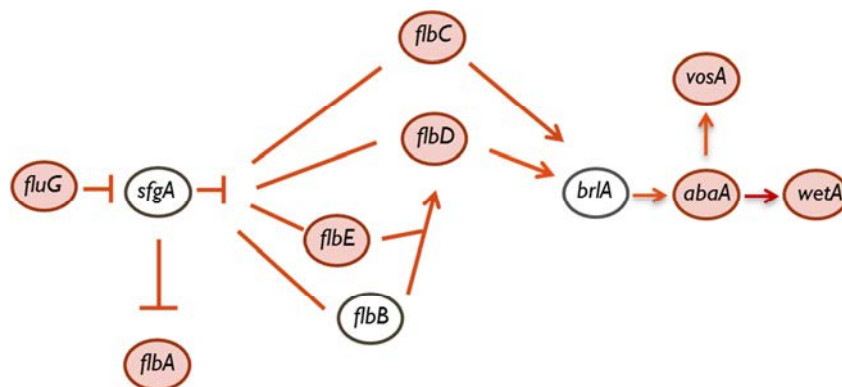


Figura 22- Identificação de genes ortólogos aos genes envolvidos na cascata de conidiação de *A. nidulans* no genoma de *N. crassa*. Em branco estão representados os genes não identificados em *N. crassa*.

Velvet na porção N-terminal da proteína conservado entre as diferentes proteínas. Foi identificado um sinal de localização nuclear clássico nas proteínas de *N. crassa* (368KRPR371), de *A. nidulans* (341PVKRQRT347) e de *A. fumigatus* (239PVKRQRT245), indicando que a proteína VosA/VOSA possa migrar para o núcleo. Em *A. nidulans*, VosA foi detectada no núcleo de conídios maduros formando um complexo heterodimérico com VelB (NI, YU, 2007). O complexo VosA-VelB atua na repressão da formação de esporos assexuais e controla a expressão de genes associados com a biogênese de trealose (BAYRAM *et al.*, 2010). Além disso, VosA foi descrita atuar como fator de transcrição, pois possui um domínio de ativação transcricional na porção C-terminal e pode se ligar à região promotora de genes envolvidos no processo de conidiação (NI, YU, 2007).

A proteína codificada pela ORF NCU01033, anotada como hipotética, e denominada aqui como *WetA-like*, apresenta um domínio *coiled-coil*, na região C-terminal, na sequência correspondente aos resíduos de aminoácidos 879 ao 907 (Figura 24), o qual também está presente nas proteínas de *A. nidulans*. Este domínio consiste de um feixe de duas ou mais α -hélices anfipáticas, empacotado de modo a formar uma superhélice (LUPAS, 1996), apresentando um padrão de repetição de sete resíduos de aminoácidos (padrão abcdefg), com a ocorrência de resíduos apolares preferencialmente na primeira (a) e quarta (d) posição de cada repetição. Proteínas contendo *motifs* do tipo *coiled-coil* desempenham diferentes funções de acordo com a sequência de aminoácidos que compõem o *core* do domínio (BURKHARD *et al.*, 2001).

A figura mostra o resultado do alinhamento de sequências da proteína codificada pela ORF NCU01033 (*WetA-like*) e proteínas ortólogas nos fungos *A. nidulans*, *A. fumigatus*, *Sordaria macrospora* e *M. oryzae*. O resultado mostrou que as proteínas de *N. crassa*, *M. oryzae* (58% de identidade) e *S. macrospora* (76% de identidade) possuem uma sequência

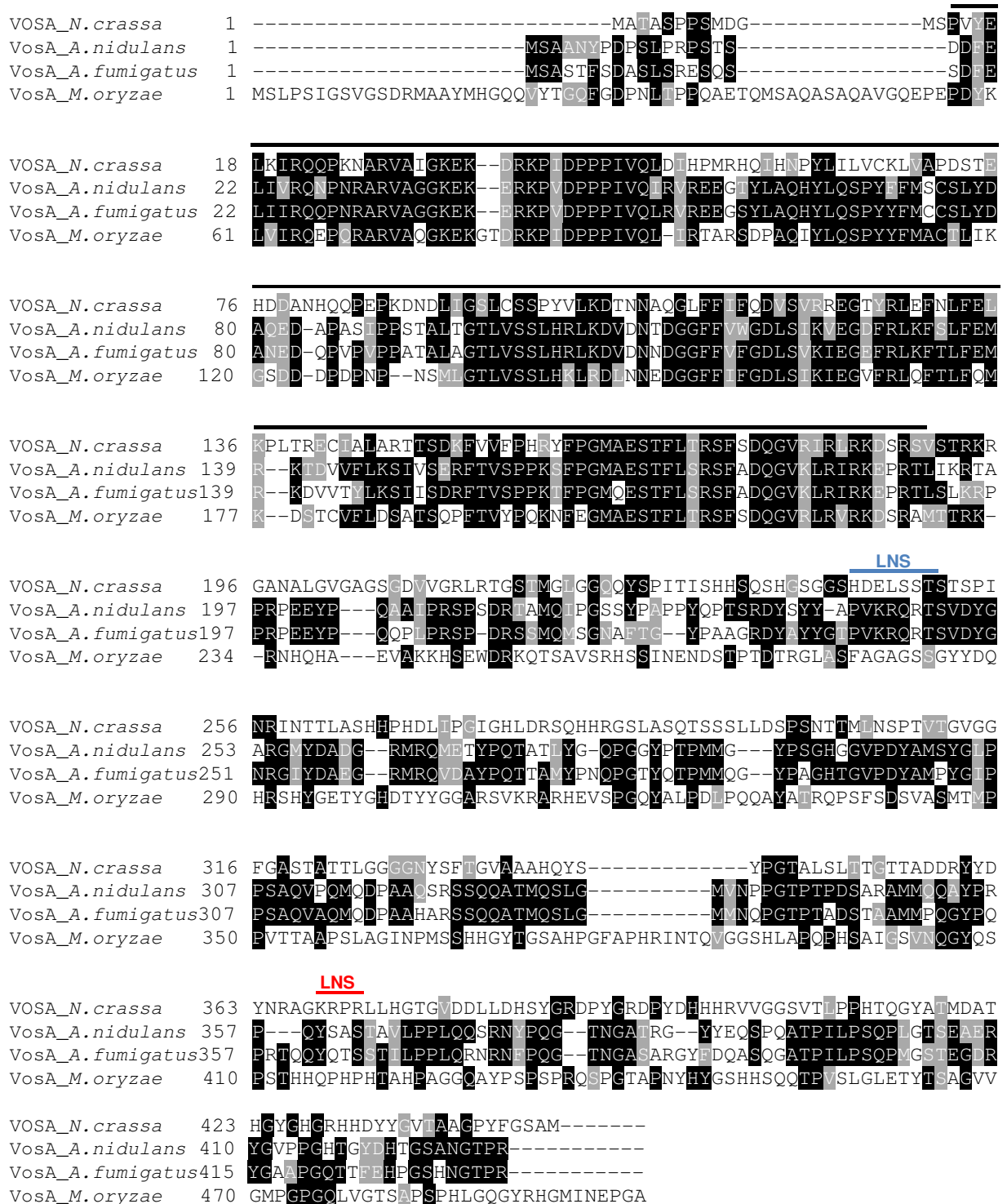


Figura 23- Alinhamento múltiplo das sequências polipeptídicas da proteína VOSA codificada pela ORF NCU05964 de *N. crassa* com as proteínas VosA dos fungos *A. nidulans* (ABI51618.1), *A. fumigatus* (ABQ18268.1) e *Magnaporthe oryzae* (XP_003718410.1). A barra preta indica o domínio velvet presente na porção N-terminal da sequência. A barra vermelha indica o sinal de localização nuclear da proteína VOSA de *N. crassa* (LNS). A barra em azul indica o sinal de localização nuclear (LNS) da proteína VosA de *A. nidulans* e *A. fumigatus*. Alinhamento múltiplo realizado por ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e os aminoácidos idênticos e conservados foram identificados por Boxshade. Os LNSs foram identificados pelo PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>).

NCU01033	1	MASVQGMSFAVGDLPLIGENKGGDNAFCWQDAVTDDVCSADFFDQFVVLDDHGFDPHSPSP
WETA_S.macrospora	1	MATVLGMSYTVGDLPLIGENKGVDSAFCWQDCAADDAGSADFFDQFVVLDDHGFDPHSPSP
Weta_A.nidulans	1	-----MEAHFPDHSFNDFLNQYVNMDSSTDANKDVS
Weta_A.fumigatus	1	-----MFAQPFDAFNDLFSQYVVDVSSMVDGNKDVS
MGG07020_M.oryzae	1	-----MNMGQGSDSAYYWTPMNNIGGFLTSEDLLDMDSCNLNDGNMSTTDSM
NCU01033	61	FTGEEGG-AEGGGNGRFFENMCREAHESLSPLTSLSCPFFDHHRSAEQSLSTGHDHGRAS
WETA_S.macrospora	61	FTDEEGGAEGGGNESFESMCREALESSLSPLTSLRCPPLDHHPSAEQSLGVGDHHRAN
Weta_A.nidulans	33	FP-----SEFDQLEPLLSFSTDCGDQSPVISTVQHNSQPAQDWGKDLWSLSQNTGCS
Weta_A.fumigatus	33	IP-----SDFDQIESLDSLSSDCGDHSPVPPTKPTHQS-PQPWATDLWSLPQDAASS
MGG07020_M.oryzae	48	STDGVEHCNMFSIDPNDELEIKKEHSPAESFLPGDQGTDAVYASAAGEELDFRSHHHQOQ
NCU01033	120	SAANNSASGRLARFSSASFPLQHRQVRAGSHVDPNSNMDQCYS--QQHQLLGAGQRELSSI
WETA_S.macrospora	121	ATANNPASGRLGRFSSAKFPPLHRQVRAGSHVDLSNMDQCYSQQQQHQLLVAGQRELNSI
Weta_A.nidulans	85	TNQDSFSFQDSTQPSIALDLSIGLEADATGHSQASVPRST-----
Weta_A.fumigatus	84	ASQCSFTFQDTHVHPSAVSLSFHLEAPPTSHVPVAVTCKASS-----
MGG07020_M.oryzae	108	QPHLDHHSIESLDGTHHHEQQOQLRSLSPSSSF DANHAGSNS-----
NCU01033	178	LGTSYQ-EGPGSGGSISDSELRLREGLTVNGSSSPRIHLPPSSASVPPSPHLQPGSASTS
WETA_S.macrospora	181	LGTGYNQEGPGSGGSISDSKLLRLEGLTVNGSGSPRIHFLPSSASVPPSPHLQPGSASTS
Weta_A.nidulans	125	-----PSTPPATPGPK
Weta_A.fumigatus	126	-----RSPSTPPATPHHK
MGG07020_M.oryzae	150	-----DTEIIRFEHLSVHSPRKPAAVPASAPVSRRGSPRKV
NCU01033	237	PRKSRLAEFYTKLRHKAANLHGK-KQKHPATTAMPVTSSTPSTMTGTSNKM TARPRPH
WETA_S.macrospora	241	PRKSRLAEFYTKIRNKAANLHGKIKHQKHPATTAAPAVTSSMPSTMTGTSNKM TARPRPH
Weta_A.nidulans	136	-VKGGLFPTKTIIRHRESNDRGLLRKQSFSPGLMRSSQLQKQSCRMAYPEAWAQR LNF
Weta_A.fumigatus	139	STKSALVTPKSIIRRHDSHER-KLLRKQSFSPSLMRPSQLQAG--RMYPPEAWAQR LNF
MGG07020_M.oryzae	186	TDRLAGVCSGIYKKASATLGRAGTHQQRNSRSASNGLRQKLEREGEHEGLTVAPLNTH
NCU01033	296	NLSLVRPEMPLSPPLIGQVASEQNSNNDSSHAHLFNTNEIDDPFMDISSNLSLPMHTPIQ
WETA_S.macrospora	301	NLSLVRPEMPLSLPLIGQVAAEQNGNIDGNAHLFNTNEMDDPFMDISSNLSLPMHTPIQ
Weta_A.nidulans	195	TIRSDDELPLSPPPSDILVQENVKHTP-----VQMRN---
Weta_A.fumigatus	196	SLHSSGEHLPLSPPPSDILVQHENTPA DN-----VVTHMNHS
MGG07020_M.oryzae	246	RAMPTIEGLPLTPPLSGRLTQQQQQQPFVSGPVEDPFSSKPNPAGROPIVLPETPSG
NCU01033	356	TPHQHQSTPAPVTTADN-SWQFSVS---GPPPTITPANPSTLHAVGGVSSSACELHPLY
WETA_S.macrospora	361	TPHQHQSTPVPVTTAGDNLWQFSVS---GPPPTITPANP-----IGGVSSSACELHPLY
Weta_A.nidulans	229	AAEGFQGSTELPQQIDSGYITQSPATP---MPSPS-----ANALAGQQQR-Y
Weta_A.fumigatus	233	TEGLSRNPAEMPSHYETGIFNQSPAIS---MPSPS-----AKLLAQQQQHNY
MGG07020_M.oryzae	306	TPLMSSQDNTAAQQAYATANYAAMPVISAASIDPELWAAAQFKLSPQFWDGSSPTGLPHV
NCU01033	412	ASTINDSN--WWDQAVEDAMDTDPDPSSS-FHMDTNASNTREATNLNLQMALQQLHDOGGL
WETA_S.macrospora	413	ATTINDSNNDWWDQAVGDAMDTDPDPSSSSLHMGINASNTREATNLNLQMALQQLHNOASF
Weta_A.nidulans	272	LSQTG-TSALTPSPPSARDVFSPPHSSDPQSMPSWHSESLNTPAFQYTPELSDHQ--TWN
Weta_A.fumigatus	277	LSQSNSTMATSSPPSGDDIFSSPPHSSDPQSLSSWHSDSLGGSALPFTPELQAHGQAWW
MGG07020_M.oryzae	366	ESAVPSPLAIDRMDTREGQCYAFAASAAVASTATMMVTRQSNRNLAQAQANQHGTVSM
NCU01033	469	DDHHFGIDAAGLVLMHPQPTTSRVSGGNLHHNQQQQQPNQ---SQAQAQAYAAAQLM
WETA_S.macrospora	473	DEHHFGIDTSGLVLMHPQTTSR-----VLHHNQQQQQLNQNSQSQAQAQAHAAAQLL
Weta_A.nidulans	329	SPMPSEVAQR-----HASYQQMTASPA
Weta_A.fumigatus	337	PSMPSRTPR-----QPSYQHVVSSPA
MGG07020_M.oryzae	426	SQDLTNDGLMTHMPQPRGPPHAATLLAQQQHQQQLMQYHHVHQQQQQQQLLOGAN
NCU01033	525	LAQQQYIS-NGGGNPDGLPSQSSSSTSTTTAAGGGGSRRPKPRAPSSGASRLPSYQSS
WETA_S.macrospora	528	LAQQQYISNHGGGIPDGLPSQSSSSTSTTTTTTTTASRRPKPRAPSSGASRLPSYQTS
Weta_A.nidulans	352	QRPVQAAANHGDFLQGGGLMIQOLDPTQFDISSSFPSSSTIPTTAN--NHDNLAYNVEAHAP
Weta_A.fumigatus	359	QRSIQSNNGH-DLMQGGGLMIQFDSSFDGSTADPSFSSVVSAPMPQENQNMYSIPVTP
MGG07020_M.oryzae	486	FQROPQTVPMLSPDVSHREDHGMHQQQQQQQTHNTHHRRPKPKAPSSGARTGPGGSL

