

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Proteínas quinases de *Neurospora crassa* envolvidas na
regulação do metabolismo de glicogênio. Identificação das
prováveis quinases que fosforilam a enzima glicogênio
sintase**

Aluno: Thiago de Souza Candido

Orientadora: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

2012

THIAGO DE SOUZA CANDIDO

**Proteínas quinases de *Neurospora crassa* envolvidas na
regulação do metabolismo de glicogênio. Identificação das
prováveis quinases que fosforilam a enzima glicogênio
sintase**

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: **Profa. Dr. Maria Célia Bertolini**

**ARARAQUARA
2012**

Dados curriculares

Thiago de Souza Candido

1. Dados pessoais

Filiação: Carlos Limdeberg Candido e Maria Tereza Coelho de Souza

Nascimento: 16 de julho de 1987- Ribeirão Preto, SP, Brasil

Documento de Identidade: 43.324.610-8

Cadastro de Pessoa Física: 350.075.628-07

Endereço Pessoal: Rua Carlos Gomez, 772 ap.6, Jd. Nova América

CEP: 14.800-270, Araraquara, SP

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara, UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni, 55, 14.800-900, Araraquara, SP

Profissão: Biomédico

2. Formação Acadêmica

2010-2012: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Química, UNESP, Araraquara

Título: Proteínas quinases de *Neurospora crassa* envolvidas na regulação do metabolismo de glicogênio. Identificação das prováveis quinases que fosforilam a enzima glicogênio sintase

Orientador: Maria Célia Bertolini

2006-2009: Graduação em Biomedicina, Centro Universitário de Araraquara - UNIARA, São Paulo, Brasil.

3. Atividades de Pesquisa

3.1. Manuscrito em preparação

Candido, T. S., Felicio, A. P., Carvalho, A. C. G. V., Freitas, F. Z., Bertolini, M. C. Putative protein kinases affecting glycogen accumulation and glycogen synthase phosphorylation status in *Neurospora crassa*.

3.2. Trabalhos apresentados em congressos

CANDIDO, T. S., CARVALHO, A. C. G. V, FREITAS, F. Z., BERTOLINI, M. C. Identification of Protein Kinases Regulating Glycogen Metabolism in *Neurospora crassa*. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu, 2011.

CANDIDO, T. S., FREITAS, F. Z., BERTOLINI, M. C. The *Neurospora crassa* ORF NCU08772 Encodes a Putative *Saccharomyces cerevisiae* Cyclin Pcl10-like Protein, the PHO85 Protein Kinase Partner in Glycogen Metabolism Regulation In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu 2012.

FELICIO, A. P., CANDIDO, T. S., FREITAS, F. Z., BERTOLINI, M. C. Putative Protein Kinases Regulating Glycogen Metabolism in *Neurospora crassa* Through Glycogen Synthase Phosphorylation In: XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu 2012.

3.3. Participação em eventos

SBBq – XLI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu – PR, 2012.

SBBq – XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu – PR, 2011.

*Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Tereza
Por todo amor, carinho, apoio e incentivo*

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a professora Maria Célia Bertolini pela oportunidade concedida, por todo apoio oferecido durante a realização deste trabalho e pelos ensinamentos acadêmicos e para a vida que me foram concedidos. Agradeço meus amigos de laboratório e de departamento Carol, Susilaine, Eliane, Fernanda, Stela, Rodrigo, Erick, Heloisy, Flávia e Mauro que foram muito presentes, atenciosos e essenciais para execução deste trabalho. Agradeço especialmente a pós-doutoranda Ana Paula, que de forma muito atenciosa, me transmitiu as técnicas de proteômica e a pós-doutoranda Fernanda Zanolli que durante todo meu trabalho me co-orientou de maneira muito presente e efetiva.

Agradeço o corpo técnico dos laboratórios do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química Fátima, Waldenir, Fernando, Zilda e especialmente ao Tarcísio sempre solícito para nos ajudar no desenvolvimento dos trabalhos realizados.

Gostaria de agradecer também meus amigos Luiz Otavio, Luiz Cláudio e Gabriel pelos momentos de descontração para que eu pudesse recarregar as energias, sempre que necessário, para a execução deste trabalho.

E um agradecimento mais que especial a minha mãe que sempre me apoiou e acreditou em meu potencial profissional.

E a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro concedido ao laboratório para a realização deste trabalho.

" A satisfação está no esforço e não apenas na realização final"

Mahatma Gandhi

Lista de Abreviaturas

2D-PAGE: eletroforese bidimensional

AMP: monofosfato de adenosina

ATP: trifosfato de adenosina

BOD: *biochemical oxygen demand*

BSA: Albumina bovina sérica

CHAPS: 3 - [(3-colamidopropil) dimetilamônio]-1-propanossulfonato

C-terminal: região carboxi-terminal da proteína

cpm: cintilações por minuto

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxiribonucléico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FGSC: *Fungal Genetics Stock Center*

FT: *flow through*

G1P: glicose-1-fosfato

G6P: glicose-6-fosfato

GS: glicogênio sintase

GSN: glicogênio sintase do fungo *Neurospora crassa*

GTP: trifosfato de guanosina

HEPES: ácido N-(2-hidroxietilo)-piperazina-N'-2-etanesulfônico

IPTG: isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo

kb: kilobase

KCl: cloreto de potássio

kDa: kilodalton

Mb: megabases

NaCl: cloreto de sódio

NaF: fluoreto de sódio

NADPH: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*

N-terminal: região amino terminal da proteína

ORF: *Open Reading Frame*

pb: pares de base

PCR: Polimerase Chain Reaction

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RIP: *Repeat Induced Point Mutation*