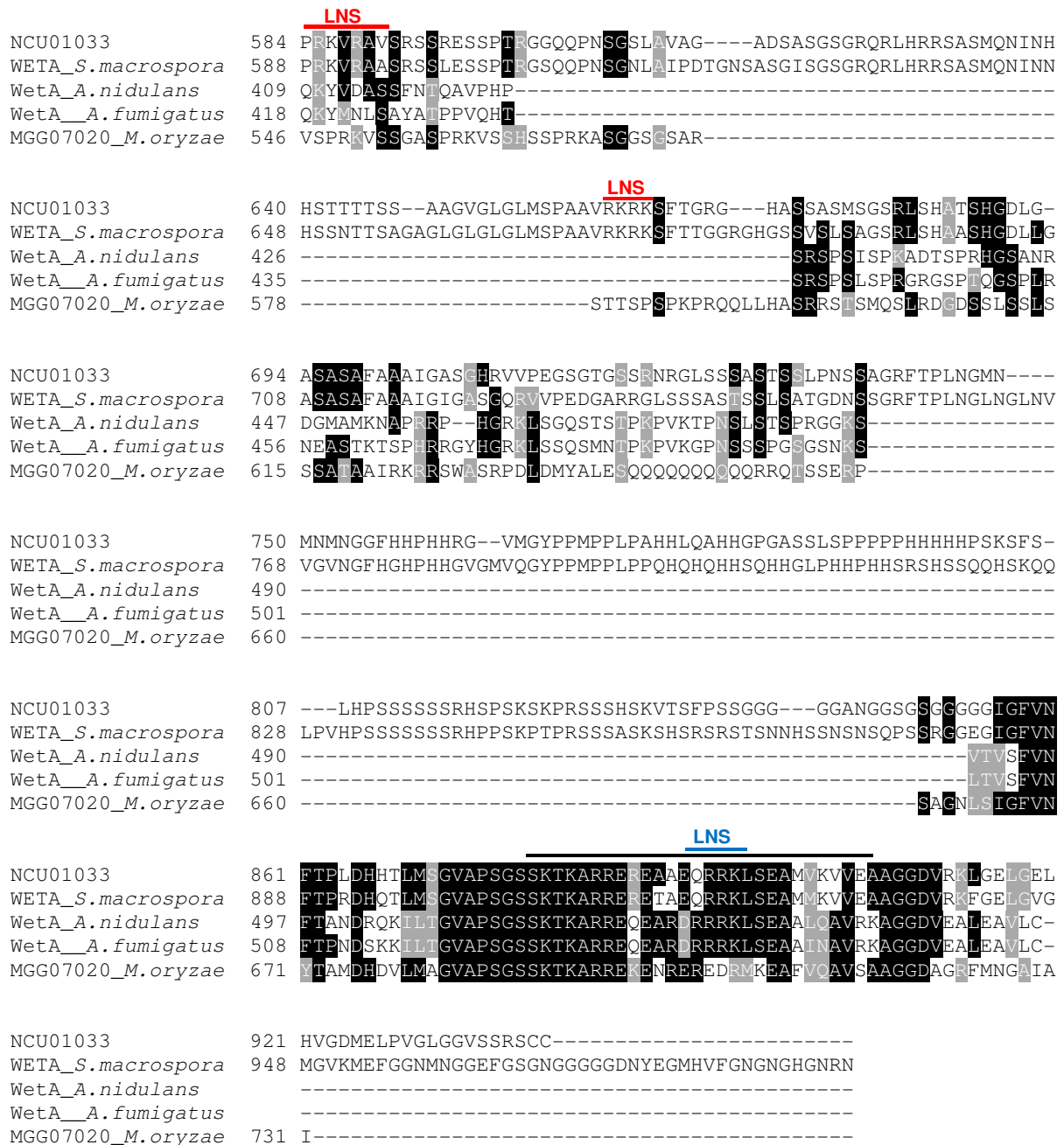


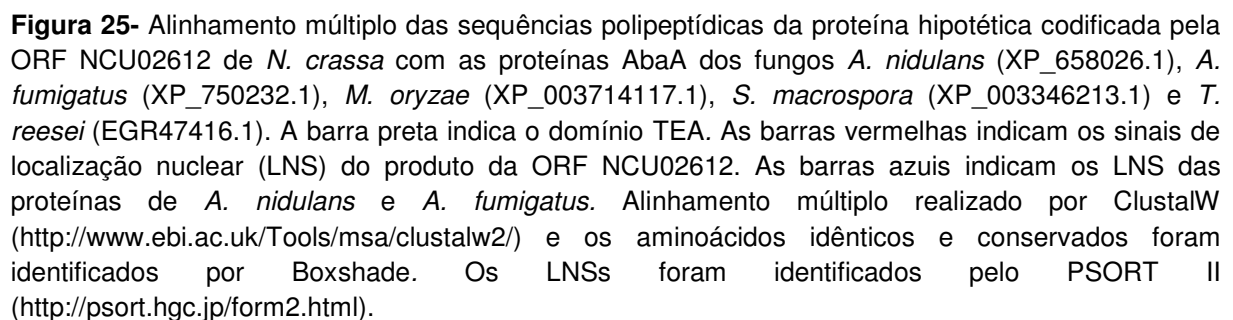
Figura 24- Alinhamento múltiplo das sequências polipeptídicas da proteína hipotética codificada pela ORF NCU01033 de *N. crassa* com as proteínas Weta dos fungos *A. nidulans* (XP_659541.1), *A. fumigatus* (EDP50675), *M. oryzae* (XP_003715201.1) e (XP_003352282.1). A barra preta indica a região de *coiled-coil*. As barras vermelhas indicam os sinais de localização nuclear (LNS) do produto da ORF NCU01033 e das proteínas de *M. oryzae* e de *S. macrospora*. As barras azuis indicam os LNS das proteínas de *A. nidulans* e *A. fumigatus*. Alinhamento múltiplo realizado por ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e os aminoácidos idênticos e conservados foram identificados por Boxshade. Os LNSs foram identificados pelo PSORT II (<http://psort.hgc.jp/form2.html>).

polipeptídica maior que as proteínas de *A. nidulans* (65% de identidade) e *A. fumigatus* (67% de identidade). Também foram identificados quatro preditos sinais de localização nuclear clássicos na proteína de *N. crassa* (237PRKSRLE243, 662RKRK665, 563RRPK566 e 584PRKVRAV590), os quais também foram identificados nas proteínas de *S. macrospora* (241PRKSRLE248, 567RRPK571, 588PRKVRAV595, 672RKRK676) e *M. oryzae* (525RRPK529), sugerindo que estas proteínas possam migrar para o núcleo. Também foi identificado um sinal de localização nuclear clássico na proteína de *A. nidulans* (528RRRK532) e dois sinais na proteína de *A. fumigatus* (151RRHR155, 539RRRK543). A proteína WetA de *A. nidulans* é essencial para a síntese da camada C4 da parede celular dos conídios, tornando-os impermeáveis e maduros, função conservada também no fungo *A. fumigatus* (MARSHALL, TIMBERLAKE, 1991). Neste último, a proteína desempenha um papel essencial na biossíntese de trealose, conferindo resistência a vários tipos de estresse, além de ser essencial para viabilidade dos conídios (TAO, YU, 2011). A ausência do gene *wetA* em *A. fumigatus* e *A. nidulans* causa alterações fenotípicas, como a alteração na taxa de ramificação nas hifas e uma redução da conidiação do fungo (TAO, YU, 2011).

O produto da ORF NCU02612, uma proteína anotada como hipotética, foi identificada ser a proteína homóloga a AbaA de *A. nidulans*. Ela possui um domínio TEA/ATTS na porção N-terminal, do resíduo de aminoácido 141 ao 223 (Figura 25). O domínio TEA/ATTS está presente no fator de transcrição humano TEF-1, um fator de iniciação da transcrição (XIAO *et al.*, 1991), no regulador do desenvolvimento *Scalloped* (Sd) de *Drosophila melanogaster* (CAMPBELL *et al.*, 1992), na proteína TEC1 de *S. cerevisiae*, um regulador da atividade transcricional de Ty1 (LALOUX *et al.*, 1990) e na proteína AbaA de *A. nidulans*, o qual está envolvido na diferenciação e funcionalidade das fiálides (TAO, YU, 2011). O domínio TEA/ATTS, descrito como um domínio de ligação ao DNA (BÜRGLIN, 1991), possui um *motif* de ligação altamente seletivo para a sequência 5'-CATTCTY-3', mas pode tolerar pequenas variações, com uma concomitante redução na afinidade de ligação (ANDRIANOPOULOS, TIMBERLAKE, 1994). A estrutura secundária predita para o domínio consiste de uma α -hélice na porção N-terminal do *motif* e de duas β -folhas na porção C-terminal, as quais são separadas por 2 a 5 voltas β (ANDRIANOPOULOS, TIMBERLAKE, 1991).

A Figura 25 mostra o alinhamento do produto da ORF NCU02612 (*AbaA-like*) e proteínas ortólogas dos fungos *A. nidulans* (41% de identidade), *A. fumigatus* (52% de identidade), *S. macrospora* (75% de identidade) e *Trichoderma reesei* (35% de identidade). O resultado mostrou que a proteína possui uma sequência polipeptídica maior que as proteínas de *Aspergillus*, com a presença do domínio TEA/ATTS pouco conservado entre a proteína de *N. crassa* e as proteínas de *Aspergillus*. A proteína apresenta cinco sinais de

NCU02612	1	MELPVRETTTASQCYPPSSDFILDRHVLSPRPLRESTGNAQYHFQQQHEEQORRQ
AbaA_A.nidulans	1	MATDQPECVMSQNAALESIGAHSDRALQN-----TSGNVQAYSDSLAAHDTTGRDD
AbaA_A.fumigatus	1	MATDQPECVAFQHQSGLENIGHHTDRALQN-----TSGNVQAYSDAIHGGMSGRDD
ABAA_S.macrospora	1	MELPVRETTTASQCYPPSSDFGPDHRRVLSPRPLRESTGNAQYHFQQQHEEQORRQ
TRIREDRAFT108775_T.reesei	1	MASLQPRPVLPSQVIPHAFPEYVDARRNHC-----GSRQPLREAGNAQAHSFNS
		LNS
NCU02612	61	QQQQQQLGALVRSFAFHQHSIPSPVVPQASASSAYGTPEFLGLQORHQMQLRRREHA
AbaA_A.nidulans	54	PIQHYTLKYPHFPVPVPSHPLPTAANLYHPOQLSHRYOVKLRRLQSNSSYAGSR--
AbaA_A.fumigatus	54	HLQHLAYKYSHAPVHP---QPMQTATTLHPHHLNARVOAKLRRLQSLGPNHAGARR--
ABAA_S.macrospora	61	LQQQQQFQFALVRSFAFHQHSIPSLPIPTQSLSSGYGPPPELLRLQORHQMQLRSQRG
TRIREDRAFT108775_T.reesei	52	NIPCYQTPVSSLEPTIPTHIPSOSEVIFYRLQPFPHOPQVRSRQD-----
		LNS
NCU02612	121	INPIYLSPOFLSYRKQASKSKEEKSQKMP-DVLEDAFDALLFQQMGRKYMTRSK
AbaA_A.nidulans	112	-GRSYLKSOKYLEYARPREDTGKDGPVWS-DELEDAFQQALEANFP-MGRRKNSERGR
AbaA_A.fumigatus	109	-GRSYLKSOKYLEYARPREDTGKDGPVWS-DELEDAFQQALEANFP-MGRRKNSERGR
ABAA_S.macrospora	121	INPIYLSPOFLSYRKQASKSKEEKSQKMP-DVLEDAFDALLFQQMGRKYMTRSK
TRIREDRAFT108775_T.reesei	101	INPIYYWPAFKOYRNQAOKDTQKDKGGVWRPELEDAFDVSVLLPH-MGRRKNSMGK
		LNS
NCU02612	180	LNGRNMLVTEYLWYAYRASPPG-----TEPDPKMRTRKQOVSSHQVLKNLLNHRCF
AbaA_A.nidulans	169	SYGRNELIAEYIKITGK-----KTRRKQOVSSHQVLDSFLKGDPDW
AbaA_A.fumigatus	166	SYGRNELIAEYIKITGK-----KTRRKQOVSSHQVLDSFLKGDPDW
ABAA_S.macrospora	180	LNGRNMLIAEYIYVCASPPG-----TEPDPKMRTRKQOVSSHQVLKNLLNHRCF
TRIREDRAFT108775_T.reesei	160	LHGRNMLISEYIFVICVALLGDKEIFRIDNSNDSIEQMGRKQOVSSHQVKKKFEDLRCF
		LNS
NCU02612	234	HHFFFRHDEKEKSRRPKVKKQPLSATLKEIESFKNPLIALAEGRPERPNEYEF
AbaA_A.nidulans	211	ERLVREO-SDRSTAQTQVPFWRWTSMDLPSHYGTHATSSYPEMRLPEPYSADLQLP
AbaA_A.fumigatus	208	ERLVREOPADRSGNQHPVPKWRWTSLDPLPSHYGGMHATYHDHLSLPQVYVGLPFP
ABAA_S.macrospora	234	HHFFFRQNKKEKNRRPKACKKQPLSARELKEIESFKNPLIALAEGRPERPNEYEF
TRIREDRAFT108775_T.reesei	220	HFLFPESEKKEPGSTNS-----DDYDEEGQESFKSNPLIALAEGRPERPNEYEF
		LNS
NCU02612	294	AHLLALNDQIALRPKRCWIVSHPNVQCGGSGYLETTDRLDKSEYPHLERNLKEKW
AbaA_A.nidulans	270	QYSPTSTQDTN-----NNTIQGLSFDWVWSAPNKPDRIDDAYHLYTRLOG----
AbaA_A.fumigatus	268	HYTLCSNMHERS-----TDTIHGFNFDWVWSAPQONQGDKAFFHYVYTCLOG----
ABAA_S.macrospora	294	AQILLALNDQIALRPKRCWIVSHPNVQCGGTGYLETTDRLDKSEYPHLERNLKEKW
TRIREDRAFT108775_T.reesei	273	SQLLSLQGLITVRPKTCETVSSAEIKURDDWYDANNTPLDQASFFHNKYTNCDFPD
		LNS
NCU02612	354	AKEEQQIFGSGLLHEHRETRQVESSTVREVSRGWETSFPPLHERLEAIVADSRCHYLH
AbaA_A.nidulans	316	-----DQRQ---PPMPLEDLKNWVRSFPLSSSDVNDPLN-CEIIL
AbaA_A.fumigatus	314	-----DQYFPVAPPMPLENVRDWRTTFPLNSVMELDPLD-CEIIL
ABAA_S.macrospora	354	AKEEQQIFGSGLLHEHRETRQVESSTVREVSRGWETSFPPLHERLEAIVADSRCHYLH
TRIREDRAFT108775_T.reesei	333	ALG-----KDVLLEHETRSIDRATSACLRTVTRRQKDAPEYETLLPTRDEECLLLE
		LNS
NCU02612	414	MNVALELKEKRGFPNQSDFNSWIEINIEQPOLLSHHWKVTNLVREPAELSEPMSEKPPQT
AbaA_A.nidulans	355	LETNLELMQ-DFPPMGSRGLGHLELDIANP-----MSGTAPTVMENWNCSTY
AbaA_A.fumigatus	356	LEASLKLMM-DFPPPGSKLGIQLDFAFP-----GMTDATVLSQMDNWNCSTY
ABAA_S.macrospora	414	MNVALELKEKRGFPNQSDFNSWIEINIEQPOLLSHHWKVTNLVREPAELSEPMSEKPPQT
TRIREDRAFT108775_T.reesei	387	VCSTLELHEHAKFPGSGSELTGFEVVAITQPELQHHHWKVTNLTRDELGYGDSKRGVYT
		LNS
NCU02612	474	YYETSAEIAIQYQHLPGCDG-----YDHCNCISARR-RDWVWVFPADAWARTLTNC
AbaA_A.nidulans	403	IYEDGRRTMEAYHNITKPH-----TKVPPFESSWWAKTFTEL
AbaA_A.fumigatus	404	IYEDCNRLSKADHNLARPLS-----TKVPPFESSWWAKTFTEL
ABAA_S.macrospora	474	YYETGAEIAIQYQHLPGCDGPRNVGHEYQCECISARRSRREWVWVFPADAWARTLTNA
TRIREDRAFT108775_T.reesei	447	NESGIHERCSDSKMNDONCHMR-----PRDITVFPFAVEWASTLSTA
		LNS
NCU02612	527	AEYPAHPFGVRRGANKRRAAAAP--LKREPQDSEDNDDTESTSSSTRSSVSG----DGG
AbaA_A.nidulans	442	TQDKREAESTGH-----HHAA
AbaA_A.fumigatus	443	TQDKQMAEKSGR-----HQNA
ABAA_S.macrospora	534	AEYPAHQFGVRRGDNKRTAAAAATSLKREREDSEDNDDTESTSSSTRSSIGGGRDADGG
TRIREDRAFT108775_T.reesei	491	VQYPDVEHQRRKREKRHEAKQHDL-----RAGSK
		LNS
NCU02612	580	QPTQMLVLPQIAMQEIWSCPPESPLEDQDVGLTGTASHQPOWTRCAVILWTFETIHSLD
AbaA_A.nidulans	458	DERTRRYFHSITAMQEIIRATVPSSLRLQNHYPGSPAESK---RMAILWFR-----
AbaA_A.fumigatus	459	DDIRQFFRSLAMQEIIRATVQNSRVSQ--GSGHPDCSK---RMAILWFR-----
ABAA_S.macrospora	594	QPTQMLVLPQIAMQEIWSCPPESPLEDQDGTGATSHHRSQOWTRCAVILWTFETIHSLD
TRIREDRAFT108775_T.reesei	521	RKRSEDEGDAASWSRREPAGSLICKVAMYQELWSRAPDSTQWKRCALIFWNTITN--Q
		LNS
NCU02612	640	SAGRVLTAAQSGKTSWRFLTDPTSPYHQOKALLSSSEAAACQIGPKRHTTAAGRTS
AbaA_A.nidulans	509	---QTRPNEVGTTWRKLITSP-----DALINSFRPSAIDPPLSLDSTILLSKPTS
AbaA_A.fumigatus	508	---QILPDEVGLTWKRLIPPP-----DTMNSPKPACIDPPLSLDSTILLKPPQ
ABAA_S.macrospora	654	NDGKLLTAQTGKTSWRFLTDPTSPYHQOKALLSSSDAAACQIGPNRHTAAGRNAS
TRIREDRAFT108775_T.reesei	579	WYKYSPVFKPSGTSWRWLTNDPMSRYHQOKALLYSSSSSAAGAVPRDAVMSPTPSVS
		LNS
NCU02612	700	LSINPHYPGSPH--GIGATETFVSPISTSMGTTPIGGRAG---DLIVSPVSYQOHLN
AbaA_A.nidulans	559	NLYQAPPCHHDLHLHQNAPSQQSWS-----LYQPSHDHVNLSLY
AbaA_A.fumigatus	558	NVYNP-CHHDLHLHNGTSQPHWF-----LYPFPHESMSNMY
ABAA_S.macrospora	714	LSINAQYPGTSHGMGVGATFAFIPSPISSSMGTTAGMGGGRAGDLNLMSPSTSYQHHLQ
TRIREDRAFT108775_T.reesei	639	QQLAGIMNENLSSAWASCAVPPVQTNMNVDFPTC-----LATEPPTATVHGP



localização nuclear clássica (248RPRK252, 306RPKR310, 504RRRR508, 1167KRPR1171, 205 PDPKMKR212) e possui predição de 94,1% de estar localizada no núcleo segundo o PSORTII. Também foram identificados três sinais de localização nuclear clássicos nas proteínas de *A. nidulans* (127RPRR131, 156PPMGRRK163, 97RRLQSNSSYAGSRRGR114) e de *A. fumigatus* (124RPRR128, 153PPMGRRK160, 94RRVQSLGPNHAGARRGR111). As proteínas de *S. macrospora* e *T. reesei* também apresentam vários sinais de localização nuclear clássicos (dados não apresentados). Em *A. fumigatus*, *abaA* é ativado por BrlA durante os estágios intermediários da conidiação, e está envolvido na diferenciação e funcionalidade das fiálides. Também desempenha importante papel na morte celular e autólise (TAO, YU, 2011).

8. Caracterização morfológica dos mutantes *vosA*^{KO}, *wetA-like*^{KO} e *abaA-like*^{KO}

8.1. Crescimento em meio sólido

As linhagens mutantes foram crescidas em frascos contendo meio VM sólido e mantidas em estufa a 30 °C por um período de 3 dias. Após esse período, os frascos foram transferidos para temperatura e luminosidade ambiente por mais 5 dias. O aspecto das linhagens foi avaliado após 3 e 8 dias e comparado à linhagem selvagem. As imagens mostram que após 3 dias de crescimento foi possível observar um retardo no crescimento da linhagem *vosA*^{KO} (Figura 26). A linhagem *abaA-like*^{KO} apresentou um aspecto cotonoso, diferente do observado nas demais linhagens. Após um período de 8 dias de crescimento, a linhagem *vosA*^{KO} apresentou um retardo no crescimento em relação à linhagem selvagem e as linhagens *wetA-like*^{KO} e *abaA-like*^{KO} apresentaram fenótipo semelhante à linhagem selvagem (Figura 26B).

As extremidades das hifas foram analisadas por microscopia e os resultados mostraram que a morfologia das hifas das linhagens mutantes foram semelhantes à linhagem selvagem (resultados não mostrados).

8.2. Análise da germinação dos conídios das linhagens *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO}

Em *A. nidulans* a deleção do gene *vosA* provoca uma acentuada diminuição da viabilidade dos conídios, produzindo conídios translúcidos devido a falta de citoplasma e organelas, incluindo os núcleos (NI, YU, 2007). A deleção do gene *wetA* no fungo *A. fumigatus* leva a má formação das camadas C1 e C2 da parede celular dos conídios, o que pode ocasionar perda do citoplasma da célula, refletindo em uma diminuição da viabilidade dos conídios (TAO, YU, 2011).

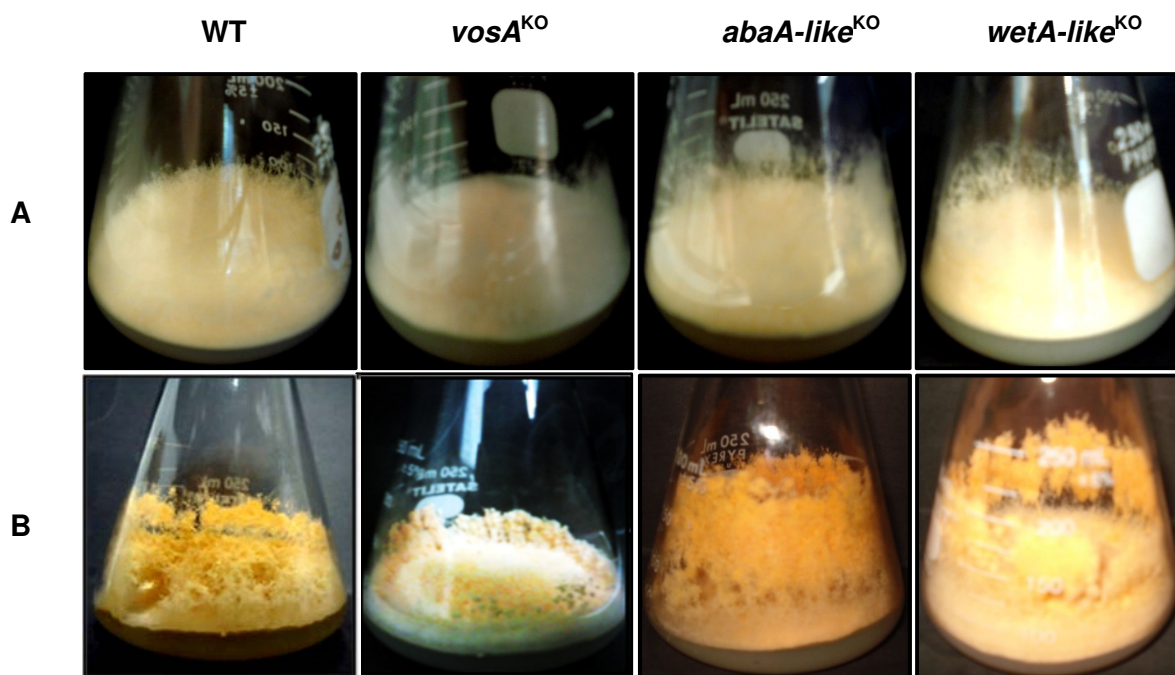


Figura 26– Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutantes em meio sólido. Conídios foram inoculados no centro do meio de cultura, as linhagens foram mantidas inicialmente a 30°C por 3 dias **(A)** e, posteriormente, à temperatura e luminosidade ambiente por mais 5 dias **(B)**.