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SDS: Dodecil sulfato de sódio

STRE: *Stress responsive element*

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

TCA: ácido tricloroacético

TLCK: N α -p-tosil-L-lisina-clorometilcetona hidrocloreto

Tris: hidroximetilaminometano

UDP: uracil-difosfato

V: Volts

VM: Meio mínimo de Vogel

WT: *wild-type*

Sumário

RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	16
1. O fungo <i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudo	17
2. Uma visão geral sobre o metabolismo do glicogênio	21
3. Regulação da enzima glicogênio sintase por fosforilação	24
4. Proteínas quinases	27
OBJETIVOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS	33
1. Linhagens utilizadas	34
1.1. <i>Neurospora crassa</i>	34
1.2. <i>Escherichia coli</i>	35
2. Meio de cultivo para <i>Neurospora crassa</i>	36
3. Propagação das linhagens, obtenção dos conídios e preparo das culturas permanentes	36
4. Choque térmico	37
5. Preparo de extrato celular bruto e determinação do conteúdo de glicogênio	37
6. Ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase de <i>N. crassa</i>	38
7. Identificação das isoformas fosforiladas da enzima GSN por <i>Western blot</i>	38
7.1. Extração das proteínas totais para a eletroforese bidimensional	38
7.2. Separação por eletroforese bidimensional	39
7.3. <i>Western blot</i>	40
8. Clonagem das ORFs NCU07580 e NCU08772 por RT-PCR	40
8.1. Extração de RNA total	41
8.2. Clonagem por RT-PCR	41
9. Mini-extração de DNA plasmidial	42
10. Preparo e transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	43
11. Ensaios de produção das proteínas recombinantes	43
11.1. Subclonagem das ORFs no vetor de expressão	43
11.2. Ensaio de indução e análise de solubilidade	44
11.3. Análise da expressão das proteínas recombinantes por <i>Western blot</i>	45
12. Purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU07580	46
13. Purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU08772	47
RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
1. Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes	50
2. Dosagem da atividade da enzima glicogênio sintase nas linhagens selecionadas	54
3. Análise das isoformas fosforiladas da enzima GSN	56
4. Clonagem das ORFs NCU07580 e NCU08772 e subclonagem em vetores de expressão	59

5. Ensaios de produção e análise de solubilidade das proteínas recombinantes	61
6. Purificação da proteína recombinante Pho85- <i>like</i>	62
7. Purificação da proteína recombinante Pcl10- <i>like</i>	66
CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	70

Resumo

Neste trabalho, uma coleção de linhagens mutantes de *N. crassa* em proteínas quinases foi adquirida pelo nosso laboratório e estas linhagens foram utilizadas a fim de identificar as proteínas envolvidas no controle do metabolismo do glicogênio no fungo. Estas proteínas foram anotadas como pertencentes a diferentes classes de proteínas quinases devido às características dos seus domínios quinases. Inicialmente foram identificadas as quinases que estão envolvidas no controle do metabolismo do carboidrato através da quantificação do conteúdo de glicogênio, tanto em uma situação de crescimento vegetativo (30 °C), como sob a condição de estresse térmico (45 °C). Nesta parte, as linhagens mutantes que mostraram perfis de acúmulo de glicogênio diferente da linhagem selvagem, nas condições avaliadas foram selecionadas. Posteriormente, foram realizadas quantificações de atividade da enzima glicogênio sintase de *N. crassa* (GSN), sob as mesmas condições experimentais, na presença e ausência do modulador alostérico glicose-6-fosfato (G6P). Foi verificado que a enzima GSN presente em algumas linhagens mutantes provavelmente estaria diferentemente fosforilada, quando comparada à proteína presente na linhagem selvagem. Por este motivo, uma análise das diferentes isoformas de fosforilação foi realizada em algumas das linhagens mutantes combinando os ensaios 2D-PAGE e *Western blot*. Através destas análises foi possível verificar quais proteínas quinases estão envolvidas no controle do metabolismo do glicogênio e que atuam mais especificamente na regulação por fosforilação da enzima GSN. Das 55 linhagens inicialmente utilizadas, 6 linhagens apresentaram diferenças no acúmulo de glicogênio, na atividade GSN e no estado de fosforilação da enzima GSN, quando comparadas com a selvagem. Portanto, caracterizam proteínas quinases que regulam o metabolismo através da regulação da enzima GSN. A linhagem nocauteada na ORF NCU07580 que codifica a proteína *Pho85-like* (uma proteína quinase dependente de ciclina) apresentou diferenças no conteúdo de glicogênio, aumento da relação -/+ G6P de GSN e alteração no estado de fosforilação de GSN, em relação à selvagem. Devido aos resultados obtidos, a proteína *Pho85-like* foi identificada como uma forte candidata a atuar diretamente na fosforilação da enzima GSN. Sua provável ciclina parceira (*Pcl10-like*), a qual pode direcionar para a fosforilação de GSN foi identificada através de análises de Blast. As ORFs que codificam *Pho85-like* e *Pcl10-like* foram clonadas, as proteínas foram produzidas na forma recombinante em *E. coli* e purificadas por cromatografia de afinidade para realização de ensaios de fosforilação *in vitro*, para confirmar a função desta quinase e de sua ciclina parceira na fosforilação direta de GSN.