Com base nas informações existentes em *Aspergillus*, foi realizada a análise da germinação dos conídios das linhagens mutantes *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO} de *N. crassa* a fim de verificar a viabilidade dos conídios produzidos por ambas as linhagens. Para tal, conídios das linhagens mutantes e selvagem foram inoculados em frascos contendo meio VM líquido e mantidos sob agitação à temperatura de 30°C. Amostras foram retiradas a cada 2 h e analisadas em microscópio. Os resultados mostraram um retardamento na germinação dos conídios das linhagens *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO} em relação à linhagem selvagem, recuperando o fenótipo após 8 h de crescimento (Figura 27).

A germinação dos conídios das linhagens também foi realizada em placas de Petri contendo uma lamínula depositada no centro, recoberta por meio VM líquido. Conídios das linhagens *vosA*^{KO}, *wetA-like*^{KO} e selvagem foram inoculados nas placas e incubados a 30°C nos tempos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h. Em seguida, as lamínulas foram retiradas, submetidas a diferentes tratamentos e analisadas por microscopia de fluorescência. A Figura 28 mostra as imagens das hifas das linhagens após o tratamento com calcofluor. É possível observar um retardamento na germinação dos conídios da linhagem *vosA*^{KO} quando comparada à linhagem selvagem, recuperando seu fenótipo após 8 h de crescimento. Entretanto, o crescimento normal foi recuperado nos tempos tardios da cultura. Uma característica interessante é a presença de constrictões das hifas, após de 12 h de crescimento, na

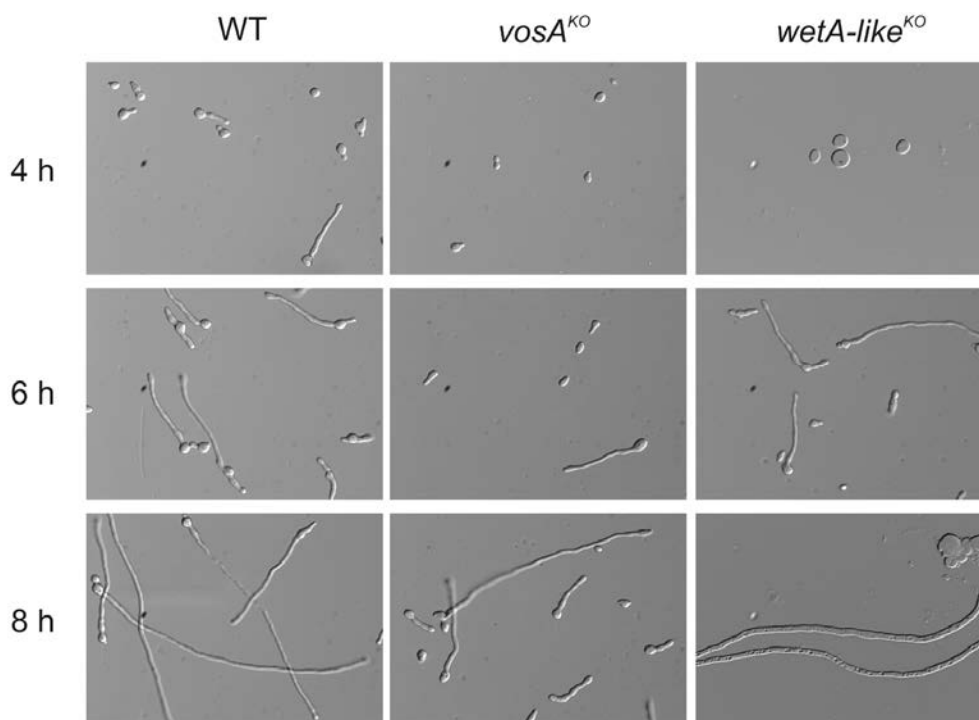


Figura 27- Análise morfológica da germinação dos conídios das linhagens selvagem e mutantes *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO}. Conídios foram inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação constante a 30°C. Amostras retiradas a cada 2 h. Imagens obtidas utilizando o microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 40 x de aumento.

linhagem *wetA-like*^{KO}. O tratamento das células com DAPI não mostrou alteração na organização dos núcleos nas linhagens mutantes (Figura 29).

9. Análise do crescimento e viabilidade celular das linhagens selvagem, *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO}

O crescimento das linhagens foi determinado por medidas de peso seco e foi avaliado apenas para a linhagem *vosA*^{KO}. Conídios das linhagens mutante e selvagem foram inoculados em frascos contendo meio VM líquido e mantidos sob agitação constante e temperatura de 30°C. Amostras foram coletadas a cada 12 h, filtradas e o micélio obtido foi seco em estufa e pesado em balança analítica. O resultado apresentado na Figura 30A mostra que até 36 h de crescimento a linhagem mutante sofreu um leve retardo no crescimento recuperando nos tempos tardios do crescimento. A viabilidade dos conídios das linhagens mutantes *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO} foi realizada em placas de Petri contendo meio VM

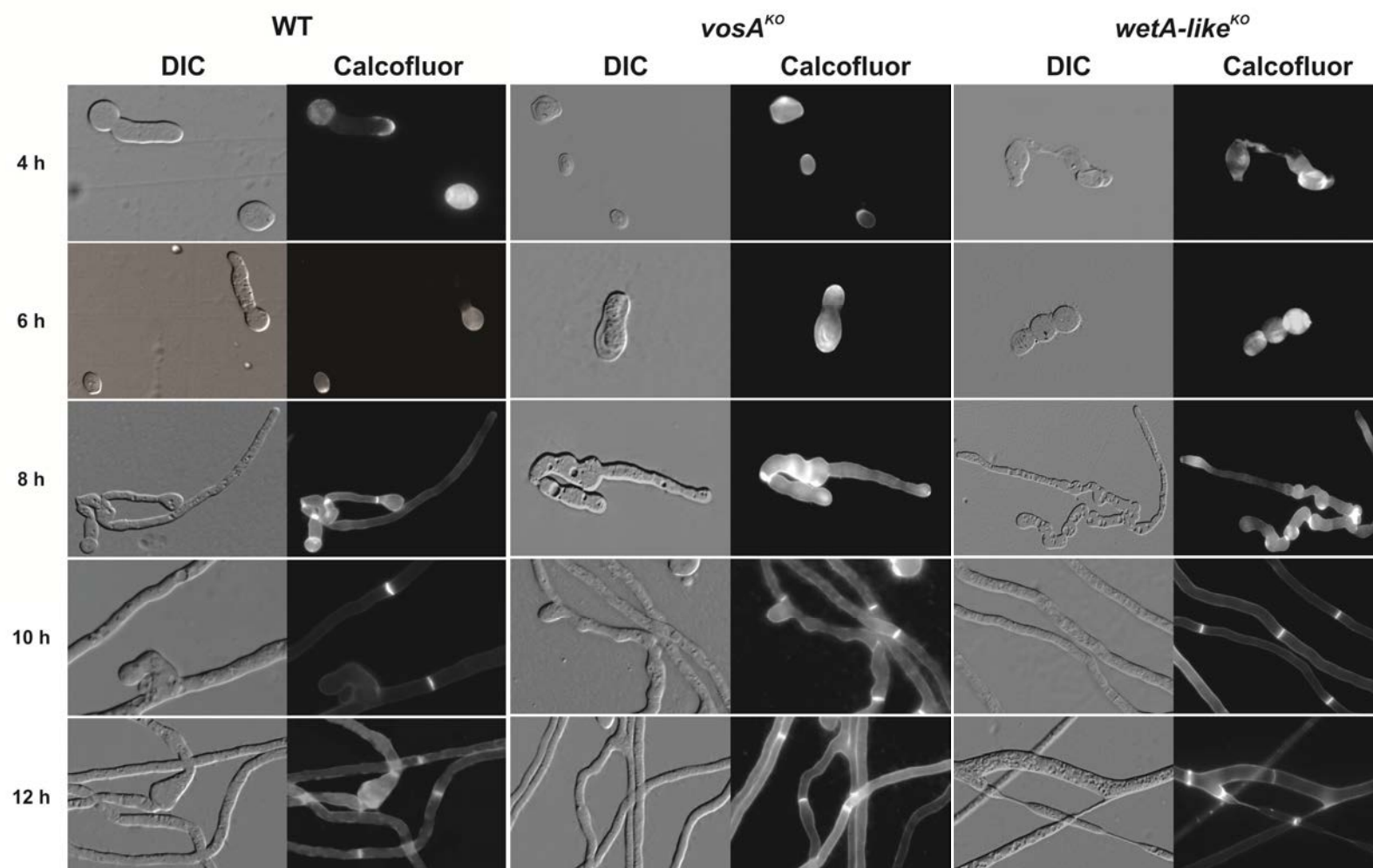


Figura 28– Análise morfológica durante a germinação de conídios das linhagens selvagem, *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO}. Conídios corados com solução 1 mg/mL de calcofluor. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 63 x de aumento.

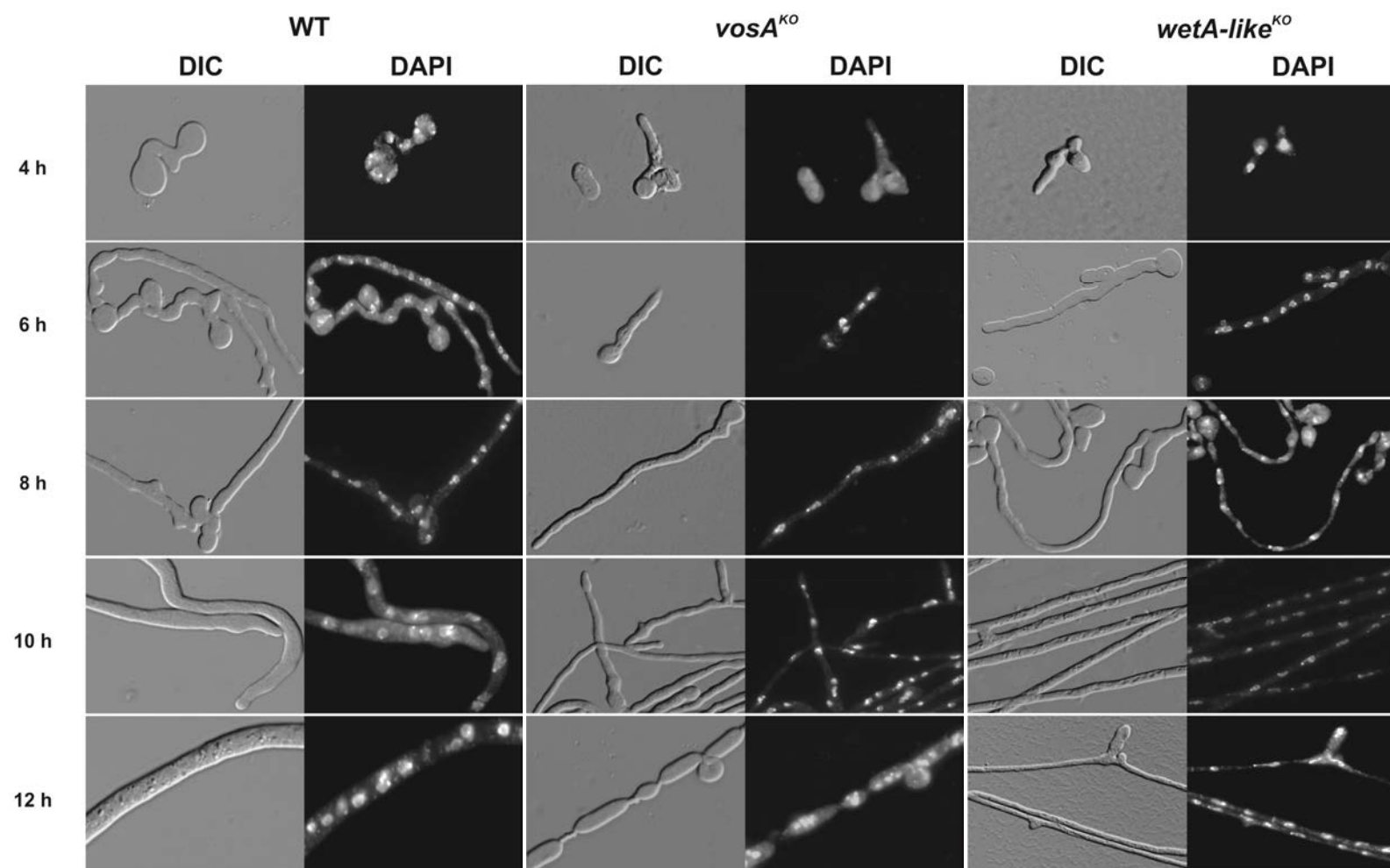


Figura 29– Análise morfológica durante a germinação de conídios das linhagens selvagem, *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO}. Células foram fixadas com solução 3,7% (v/v) de formaldeído, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,0, 0,2%(v/v) triton X-100 e coradas com solução 10 µg/mL de DAPI. Imagens obtidas por microscopia de fluorescência utilizando microscópio Axioimager A2 (Zeiss) com 63 x de aumento.