Palavras-chave: *Neurospora crassa*, proteínas quinase, fosforilação, glicogênio.

Abstract

In this work, a collection of *N. crassa* strains mutated in genes encoding protein kinases was used to identify proteins involved in the control of glycogen metabolism in this fungus. These proteins were annotated as belonging to different classes of protein kinases due to their kinase domains. Initially, we identified the proteins involved in the metabolism control by quantifying the glycogen accumulated under vegetative growth (30 °C) and under a stress condition such as heat stress (45 °C). The mutant strains showing glycogen accumulation profiles different from the wild-type strain under the conditions evaluated were selected. The selected mutant strains were used to quantify glycogen synthase activity (GSN), under the same experimental conditions, in the presence and absence of the allosteric modulator glucose-6-phosphate (G6P). From this assays, it was observed that GSN in some mutant strains would be differently phosphorylated when compared to the enzyme present in the wild-type strain. Therefore, an analysis of the GSN phosphorylation isoforms was performed in such mutant strains by combining 2D-PAGE and Western blot. Through these analysis, it was possible to identify which protein kinases are involved in the control of glycogen metabolism and specifically act in the GSN phosphorylation. Of the 55 strains initially used six strains showed differences in the glycogen accumulation, in the GSN activity, and in the state of GSN phosphorylation, compared to the wild-type strain. Therefore, they characterize putative protein kinases that regulate glycogen metabolism by regulating the GSN enzyme. The strain knocked-out in the ORF encoding the protein PHO85-like (a cyclin-dependent protein kinase) showed differences in the glycogen content, increased +/- G6P ratio, and changes in the GSN phosphorylation state. Thus, the PHO85-like protein was identified as a strong candidate to directly phosphorylate the GSN enzyme. Its putative cyclin partner (Pcl10-like), which directs PHO85-like protein to GSN phosphorylation was identified through Blast analysis. The ORFs encoding PHO85-like and Pcl10-like proteins were cloned, produced in *E. coli* as recombinant proteins and the proteins were purified by affinity chromatography for future GSN *in vitro* phosphorylation assays.

Keywords: *Neurospora crassa*, kinase protein, phosphorylation, glycogen.

Introdução

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

Os organismos pertencentes ao reino dos fungos têm exercido um papel fundamental no avanço da compreensão dos mecanismos moleculares de organismos eucariotos, devido às suas facilidades de manipulação e o conhecimento das características genéticas e bioquímicas envolvidas em seu ciclo de vida. Este reino possui aproximadamente 1,5 milhões de espécies, sendo a maioria delas pertencente ao grupo dos fungos filamentosos (HAWKSWORTH, 2001). Estes microrganismos apresentam grande importância biotecnológica nos ramos alimentício e farmacêutico, pois são capazes de sintetizar uma grande variedade de compostos, como enzimas e antibióticos, além disso, os fungos são fundamentais para a decomposição de matéria orgânica e reciclagem de nutrientes (AZEVEDO, 1997).

Neurospora crassa é um fungo filamentoso, cujos mecanismos genéticos e bioquímicos básicos são bem compreendidos. Conhecido inicialmente nas padarias da França por “bolor laranja”, este fungo foi descrito no século XVII como contaminante comum de pães, hoje é classificado como pertencente à classe dos *Eumycetes*, subclasse *Ascomycota*, família *Sordariaceae*, subfamília *Sphaeriales* (ESSER & KUENEN, 1967). Tem nutrição simples e se desenvolve bem em meios de cultura contendo apenas alguns sais e uma fonte de carbono, sendo sua única exigência nutricional a biotina (DAVIS & SERRES, 1970).

O ciclo de vida de *N. crassa* (figura 1) compreende duas fases, uma fase vegetativa onde aparecem as estruturas denominadas conídios destinada à propagação do fungo e a fase sexual, onde se observa a presença dos corpos de frutificação (FINCHAM et al., 1979). Os conídios podem ser produzidos por duas vias distintas a macroconidiação e a microconidiação. A macroconidiação é controlada pelo ciclo circadiano e promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos, os quais se encontram localizadas nas extremidades das hifas aéreas que permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Na microconidiação, os esporos mononucleados são formados dentro das hifas basais e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa (PERKINS; TURNER; BARRY, 1976).

Sendo um fungo heterotático, *N. crassa* possui dois tipos de compatibilidade sexual, chamados de *mating type A* e *a*. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer das linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto o outro pode se comportar como “macho” exercendo a função de doador de núcleos ou “fêmea” que exerce a função de receptora de núcleos (FINCHAN et al., 1979). A fase sexual acontece quando dois micélios de tipos opostos crescem juntos (*A* e *a*), sob condições limitantes de nitrogênio. Em resposta à privação deste nutriente, são originados corpos de frutificação (protoperitécios). A fertilização ocorre quando