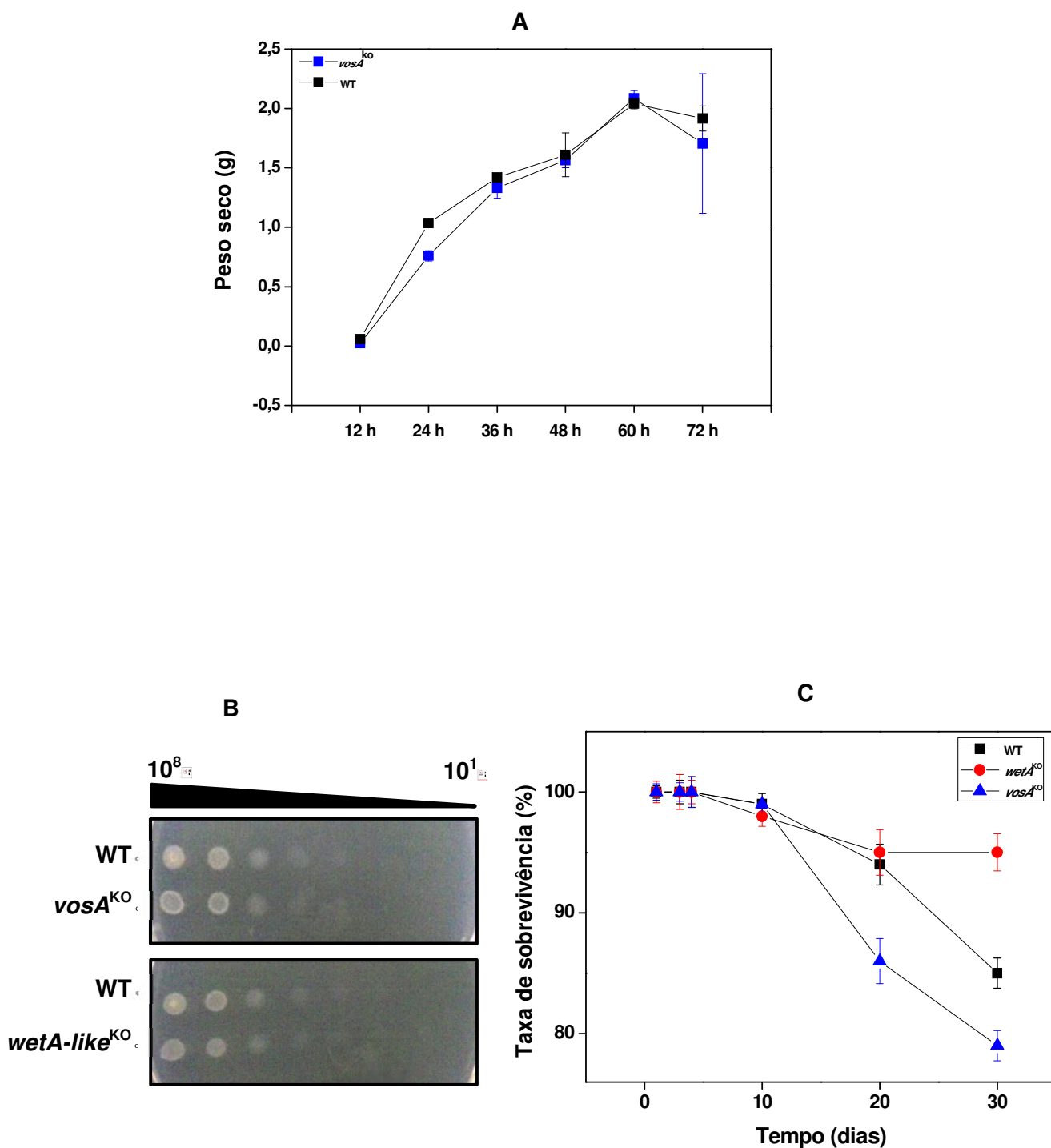


Figura 30- Análise do crescimento e viabilidade das linhagens selvagem, *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO} **(A)** Análise do peso seco das linhagens selvagem e *vosA*^{KO}. Conídios inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação constante a 30°C. **(B)** Análise de viabilidade celular. Concentrações decrescentes de uma suspensão conidial fresca foram inoculadas em placas de Petri contendo meio VM sólido acrescido de sorbose 2%. **(C)** Taxa de sobrevivência celular em conídios corados com azul de metileno. Resultado apresentado em percentual de células ativas.

sólido acrescido de sorbose, para indução do crescimento colonial, e comparada à linhagem selvagem. Os resultados mostraram que não houve diminuição da viabilidade das linhagens mutantes em relação à linhagem selvagem (Figura 30B). Adicionalmente foram realizados ensaios de viabilidade celular utilizando o corante azul de metileno. Os resultados mostraram que após 20 dias a viabilidade dos conídios das linhagens mutantes e selvagem diminuiu. Entretanto, para a linhagem *wetA-like*^{KO}, a taxa de sobrevivência dos conídios permaneceu elevada por até 30 dias após a obtenção dos conídios frescos (Figura 30C).

Os resultados obtidos são contrários aos descritos para VosA e WetA nos fungos *A. nidulans* e *A. fumigatus*, respectivamente (NI, YU, 2007; TAO, YU, 2011), onde a deleção dos genes *vosA* e *wetA* causa uma severa diminuição da viabilidade celular.

10. Acúmulo de carboidratos de reserva nos mutantes *vosA*^{KO} e *wetA-like*^{KO}

Nos fungos *A. nidulans* e *A. fumigatus*, VosA e WetA regulam a biosíntese de trealose, e suas ausências leva à suscetibilidade do fungo à diferentes tipos de estresse (NI, YU, 2007; TAO, YU, 2011). Desse modo, se tornou importante investigar o papel das proteínas de *N. crassa* no metabolismo de carboidratos de reserva. A Figura 31 apresenta o perfil de acúmulo de glicogênio nas linhagens mutantes e selvagem. A linhagem *wetA-like*^{KO} mostrou um deslocamento no pico de acúmulo de glicogênio em relação a linhagem selvagem, de 48 para 24 h (Figura 31B). Porém, o perfil de acúmulo do carboidrato é semelhante ao da linhagem selvagem. A linhagem *vosA*^{KO} apresentou uma desregulação no acúmulo de glicogênio quando comparada à linhagem selvagem, variando os níveis do carboidrato durante o crescimento vegetativo do fungo (Figura 31C). Os resultados sugerem que ambas proteínas estão envolvidas na regulação do metabolismo de glicogênio. Considerando que VOSA possa ser um fator de transcrição (NI, YU, 2007), é possível especular que esta proteína atue direta ou indiretamente na regulação dos genes responsáveis pela síntese e/ou degradação do carboidrato.

O acúmulo de trealose foi quantificado e não mostrou diferenças em relação à linhagem selvagem (Figura 32). Os resultados obtidos para a quantificação de trealose nas hifas do fungo são contrários aos descritos para VosA e WetA nos fungos *A. nidulans* e *A. fumigatus*, respectivamente, onde foi observada a ausência total de trealose em conídios das linhagens mutantes nos genes *vosA* de *A. nidulans* e *wetA* de *A. fumigatus*, afetando a viabilidade e tolerância à estresse dos conídios (NI, YU, 2007; TAO, YU, 2011).

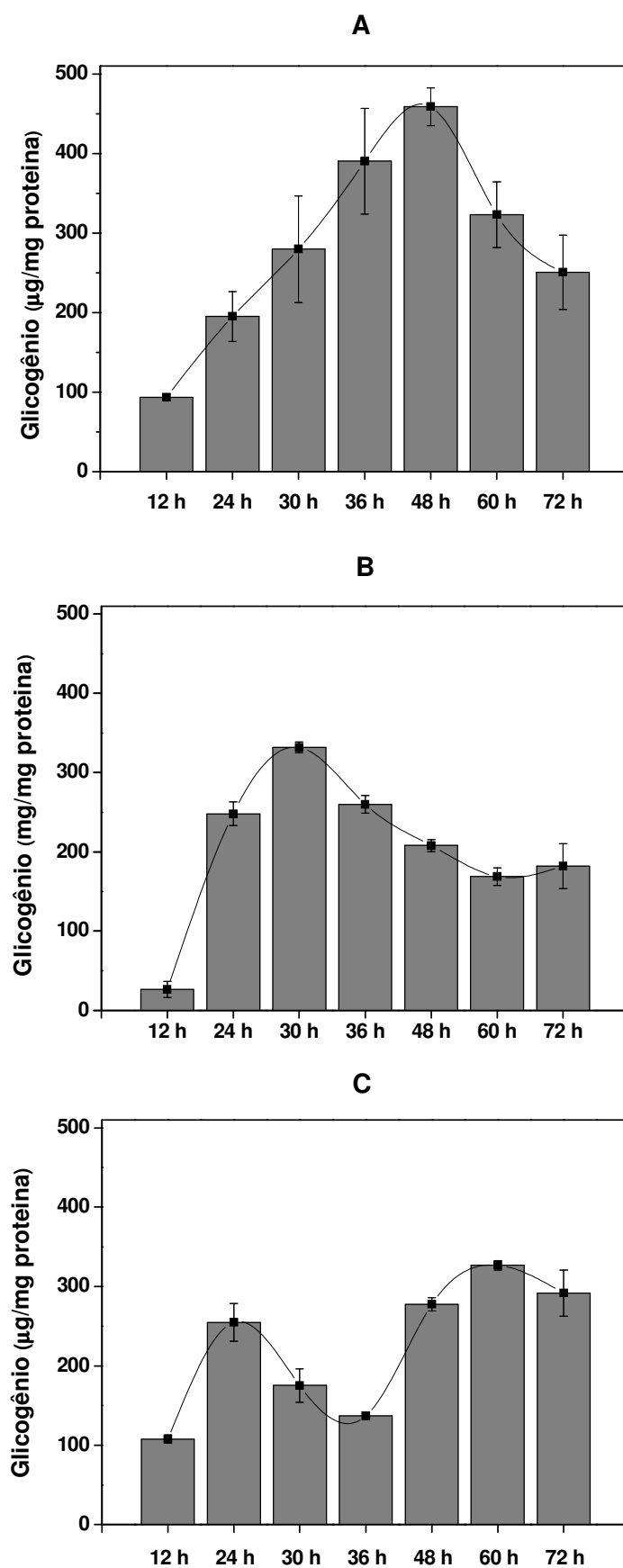


Figura 31- Análise de acúmulo de glicogênio durante o crescimento do fungo. Conídios foram inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação constante à temperatura de 30 °C. Amostras foram coletadas a cada 12 h. Concentração de glicogênio nas linhagens **(A)** selvagem e mutantes **(B)** *wetA*^{KO} e **(C)** *vosA*^{KO}.

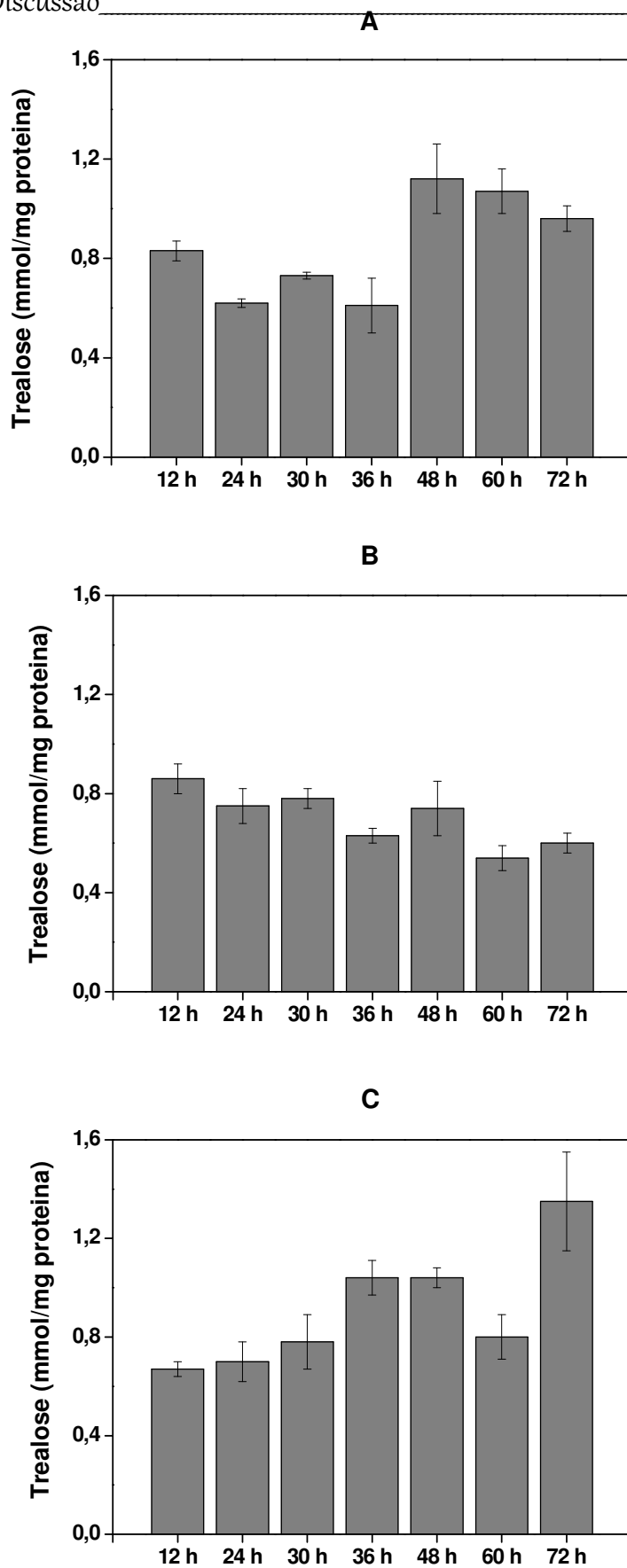


Figura 32- Análise de acúmulo de trealose durante o crescimento do fungo. Conídios foram inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação constante à temperatura de 30 °C. Amostras foram coletadas a cada 12 h. Concentração de trealose nas linhagens **(A)** selvagem, **(B)** *wetA-like*^{KO} **(C)** *vosA*^{KO}.