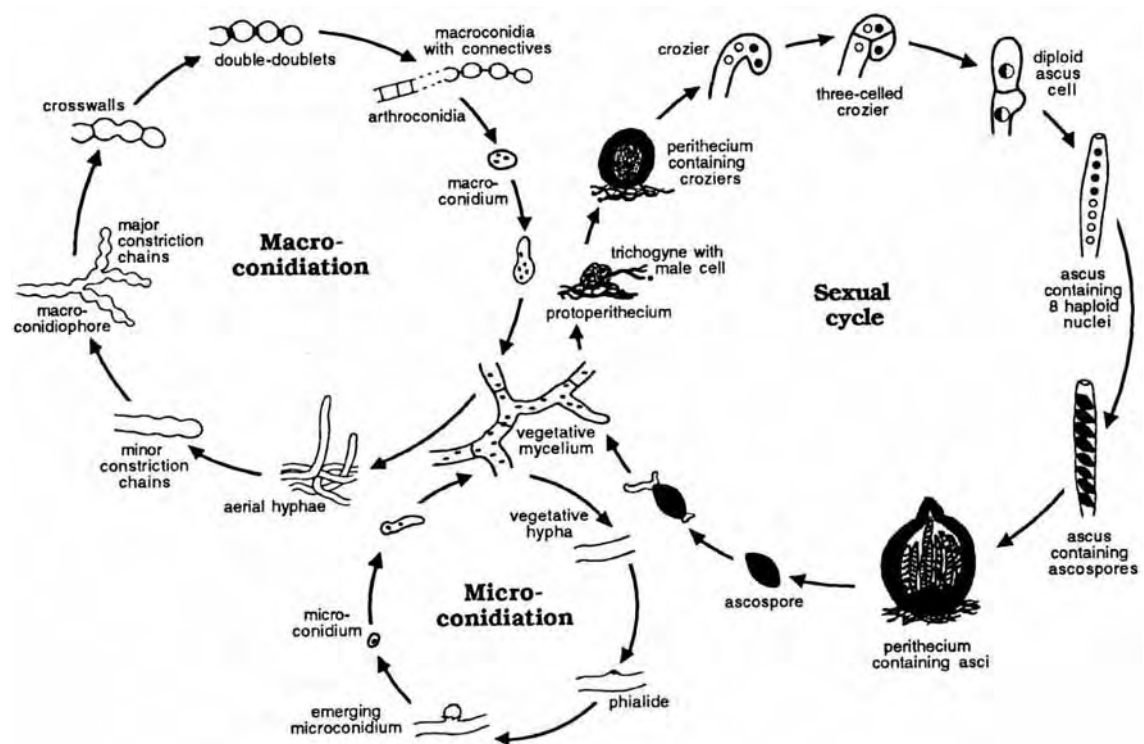


Figura 1. Ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa*. (BORKOVISH et al., 2004).

uma célula de tipo oposto, que pode ser um macroconídio, microconídio ou até mesmo um pequeno pedaço de micélio, entra em contato com o tricógino (hifa especializada para plasmogamia) presente no protoperitécio. Quando o contato acontece, ocorre plasmogamia e um ou mais núcleos da célula fertilizante migrarão através do tricógino até atingir a ascogônia. Nesse estágio ainda não ocorre fusão nuclear, mas apenas uma associação de núcleos aos pares, que começam a se dividir. O produto destas divisões resulta na formação de numerosas hifas. Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia começa a desenvolver uma espécie de parede, que vai abrigar as hifas recém-formadas originando uma estrutura denominada peritécio. Os núcleos de tipos opostos localizados na extremidade da hifa começam a se dividir, há formação de septos nesta região da hifa, com uma célula central contendo dois núcleos de tipos opostos, a qual é denominada asco inicial. Após a formação do asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haplóides. Estes quatro núcleos haplóides sofrem agora mitose, originando oito núcleos dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada tipo de acasalamento (**A** e **a**). Esses núcleos originarão esporos (ascósporos), que sob eventuais circunstâncias germinarão originando novo micélio (FINCHAN et al., 1979).

N. crassa é também um fungo que responde a uma variedade de mudanças ambientais. Os fatores mais proeminentes são a luz e a temperatura, os quais afetam o sistema circadiano do organismo. A luz é conhecida por afetar a expressão de genes que influenciam os eventos como carotenogênese e conidiação. O efeito da luz deriva de seu papel central no estado do relógio circadiano, que mesmo na ausência de luz pode influenciar na expressão de grande parte do genoma. Em relação à resposta a temperaturas, *N. crassa* apresenta uma classe de proteínas de choque térmico, as quais funcionam como chaperona que orientam e estabilizam a conformação de outras proteínas (SCHULTE et al., 2002).

O genoma de fungo está organizado em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb de tamanho (SCHUTLE et al., 2002) e foi seqüenciado por Galagan et al. (2003) revelando ser constituído por cerca de 40 Mb, muito maior se comparado com outros fungos com genomas já conhecidos como *Sacharomyces cerevisiae* e *Schizosacharomyces pombe*. *N. crassa* possui um total de 10.082 genes codificadores de proteínas que cobrem 44% do genoma, sendo que do total de genes anotados 9.200 codificam proteínas com mais de 100 resíduos (GALAGAN et al., 2003). Na época em que o genoma foi seqüenciado 41% dos genes que codificam proteínas não possuíam ortólogos conhecidos depositados nos bancos de dados, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. Além disso, 57% das proteínas de *N. crassa* não possuem relação a proteínas conhecidas de leveduras. Quando comparado com genomas conhecidos de eucariotos, 1.421 genes de *N. crassa* apresentaram as melhores correlações em relação a proteínas de plantas ou animais (GALAGAN et al., 2003), o que sugere uma relação mais estreita entre fungos filamentosos e eucariotos superiores, se comparado com

leveduras e eucariotos inferiores. O fato de *N. crassa* ser um organismo multicelular faz com que uma grande quantidade de seus genes não possua homólogos em *S. cerevisiae*, sugerindo que *N. crassa* pode ser um organismo mais adequado para a compreensão dos aspectos de regulação celular dos eucariotos superiores (DUNLAP et al., 2007). A presença de um grande número de genes no genoma de *N. crassa* ainda com funções desconhecidas aponta este organismo como um promissor modelo para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos, os quais podem possivelmente representar genes com novas funções ou novos genes desempenhando funções conhecidas de maneiras diferentes (DUNLAP et al., 2007).

Em eucariotos existem dois mecanismos de recombinação gênica, a homóloga que envolve a quebra do DNA, seguida da troca entre seqüências homólogas e a recombinação não homóloga, que envolve a ligação direta das extremidades da fita de DNA, independente da homologia. A recombinação homóloga é o mecanismo predominante em *S. cerevisiae*, representando o método mais eficiente pelo qual se pode inativar um gene de interesse. Apesar de ocorrer com muita freqüência em leveduras, o mecanismo de recombinação homóloga ocorre em raríssimas ocasiões tanto em *N. crassa* como nos demais eucariotos, dependendo do gene e do tamanho da região nucleotídica homóloga que flanqueia o gene de interesse (DUNLAP et al., 2007). Em *N. crassa*, dois processos de geração de linhagem mutantes estão bem descritas, sendo eles a mutação por RIP (*Repeat Induced Point Mutation*) e a técnica de *knockout*. A inativação por RIP baseia-se na introdução de uma cópia extra do gene alvo no fungo. Os transformantes, contendo uma cópia adicional do gene, introduzem mutações pontuais na seqüência genômica quando submetidos ao cruzamento seguido de meiose (SELKER, 1990). Esta técnica foi bastante utilizada no passado, e embora seja um método útil e eficaz, demanda muito tempo para ser desenvolvido.

O procedimento de *knockout* baseia-se no mecanismo de recombinação homóloga, onde ocorre a troca do gene alvo por outro a partir das extremidades de seqüências homólogas e foi mais recentemente padronizado para *N. crassa* (NINOMIYA et al., 2004). Na recombinação não-homóloga, o DNA exógeno é integrado em qualquer região do genoma, sendo um mecanismo conservado evolutivamente em humanos, plantas e insetos. Dentre as proteínas envolvidas nesse processo, destacam-se as proteínas Ku70 e Ku80, as quais formam um heterodímero que se liga nas extremidades do DNA, compondo um complexo de reparação das fitas (WALKER; CORPINA; GOLDBERG, 2001). As proteínas Ku70 e Ku80 são conservadas tanto em leveduras quanto em humanos, e em *N. crassa*, seus homólogos foram nomeados como *mus-51* e *mus-52*, respectivamente. Dessa forma, Ninomiya et al. (2004) desenvolveram um procedimento, baseado em PCR, para a inativação desses genes e, desta maneira, construir linhagens de *N. crassa* nas quais o processo de recombinação não-homóloga é bloqueado, favorecendo a recombinação homóloga. A técnica de *knockout* permitiu

a construção de linhagens mutantes de *N. crassa* nos genes codificadores de proteínas. Atualmente, tais linhagens encontram-se depositadas no *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA) e estão disponíveis para a comunidade científica. Estas linhagens mutantes se tornaram um material interessante para o início dos estudos acerca dos mecanismos regulatórios envolvidos em um determinado processo celular e, em nosso laboratório, algumas coleções de linhagens vem sendo utilizadas para investigar os mecanismos moleculares que participam na regulação do metabolismo de glicogênio.

2. Uma visão geral sobre o metabolismo do glicogênio

O glicogênio é a principal forma de armazenamento de carboidratos em diferentes tipos de células e sempre que necessário é degradado para a produção de energia. Este polissacarídeo encontra-se amplamente distribuído na natureza, desde bactérias até o ser humano. Esta molécula é uniforme e compacta, onde os resíduos de glicose são unidos covalentemente por meio de ligações glicosídicas α -1,4, as quais são responsáveis pela formação de sua cadeia linear; e por ligações glicosídicas α -1,6, que formam as ramificações do polímero. (ROACH, 2002).

A síntese do glicogênio (figura 2) é bem conservada nos eucariotos sendo que existem três proteínas envolvidas na biossíntese deste polissacarídeo: (i) a glicogenina, uma proteína auto-glicosilável que funciona como uma molécula iniciadora para o início da biossíntese do glicogênio; (ii) a glicogênio sintase (GS) que catalisa a extensão da cadeia pela formação das ligações α -1,4 lineares da molécula e (iii) a glicosil-(4 $\rightarrow$ 6)-transferase que catalisa as ligações α -1,6 ramificadas (BERTOLINI et al., 2012).

Uma vez dentro da célula, a glicose é convertida em glicose-6-fosfato (G6P), numa reação catalisada pela hexoquinase. A G6P pode participar da glicólise para produção de energia via fermentação ou oxidação, também pode seguir para o ciclo das pentoses para produção de pentoses e equivalentes redutores (NADPH), ou então, ser convertida em glicogênio e servir como reserva de unidades de glicose. Na síntese do glicogênio, G6P é primeiramente transformada em glicose-1-fosfato (G1P) pela enzima fosfoglicomutase, a qual serve como substrato para a produção de UDP-glicose pela ação da UDP-glicose pirofosforilase. Dessa forma, as moléculas de UDP-glicose se tornam doadoras diretas de resíduos de glicose para a síntese inicial do glicogênio, a qual envolve a ação da enzima glicogenina, assim como para o processo de alongação, efetuado pela enzima glicogênio sintase. A síntese global se completa pela atuação da enzima ramificadora, a qual transfere um

fragmento de seis a sete resíduos de glicose da cadeia nascente para pontos de ramificação (BERTOLINI et al., 2012).