11. Análise de ligação da proteína FLBC aos promotores *vosA*, *abaA-like* e *wetA-like*

Em *A. nidulans*, a proteína FlbC se liga fisicamente à região promotora dos genes *brlA*, *abaA* e *vosA*, mas não à região promotora do gene *wetA* (KWON *et al.*, 2010). Uma análise *in silico* da região promotora do gene *vosA* de *N. crassa* revelou a existência de um *motif* de ligação da proteína FlbC de *A. nidulans* (5'-TGACGA(T/A)-3'). Do mesmo modo, o *motif* de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* (5'- C(C/T)GCCGATC(C/A)-3') foi identificado na região promotora dos genes *wetA-like* e *abaA-like*, mas não na de *vosA*. Com base nas informações obtidas, foram realizadas análises de alteração de mobilidade em gel para verificar a capacidade de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* a ambos *motifs* encontrados nas regiões promotoras dos diferentes genes (Figura 33).

Inicialmente, reações de retardo em gel foram realizadas com as sondas *pabaA* e *pwetA* contendo o *motif* de *N. crassa* e *pvosA* contendo o *motif* de *A. nidulans*, utilizando concentrações crescentes da proteína recombinante GST::FLBC (1 a 15 µg). Foi observada a formação de um forte complexo DNA-proteína nas reações contendo o *motif* para ligação da proteína de *N. crassa* e a ausência de complexo na reação utilizando a sonda *pvosA* contendo o *motif* da proteína de *A. nidulans* (dados não apresentados). Os resultados sugeriram que o gene *vosA* não é diretamente regulado pelo fator de transcrição FLBC, podendo ser regulado pelo gene *abaA-like*, como descrito para o fungo *A. nidulans* por Kwon *et al.* (2010).

Ensaio de competição específica foram realizados com as sondas *pabaA* e *pwetA* contendo o *motif* de ligação FLBC de *N. crassa*, através da incubação da proteína recombinante com um excesso molar do competidor específico (sonda não marcada) em relação à sonda. Foi observada uma leve diminuição da intensidade do complexo DNA-proteína apenas com um excesso molar de 30 x em relação às sondas *pwetA* e *pabaA*, indicando uma alta especificidade na interação DNA-proteína (dados não apresentados).

Para verificar a especificidade de ligação da proteína FLBC, reações utilizando os oligonucleotídeos oligoFLBC (*N. crassa*) e oligoFlbC (*A. nidulans*) como competidores específicos foram realizadas para as sondas *pwetA* e *pabaA*. As Figuras 34 e 35 mostram o desaparecimento do complexo DNA-proteína na presença do oligonucleotídeo contendo o *motif* de *N. crassa* (Figura 34, canaletas 6 e 7). Entretanto, uma diminuição da intensidade do complexo foi observada na presença do oligoFlbC para a sonda *pwetA* (Figura 34, canaletas 8 e 9) sugerindo que o *motif* de *A. nidulans* não é perfeitamente reconhecido pela proteína FLBC de *N. crassa*.

A Figura 35 mostra o resultado de ligação da proteínas GST::FLBC à sonda *pabaA*. Na presença do oligonucleotídeo oligoFlbC, foi possível visualizar a não diminuição na intensidade do complexo DNA-proteína, entretanto houve o aparecimento de uma segunda

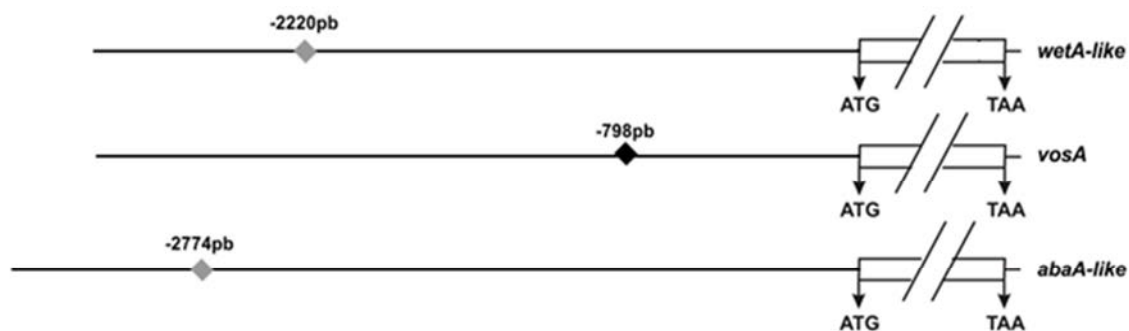


Figura 33- Análise da região promotora dos genes *wetA-like*, *vosA* e *abaA-like*. Os losangos cinza representam o *motif* FLBC e os losangos pretos representam o *motif* FlbC. Oligonucleotídeos utilizados para a amplificação dos fragmentos de DNA contendo os *motifs* identificados são mostrados na Tabela 2.

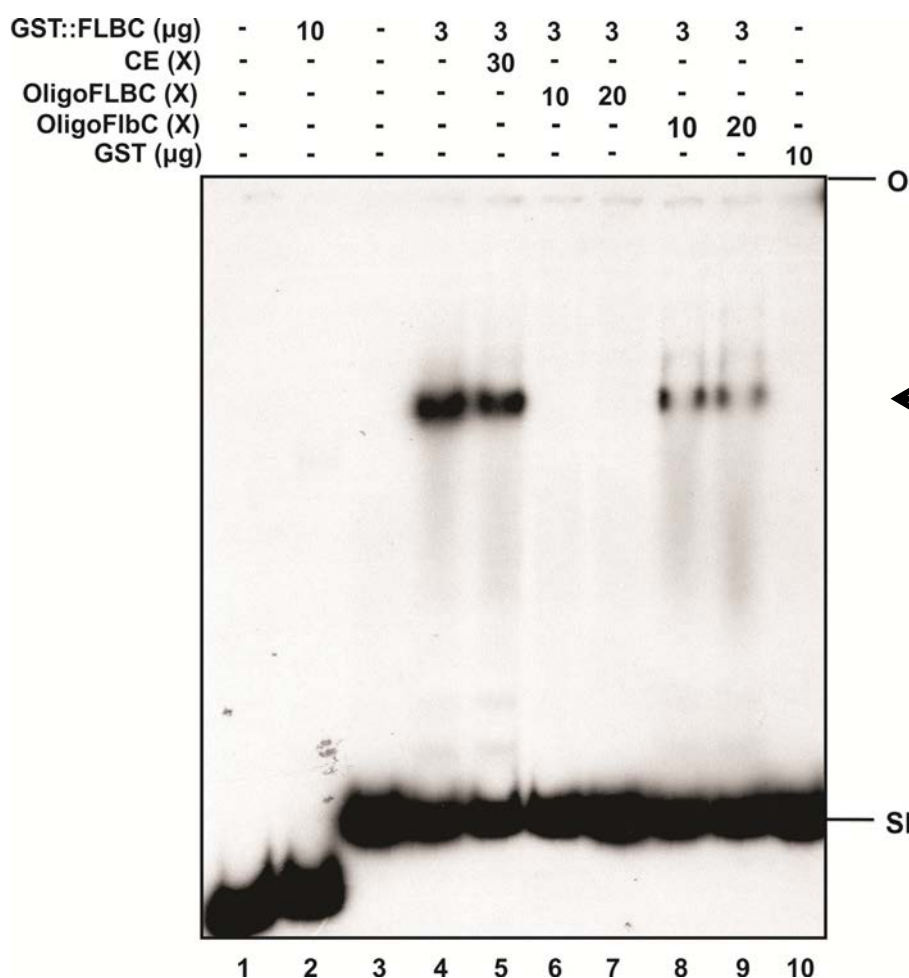


Figura 34- Ensaio de EMSA mostrando a ligação da proteína GST::FLBC ao *motif* de *N. crassa* presente na sonda *pwetA*. Diferentes concentrações dos oligoFlbC e oligoFLBC foram testadas (10 e 20 x de excesso molar à sonda) utilizando-se de 3,0 µg da proteína GST::FLBC. O complexo DNA-proteína é indicado pela seta. **Canaleta 1-** Sonda inespecífica (sem sítio de ligação para proteína FLBC) sem adição de proteína. **Canaleta 3-** Sonda sem adição de proteína. **SL-**Sonda livre. **O-** Origem do gel. Eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante 5%, em tampão TBE 0,5 x.

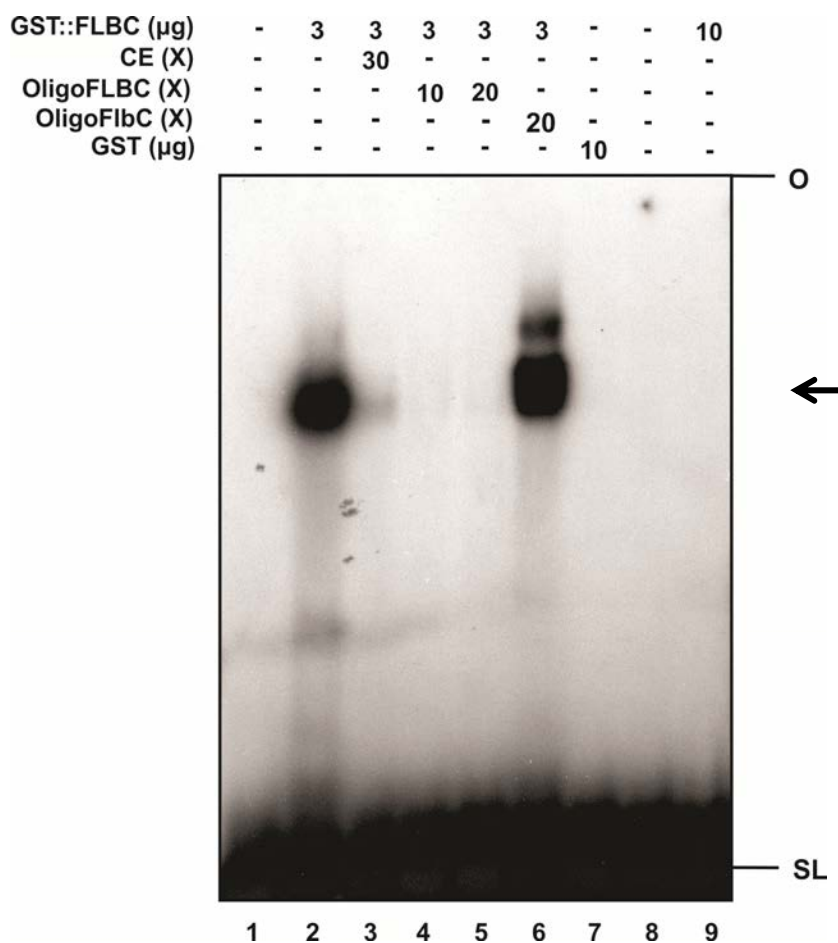


Figura 35- Ensaio de EMSA mostrando a ligação da proteína GST::FLBC ao *motif* de *N. crassa* presente na sonda *pabaA*. Diferentes concentrações dos oligoFlbC e oligoFLBCL foram testadas (10 e 20 x de excesso molar à sonda) utilizando-se de 3,0 µg da proteína GST::FLBC. O complexo DNA–proteína é indicado pela seta. **Canaleta 1-** Sonda sem adição de proteína. **Canaleta 8-** Sonda inespecífica (sem sítio de ligação para proteína FLBC) sem adição de proteína. **SL-**Sonda livre. **O-** Origem do gel. Eletroforese em gel de poliácridamida não desnaturante 5%, em tampão TBE 0,5 x.

banda no gel, sugerindo a formação de complexos diferentes (Figura 35, canaleta 6). Como controles negativos das reações foram utilizados a proteína GST e uma sonda, marcada radioativamente (Figura 34, canaleta 1, Figura 35, canaleta 8), a qual não possui sítios de ligação para as proteínas de *N. crassa* ou *A. nidulans* (*pdeb*), mostrando a especificidade de ligação apenas ao *motif* da proteína FLBC.

Ensaio de ligação *in vivo* (ChIP-PCR) demonstraram a interação *in vivo* da proteína FlbC com os principais genes da cascata de conidiação de *A. nidulans*, *brlA*, *abaA* e *vosA*, demonstrando que a proteína atua como um regulador no processo de conidiação no fungo (Kwon *et al.*, 2010). Entretanto, em *N. crassa* foram identificadas apenas proteínas ortólogas à VosA, WetA e AbaA, sugerindo que esta via possa ocorrer de modo diferente ao descrito em *A. nidulans* ou que a esta via de sinalização ocorra sem a participação da proteína BrlA.

Baseado nos resultados obtidos, as análises de expressão gênica foram realizadas apenas para os genes *abaA-like* e *wetA-like*.