O processo contrário à biossíntese, ou seja, a degradação do glicogênio é realizado pela enzima glicogênio fosforilase que desfaz as ligações glicosídicas α -1,4 lineares por meio de uma reação de fosforólise, e isto leva ao encurtamento do polímero e o resíduo terminal de glicose é removido da molécula como G1P. A “desramificação” é catalisada pela enzima oligo (1,6) $\rightarrow$ (1,4) glicotransferase (ou enzima desramificadora) que remove o resíduo de glicose α (1 $\rightarrow$ 6), resultando num polímero linear que será novamente substrato para a enzima fosforilase. Os resíduos de G1P, produtos finais da degradação do glicogênio, são novamente convertidos em G6P que podem ser usados na glicólise (BERTOLINI et al., 2012). As duas principais enzimas envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio são a glicogênio sintase que catalisa a etapa regulatória na síntese e a glicogênio fosforilase que catalisa a etapa regulatória na quebra da molécula de glicogênio. Essas enzimas são reguladas por alosterismo e por modificação covalente, via fosforilação pela ação de proteínas quinases.

Uma vez fosforilada a enzima GS tem a sua atividade diminuída, esta regulação ocorre de acordo com a quantidade de sítios de fosforilados. Além de modificação pós-traducionais sua atividade é regulada também pela ação da G6P, que atua como um modulador alostérico, tornando a enzima novamente ativa mesmo fosforilada. Sendo assim, a atividade medida na ausência e na presença deste modulador (-/+ G6P) serve como um índice cinético do estado de fosforilação da enzima. Este índice varia de valores muito baixos (o que correlaciona a uma proteína altamente fosforilada) até valores ao redor de 0,9 representando formas da proteína completamente desfosforiladas. Além disso, a atividade na presença de G6P é diretamente proporcional à concentração da enzima. Já a glicogênio fosforilase é regulada de maneira reversa, quando desfosforilada a enzima se encontra inativa. Na ausência de fosforilação e na presença de seu modulador alostérico AMP a enzima se encontra ativa novamente (BERTOLINI et al., 2012).

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

No fungo *N. crassa*, organismo onde o metabolismo do glicogênio vem sendo estudado de maneira detalhada em nosso laboratório, Noventa-Jordão et al. (1996) e De Paula et al.

(2002) demonstraram que durante a situação de crescimento vegetativo do fungo, o glicogênio é acumulado nas células no final da fase exponencial de crescimento e que o mesmo é degradado quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento. Entretanto, células do fungo submetidas a diferentes condições de cultivo também apresentam variações no conteúdo de glicogênio. Em situações como a indução de uma cultura do fungo a conidiação, os níveis de glicogênio apresentam-se drasticamente reduzidos (DE PAULA et al. 2002). Quando submetidas a uma situação adversa como choque térmico, as células de *N. crassa* mostraram degradar glicogênio e acumular trealose, sendo que exatamente o oposto é observado quando as células são re-incubadas na temperatura fisiológica de crescimento (NOVENTA-JORDÃO et al., 1996). Com essas análises fenotípicas estabelecidas é de suma importância desvendar quais proteínas atuam na regulação dessas modificações.

3. Regulação da enzima glicogênio sintase por fosforilação

As enzimas glicogênio sintases, além de serem reguladas alostericamente pela glicose-6-fosfato, possuem diversos sítios de fosforilação os quais funcionam como alvos para as enzimas quinases. As enzimas melhor caracterizadas em relação aos sítios de fosforilação são as sintases de músculo de coelho e de *S. cerevisiae* (figura 3). A enzima de músculo de coelho possui nove sítios de fosforilação, sendo dois N-terminais e sete C-terminais, designados de 1a, 1b, 2, 2a, 3a, 3b, 3c, 4 e 5 (ROACH, 1990). Enquanto os sítios 2 e 2a (Ser⁷ e Ser¹⁰) encontram-se na extremidade N-terminal da molécula, a região C-terminal abriga um importante domínio regulatório, contendo os sítios de fosforilação restantes 3a, 3b, 3c, 4, 5, 1 e 1a (Ser⁶⁴⁰, Ser⁶⁴⁴, Ser⁶⁴⁸, Ser⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁹⁷ e Ser⁷¹⁰). A fosforilação de alguns sítios ocorre de maneira hierárquica em ambas as extremidades da molécula. O sítio 2a somente é fosforilado pela caseína quinase I (CKI) após a formação do sítio de reconhecimento -S(P)-XX-S- (FLOTOW et al., 1990), o qual é dado pela fosforilação prévia do sítio 2 por diferentes proteínas quinases. Na região C-terminal, a proteína quinase glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) fosforila sequencialmente os sítios 4, 3c, 3b e 3a (PICTON et al., 1980), sendo sua ação enzimática dependente da formação prévia do sítio de reconhecimento -S-X-X-X-S(P)- através da fosforilação do sítio 5 pela caseína quinase II (CKII) (FIOL et al, 1987). Os sítios 2, 2a, 3a e 3b são os que mais contribuem para inativação da enzima por mecanismos de fosforilação enquanto que os sítios 3a e 3b podem ser fosforilados por mecanismos independentes da fosforilação prévia do sítio 5, sem a participação da dupla GSK3/CKII (SKURAT; WANG; ROACH, 1994).