12. Análise da expressão dos genes *abaA-like* e *wetA-like*

Como mostrado por Tao and Yu (2011), a ausência de um dos genes que compõem a cascata de conidiação do fungo *A. fumigatus* pode levar à inativação ou diminuição da expressão de genes posteriores na cascata, levando a defeitos no crescimento e desenvolvimento do fungo. Portanto, foi importante analisar a expressão dos genes *abaA-like* e *wetA-like* na linhagem *flbC^{KO}*. Estudos de expressão destes genes foram realizados nas linhagens mutante *flbC^{KO}* e selvagem durante o crescimento vegetativo e após a indução do desenvolvimento assexual do fungo. Os resultados apresentados na Figura 36 mostram uma baixa expressão dos genes *abaA-like* (Figura 36A) e *wetA-like* (Figura 36B) na linhagem mutante *flbC^{KO}* durante todo o período de crescimento vegetativo analisado. Na linhagem selvagem, o transcrito *wetA-like* foi detectado a partir de 12 h e mostrou expressão máxima em 48 h, decaindo após esse período. O gene *abaA-like* pode ser detectado a partir de 12 h na linhagem selvagem, com os níveis do transcrito decaindo até 48 h.

Após a indução do desenvolvimento assexual, o transcrito *abaA-like* mostrou níveis superiores de expressão na linhagem *flbC^{KO}* em relação à linhagem selvagem nos tempos de 8 e 12 h, sugerindo que o nocaute do gene *flbC* induz uma regulação positiva do gene *abaA-like* (Figura 37A). O gene *wetA-like* foi expresso na linhagem selvagem após 4 h de indução do desenvolvimento assexual do fungo, atingindo uma expressão máxima em 8 h e pouco expresso na linhagem mutante *flbC*, sugerindo que o gene *wetA-like* seja ativado por FLBC (Figura 37B). Os resultados obtidos para a linhagem selvagem de *N. crassa* foram semelhantes aos descritos por Tao and Yu (2010) em *A. fumigatus*, os quais mostraram que o transcrito *wetA-like* foi detectado após 12 h de indução do desenvolvimento assexual e atingiu uma expressão máxima em 48 h. O transcrito *abaA-like* pode ser detectado 6 h após a indução do desenvolvimento assexual, mantendo níveis elevados até 12 h.

Os resultados obtidos nos experimentos de expressão dos genes *abaA-like* e *wetA-like*, em conjunto com os resultados obtidos nas análises de ligação DNA-proteína, indicaram que estes genes são regulados diretamente por FLBC, sendo o gene *abaA* reprimido por FLBC e o gene *wetA-like* ativado na presença do fator de transcrição durante o desenvolvimento assexual. Os resultados obtidos neste trabalho sugeriram que o fator de transcrição FLBC de *N. crassa* regula diretamente os genes *abaA-like* e *wetA-like* e regula a conidiação, mas muito provavelmente de uma maneira independente de *abaA* e *wetA*.

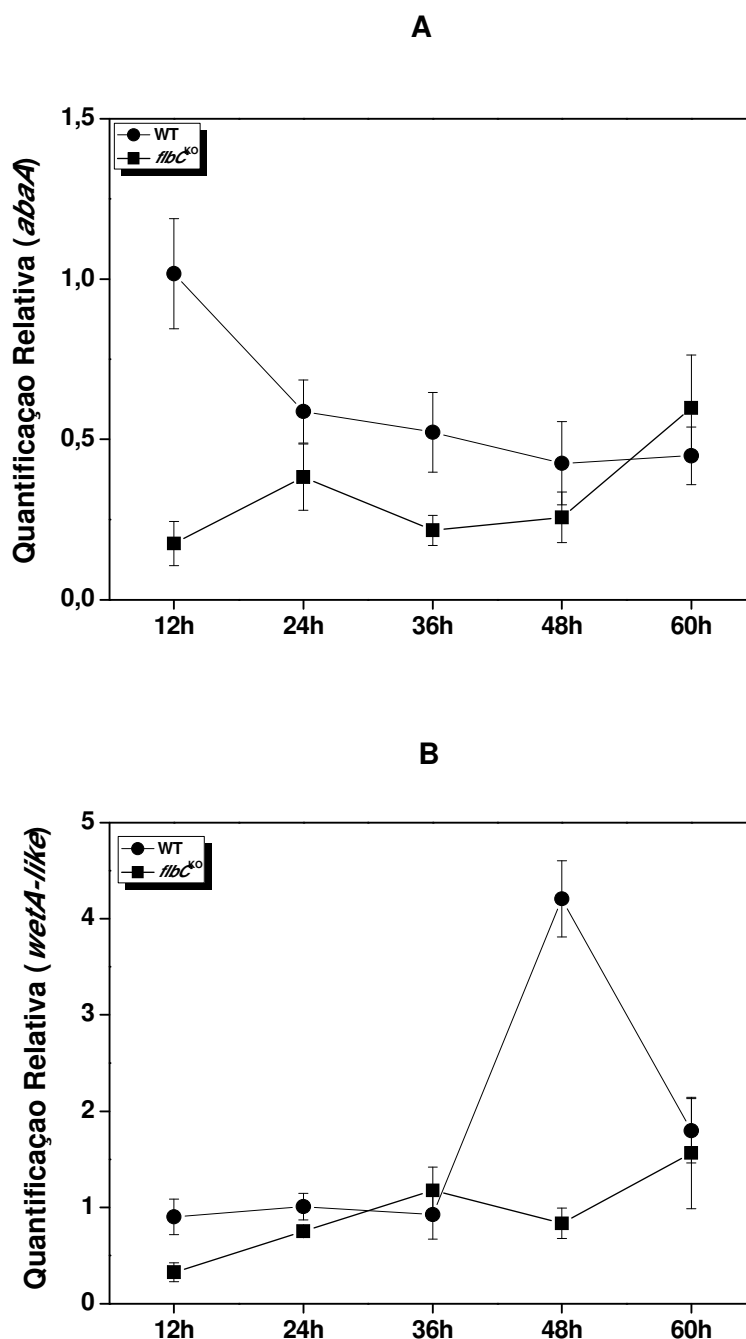


Figura 36– Análise da expressão dos genes *abaA-like* e *wetA-like* nas linhagens selvagem e *flbC*^{KO} por qPCR durante o crescimento vegetativo. Conídios inoculados em meio VM líquido e mantidos sob agitação constante e à temperatura de 30 °C. Amostras foram coletadas a cada 12 h. Extração de RNA das amostras realizada como descrito por SOKOLOVSKY *et al.* (1990). Síntese de cDNA realizada por RT-PCR. **(A)** Expressão do gene *abaA-like*. **(B)** Expressão do gene *wetA-like*. Os valores apresentados foram normalizados em relação ao tempo de 12 h.

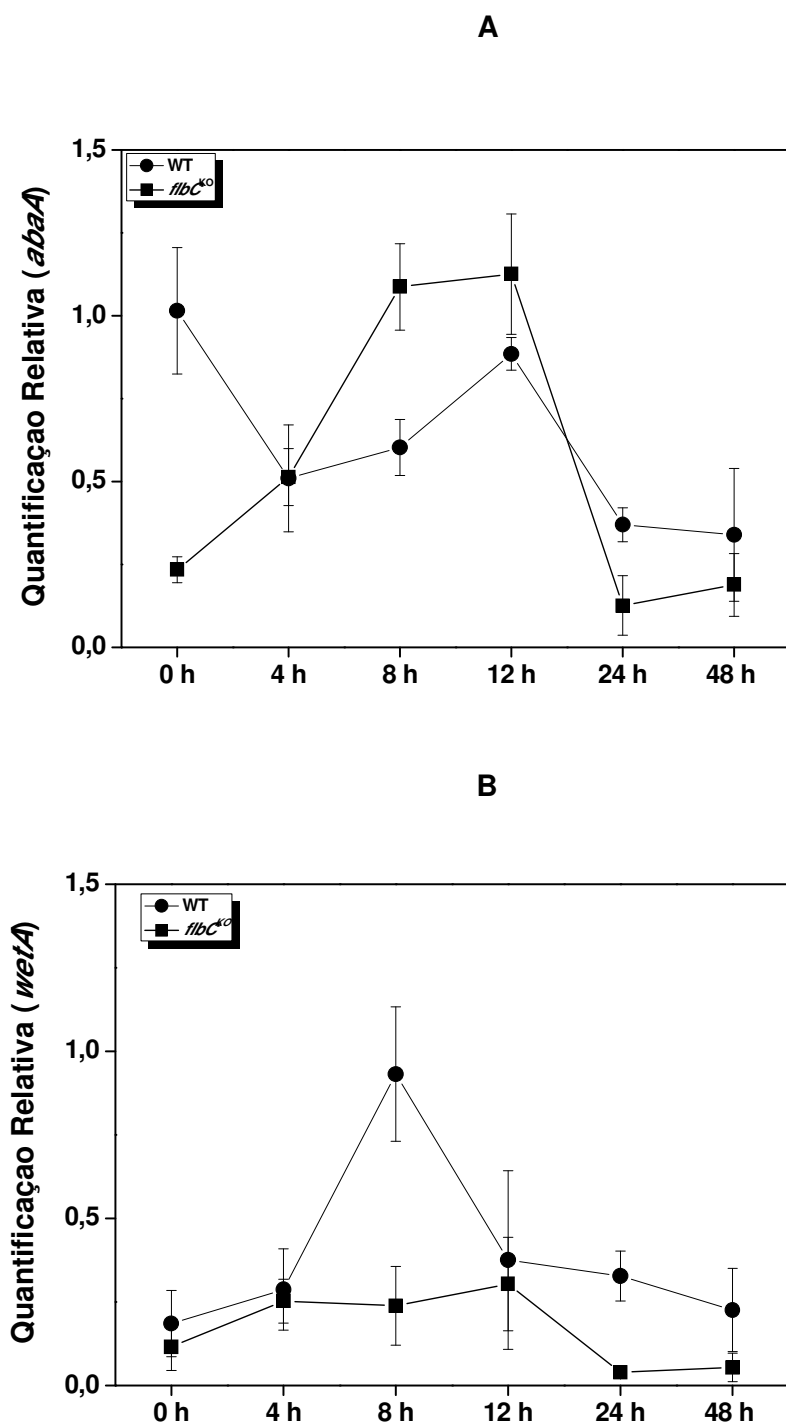


Figura 37– Análise da expressão dos genes *abaA-like* e *wetA-like* nas linhagens selvagem e *flbC^{KO}* por qPCR após a indução do desenvolvimento assexual. Amostras miceliais expostas à luminosidade e temperatura ambiente em diferentes tempos após o crescimento em meio VM líquido por 20 h. Extração de RNA das amostras realizada como descrito por SOKOLOVSKY *et al.* (1990). Síntese de cDNA realizada por RT-PCR. **(A)** Expressão do gene *abaA-like*. **(B)** Expressão do gene *wetA-like*. Os valores apresentados foram normalizados em relação ao tempo de 0 h.

Com base nos dados obtidos nas análises de expressão gênica e mobilidade em gel, foi proposto um modelo para a cascata de conidiação do fungo *N. crassa*, apresentada na Figura 38, o qual sugere uma regulação positiva do gene *wetA-like* pelo fator de transcrição FLBC, enquanto que o gene *abaA-like* sofre repressão na presença de FLBC. Analogamente à cascata descrita por Tao and Yu (2011), a qual descreve um decaimento nos níveis do transcrito *AfuvosA* nas linhagens mutantes *AfuabaA*^{KO} e *AfuwetA*^{KO}, nós hipotetizamos que o gene *vosA* possa ser regulado por ABAA-like e/ou WETA-like no fungo *N. crassa*.

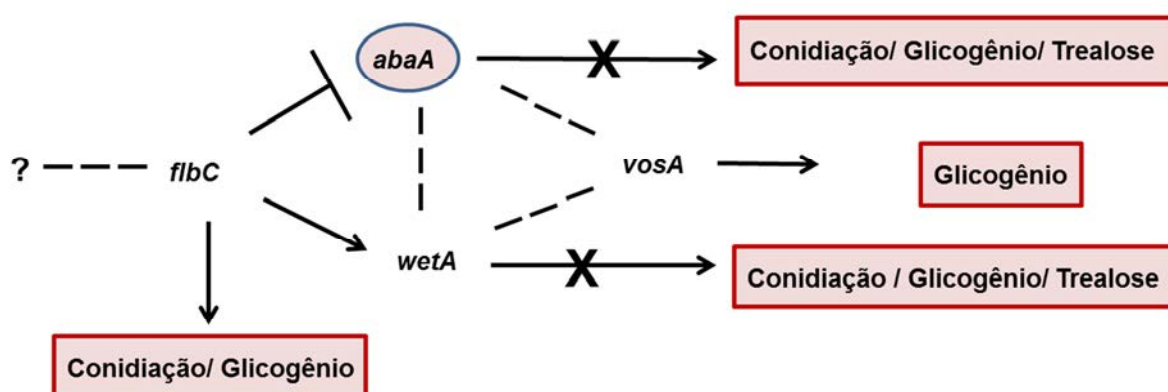


Figura 38- Modelo proposto para a interação genética entre os genes *flbC*, *vosA*, *wetA* e *abaA* e conidiação no fungo *N. crassa*.

Principais Conclusões

As principais conclusões deste trabalho foram:

A proteína FLBC de *N. crassa* participa do processo de desenvolvimento do fungo, atuando na morfologia e extensão apropriada das hifas e também no processo de conidiação do fungo. Linhagem mutante do fungo não conidia após exposição a luz. Análises de expressão gênica mostraram níveis elevados do transcrito *flbC* durante o crescimento vegetativo do fungo e após a indução do desenvolvimento assexuado, resultados esses que comprovam a participação da proteína no processo de desenvolvimento do fungo.