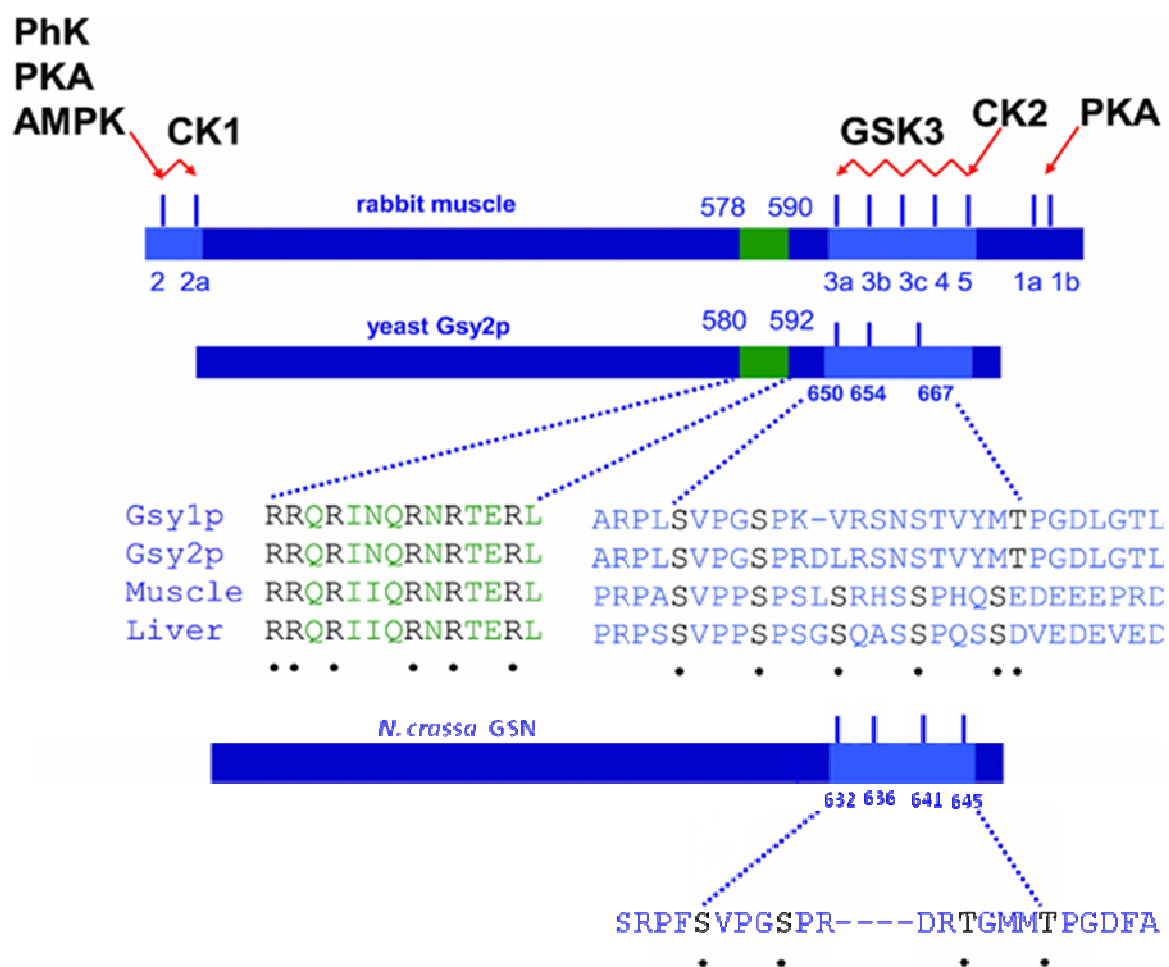


Figura 3. Características dos sítios de fosforilação da GS. Acima estão representadas as arquiteturas gerais das enzimas GS de mamíferos (*Muscle* e *Liver*) e de levedura (Gsy1p e Gsy2p). Em verde estão os polos ricos em arginina (sítio de ligação de G6P) e em azul claro estão os resíduos de serina e treonina fosforilados e conservados entre as diferentes enzimas (ROACH et al., 2012).