A deleção do gene *flbC* causa uma desregulação no acúmulo de carboidratos de reserva durante o crescimento vegetativo do fungo, apresentando níveis elevados de glicogênio e trealose. A alteração no conteúdo de glicogênio, muito provavelmente seja consequência da regulação sobre os genes *gpn* (codifica para a glicogênio fosforilase) e *gdn* (codifica para a enzima desramificadora), cujas expressões foram alteradas na linhagem mutante *flbC*^{KO}. Além disso, foi demonstrado que a proteína FLBC se liga *in vitro*, de maneira específica, aos promotores de ambos genes.

Genes homólogos a *abaA* e *wetA* de *A. nidulans* foram identificados no genoma de *N. crassa*. Tais genes são regulados por FlbC em *A. nidulans* e fazem parte de uma cascata de genes reguladores da conidiação. Em *N. crassa*, os genes homólogos são também regulados por FLBC, entretanto, parecem não regular o processo de conidiação uma vez que ambas linhagens mutantes conidiam quando expostas a luz.

A proteína FLBC foi capaz de se ligar *in vitro* especificamente à região promotora dos genes *abaA-like* e *wetA-like*, confirmando que são controlados por FLBC.

Análises morfológicas das linhagens mutantes *abaA*^{KO} e *wetA-like*^{KO} mostraram que estas não apresentam alterações significativas na morfologia das hifas e na viabilidade celular, com exceção da linhagem *wetA-like*^{KO}, a qual apresenta viabilidade dos conídios superior à linhagem selvagem.

A análise do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes mostrou um perfil alterado em relação ao apresentado pela linhagem selvagem, mostrando que estas proteínas atuam na regulação do metabolismo do carboidrato.

Referências

REFERÊNCIAS

- 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.
- ADAMS, T. H.; HIDE, W. A.; YAGER, L. N.; LEE, B. N. Isolation of a gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 9, p. 3827-3833, Sept. 1992.
- ALONSO, M. D.; LOMAKO, J.; LOMAKO, W. M.; WHELAN, W. J. A new look at the biogenesis of glycogen. **FASEB J.**, v. 9, n. 12, p. 1126-1137, Sept. 1995.
- ANDRIANOPOULOS, A.; TIMBERLAKE, W. E. ATTS, a new and conserved DNA binding domain. **Plant Cell**, v. 3, n. 8, p. 747-747, Aug. 1991.
- ANDRIANOPOULOS, A.; TIMBERLAKE, W. E. The *Aspergillus nidulans* *abaA* gene encodes a transcriptional activator that acts as a genetic switch to control development. **Mol. Cell. Biol.**, v. 14, n. 4, p. 2503-2515, Apr. 1994.
- BAILEY, L. A.; EBBOLE, D. J. The fluffy gene of *Neurospora crassa* encodes a Gal4p-type C6 zinc cluster protein required for conidial development. **Genetics**, v. 148, n. 4, p. 1813-1820, Apr. 1998.
- BAYRAM, O.; BRAUS, G. H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, n. 1, p. 1-24, Jan. 2012.
- BAYRAM, O. S.; BAYRAM, O.; VALERIUS, O.; PARK, H. S.; IRNIGER, S.; GERKE, J.; NI, M.; HAN, K. H.; YU, J. H.; BRAUS, G. H. LaeA control of velvet family regulatory proteins for light-dependent development and fungal cell-type specificity. **PLoS Genet.**, v. 6, n.12, Dec. 2010. Artigo e1001226. Disponível em: <www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.1001226>. Acesso em: 23 jan. 2014.
- 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.
- BERTOLINI, M. C.; FREITAS, F. Z.; PAULA, R. M. de; CUPERTINO, F. B.; GONÇALVES, R. D. Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa*. In: WITZANY, G. **Biocommunication of fungi**. Dordrecht: Springer Science, 2012. Cap. 2, p. 39-56.
- BOBROWICZ, P.; PAWLAK, R.; CORREA, A.; BELL-PEDERSEN, D.; EBBOLE, D. J. The *Neurospora crassa* pheromone precursor genes are regulated by the mating type locus and the circadian clock. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 3, p. 795-804, Aug. 2002.
- BRADEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.
- BÜRGLIN, T. R. The TEA domain: a novel, highly conserved DNA-binding motif. **Cell**, v. 66, n. 1, p. 11-12, July 1991.
- BURKHARD, P.; STETEFELD, J.; STRELKOV, S. V. Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. **Trends Cell Biol.**, v. 11, n. 2, p. 82-88, Feb. 2001.

CAMPBELL, S.; INAMDAR, M.; RODRIGUES, V.; RAGHAVAN, V.; PALAZZOLO, M.; CHOVNICK, A. The scalloped gene encodes a novel, evolutionarily conserved transcription factor required for sensory organ differentiation in *Drosophila*. **Genes Dev.**, n. 3, p. 367-379, Mar. 1992.

COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEIS, R. L.; BORKOVICH, K. A.; DUNLAP, J. C. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, n. 27, p. 10352-10357, June 2006.

COPPIN, E. The fle1 gene encoding a C2H2 zinc finger protein co-ordinates male and female sexual differentiation in *Podospira anserina*. **Mol. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 1255-1268, Mar. 2002.

CORROCHER, F. A. **Caracterização funcional de fatores de transcrição hipotéticos de *Neurospora crassa***. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. *Neurospora*: a model of model microbes. **Nat. Rev. Genet.**, v. 3, n. 5, p. 397-403, May 2002.

DUNLAP, J. C.; BORKOVICH, K. A.; HENN, M. R.; TURNER, G. E.; SACHS, M. S.; GLASS, N. L.; McCLUSKEY, K.; PLAMANN, M.; GALAGAN, J. E.; BIRREN, B. W.; WEISS, R. L.; TOWNSEND, J. P.; LOROS, J. J.; NELSON, M. A.; LAMBREGHTS, R.; COLOT, H. V.; PARK, G.; COLLOPY, P.; RINGELBERG, C.; CREW, C.; LITVINKOVA, L.; DeCAPRIO, D.; HOOD, H. M.; CURILLA, S.; SHI, M.; CRAWFORD, M.; KOERHSEN, M.; MONTGOMERY, P.; LARSON, L.; PEARSON, M.; KASUGA, T.; TIAN, C.; BAŞTÜRKMEN, M.; ALTAMIRANO, L.; XU, J. 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.; SACHS, M. S. A rapid and simple method of isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. **Fungal Gen. Newslett.**, v. 37, p. 17-18, 1990.

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

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.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L. J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; KINSEY, J. A.; BRAUN, E. L.; ZELTER, A.; SCHULTE, U.; KOTHE, G. O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.; MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D. D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DESOUSA, C. P.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M. S.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GONÇALVES, R. D.; CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; LUCHESSI, A. D.; BERTOLINI, M. C. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 10, n. 11, p. M111.007963/1-007963/13, July 2011.

GREENWALD, C. J.; KASUGA, T.; GLASS, N. L.; SHAW, B. D.; EBBOLE, D. J.; WILKINSON, H. H. Temporal and spatial regulation of gene expression during asexual development of *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 186, n. 4, p. 1217-1230, Dec. 2010.

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

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

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

IVEY, F. D.; HODGE, P. N.; TURNER, G. E.; BORKOVICH, K. A. The G alpha i homologue gna-1 controls multiple differentiation pathways in *Neurospora crassa*. **Mol. Biol. Cell.**, v. 7, n. 8, p. 1283-1297, Aug. 1996.

JACOBSON, D. J. *Neurospora* in temperate forests of western North America. **Mycologia**, v. 96, n. 1, p. 66-74, 2004.

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

KIM, H.; BORKOVICH, K. A. A pheromone receptor gene, pre-1, is essential for mating type-specific directional growth and fusion of trichogynes and female fertility in *Neurospora crassa*. **Mol. Microbiol.**, v. 52, n. 6, p. 1781-1798, June 2004.

KIM, H.; METZENBERG, R. L.; NELSON, M. A. Multiple functions of *mfa-1*, a putative pheromone precursor gene of *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 987-999, Dec. 2002.

KIM, H.; HAN, K.; KIM, K.; HAN, D.; JAHNG, K.; CHAE, K. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 37, n. 1, p. 72-80, Oct. 2002.

KWON, N. J.; GARZIA, A.; ESPESO, E. A.; UGALDE, U.; YU, J. H. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. **Mol. Microbiol.**, v. 77, n. 5, p. 1203-10219, Sept. 2010.

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.

LALOUX, I.; DUBOIS, E.; DEWERCHIN, M.; JACOBS, E. TEC-1, a gene involved in the activation of Tyl and Tyl-mediated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and molecular analysis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, n. 7, p. 3541-3550, July 1990.

LI, D.; BOBROWICZ, P.; WILKINSON, H. H.; EBBOLE, D. J. A mitogen-activated protein kinase pathway essential for mating and contributing to vegetative growth in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 170, n. 3, p. 1091-1104, July 2005.

LI, L.; WRIGHT, S. J.; KRYSTOFOVA, S.; PARK, G.; BORKOVICH, K. A. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi. **Annu. Ver. Microbiol.**, v. 61, p. 423-452, 2007.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LUPAS, A. Coiled coils: new structures and new functions. **Trends Biochem Sci.**, v. 21, n. 10, p. 375-382, Oct. 1996.

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, Feb. 1999.

MARSHALL, M. A.; TIMBERLAKE, W. E. *Aspergillus nidulans wetA* activates spore-specific gene expression. **Mol. Cell. Biol.**, v. 11, n. 1, p. 55-62, Jan. 1991.

MATSUYAMA, S. S.; NELSON, R. E.; SIEGEL, R. W. Mutations specifically blocking differentiation of macroconidia *Neurospora crassa*. **Dev. Biol.**, v. 41, n. 2, p. 278-287, Dec. 1974.

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

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2008.

NEVES, M. J.; JORGE, J. A.; FRANÇOIS, J. M.; TERENCE, H. F. Effects of heat shock on the level of trehalose and glycogen, and the induction of thermotolerance in *neurospora crassa*. **FEBS Lett.**, v. 283, p. 19-22, 1991.

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.

NI, M.; YU, J. H. A novel regulator couples sporogenesis and trehalose biogenesis in *Aspergillus nidulans*. **PLoS One**, v. 2, n. 10, Oct. 2007. Artigo e970. Disponível em: <www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0000970>. Acesso em: 22 jan. 2014.

NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 33, p. 12248-12253, 2004.

NOVENTA-JORDÃO, M. A.; LOURDES, M. de; POLIZELI, T. M.; BONINI, B. M.; JORGE, J. A.; TERENCE, H. F. 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.

OLMEDO, M.; RUGER-HERREROS, C.; CORROCHANO, L. M. Regulation by blue light of the *fluffy* gene encoding a major regulator of conidiation in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 184, n. 6, p. 651-658, Mar. 2010.

OLMEDO, M.; RUGER-HERREROS, C.; LUQUE, E. M.; CORROCHANO, L. M. A complex photoreceptor system mediates the regulation by light of the conidiation genes *con-10* and *con-6* in *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Biol.**, v. 47, n. 4, p. 352-363, Apr. 2010.

PARK, H. S.; YU, J. H. Genetic control of asexual sporulation in filamentous fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 15, n. 6, p. 669-677, Dec. 2012.

PAULA, R. M. de; AZZARITI, P. C.; TERENCE, H. F.; BERTOLINI, M. C. 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.

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.

RAJU, N. B. *Neurospora* as a model fungus for studies in cytogenetics and sexual biology at Stanford. **J. Biosci.**, v. 34, n. 1, p. 139-59, Mar. 2009.

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

SCHULTE, U.; BECKER, I.; MEWES, H. W.; MANNHAUPT, G. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, v. 94, n. 1, p. 3-13, Mar. 2002.

SMITH, K. M.; SANCAR, G.; DEKHANG, R.; SULLIVAN, C. M.; LI, S.; TAG, A. G.; SANCAR, C.; BREDEWEG, E. L.; PRIEST, H. D.; McCORMICK, R. F.; THOMAS, T. L.; CARRINGTON, J. C.; STAJICH, J. E.; BELL-PEDERSEN, D.; BRUNNER, M.; FREITAG, M. Transcription factors in light and circadian clock signaling networks revealed by genomewide mapping of direct targets for *Neurospora* white collar complex. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 10, p. 1549-56, Oct. 2010.

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

- 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.
- TAO, L.; YU, J. H. AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. **Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 313-326, Feb. 2011.
- 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.
- TURIAN, G.; OULEVEY, N.; TISSOT, F. Preliminary studies on pigmentation and ultrastructure of microconidia of *Neurospora crassa*. **Neurospora Newslett.**, v. 11, p. 17, 1967.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiol. Genet. Bull.**, v. 13, p. 42-43, Feb. 1956.
- WANG, T. Y.; HE, F.; HU, Q. W.; ZHANG, Z. A predicted protein-protein interaction network of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Mol. BioSyst.**, v. 7, p. 2278-2285, Apr. 2011.
- WESTERGARD, M.; MITCHELL, H. K. A syntethic medium favoring sexual reproduction. **J. Bot.**, v. 34, p. 573-577, 1947.
- WIESER, J.; LEE, B. N.; FONDON III, J. W.; ADAMS, T. H. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*. **Cur. Gen.**, v. 27, n. 1, p. 62-69, Dec. 1994.
- XIAO, J. H.; DAVIDSON, I.; MATTHES, H.; GARNIER, J. M.; CHAMBON, P. Cloning, expression, and transcriptional proper- ties of the human enhancer factor TEF-1. **Cell Press**, v. 17, n. 4, p. 551-568, May 1991.
- YANG, Q.; POOLE, S. I.; BORKOVICH, K. A. A G-protein beta subunit required for sexual and vegetative development and maintenance of normal G alpha protein levels in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 3, p. 378-390, June 2002.
- 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.