Comparado à enzima de músculo de coelho, a isoforma predominante Gsy2p de *S. cerevisiae* apresenta apenas os sítios C-terminais 3a, 3b e 4 (Ser⁶⁵⁰, Ser⁶⁵⁴ e Thr⁶⁶⁷), sendo conservados somente os sítios 3a e 3b (HARDY & ROACH, 1993). A proteína Pho85 foi identificada como sendo uma das quinases que controlam a atividade glicogênio sintase diretamente em *S. cerevisiae*. Mutantes no gene *pho85* apresentam uma alta atividade glicogênio sintase acompanhada de um hiperacúmulo de glicogênio. (TIMBLIN; TATCHELL; BERGMAN, 1996). Esta quinase pertence à família das proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK – Cyclin Dependent Kinase), apresentam múltiplas funções celulares e necessitam estar ligadas a uma ciclina parceira ao qual direciona o alvo a ser fosforilado. As ciclinas Pcl8p e Pcl10p interagem com Pho85p tornando-a específica para agir no metabolismo do glicogênio em *S. cerevisiae*. Foi demonstrado que o complexo quinase Pcl10-Pho85 interage e fosforila a enzima glicogênio sintase 2 (Gsy2p) (HUANG et al., 1998). A deleção destas duas ciclinas bem como do gene *PHO85*, levaram ao mesmo fenótipo de hiperacúmulo de glicogênio, assim como, a uma hiperativação da enzima Gsy2p (HUANG et al., 1998). Além das ciclinas Pcl8p e Pcl10p, um trabalho mais recente mostrou que as ciclinas Pcl6p e Pcl7p também estão envolvidas no metabolismo de glicogênio (WILSON; WANG; ROACH, 2005). A proteína Psk1p também exerce uma regulação direta na atividade da enzima glicogênio sintase. Em *S. cerevisiae* esta proteína é responsável pela regulação da síntese de proteínas na fase de tradução e atua também regulando o metabolismo de vários carboidratos (RUTTER et al., 2002). Foi observado que o duplo mutante em *S. cerevisiae* *psk1/psk2* acumula de 3 a 4 vezes mais glicogênio e trealose que a linhagem selvagem, apresentam a atividade glicogênio sintase aumentada e a proteína Psk2p fosforila diretamente a enzima glicogênio sintase *in vitro*, fazendo parte do controle do fluxo de carboidratos através de fosforilação (RUTTER et al., 2002).

Outras proteínas quinases também demonstraram estar envolvidas no processo de regulação da fosforilação da enzima GS, mas de maneira indireta neste microrganismo. A proteína quinase dependente de AMPc (PKA) também controla do estado de fosforilação da Gsy2p *in vivo* indiretamente (HARDY & ROACH, 1993). Quando a via da PKA está constitutivamente ativa a expressão da enzima Gsy2p se apresenta muito baixa e o acúmulo de glicogênio não ocorre por que a enzima se apresenta altamente fosforilada e consequentemente inativa, porém o mecanismo pela qual PKA regula a fosforilação de Gsy2p não está bem elucidado (WILSON et al., 2010). De maneira indireta a quinase Snf1p também esta envolvida na regulação do controle do metabolismo do glicogênio. Esta proteína é ortóloga à proteína quinase dependente de AMP (AMPK) de mamíferos (CARLING et al., 1994), a qual é requerida para a expressão de genes que codificam enzimas necessárias para o metabolismo de fontes de carbono alternativas, tais como glicerol e galactose. Esta quinase parece controlar de maneira indireta e positiva o metabolismo do glicogênio, provavelmente

devido à regulação do estado de fosforilação da isoforma Gsy2p, uma vez que células mutantes *snf1*, as quais se caracterizam por não acumular glicogênio (THOMPSON-JAEGER, 1991) quando transformadas com a forma truncada da enzima Gsy2p (ausência da extremidade C-terminal) são capazes de restaurar o acúmulo de glicogênio (HARDY; HUANG; ROCH, 1994). Linhagens duplo-mutante *snf1 pho85* são capazes de suprimir o acúmulo de glicogênio defectivo dos mutantes *snf1*, indicando que Snf1p e Pho85p agem antagonicamente com relação ao acúmulo de glicogênio na levedura. (WANG et al., 2001). Estudos de epistasia mostraram que estas quinases podem fazer parte de uma mesma via, onde a Snf1p estaria regulando negativamente a Pho85p na mesma via ou então, em uma via distinta. No entanto, mutantes *snf1 pcl8 pcl10* são capazes de recuperar a atividade glicogênio sintase sem, contudo, restaurar o acúmulo de glicogênio, sugerindo outras maneiras de controlar a atividade Snf1p independente da Pho85p (HUANG et al., 1998).

Em *N. crassa*, apenas os sítios C-terminais 3a, 3b, 4 e 5 da enzima de músculo de coelho estão conservados na glicogênio sintase (GSN) e correspondem aos resíduos Ser⁶³² (3a), Ser⁶³⁶ (3b), Tyr⁶⁴¹ (4) e Tyr⁶⁴⁵ (5) (DE PAULA et al., 2002). Mutações sítio-dirigidas nestes resíduos mostraram que eles são fosforilados *in vitro* (BARBOSA, 2007). Ensaios de fosforilação utilizando extratos celulares de linhagens de *N. crassa* apresentando atividade adenilato ciclase deficiente (mutantes *cr-1* ou *mcb*) demonstraram que a fosforilação da GSN é dependente em grande parte de AMPc, embora outros mecanismos de fosforilação independentes de AMPc também devam ocorrer (DE PAULA et al., 2002; FREITAS et al., 2010). Estudos posteriores a estes estão sendo realizados em nosso laboratório para identificar quais proteínas quinases realizam a fosforilação destes sítios previamente caracterizados.

4. Proteínas Quinases

As proteínas quinases são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo fosfato do ATP e, em casos excepcionais de GTP, para treonina, serina (quinase específica para serina/treonina) ou resíduos de tirosina (quinase específica para tirosina). Essas enzimas são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais (SILVA et al., 2009).

Dentre as maneiras pelas quais as vias de sinalização são capazes de controlar as respostas biológicas em um organismo, a fosforilação reversível de proteínas, catalisada por diferentes proteínas quinases e fosfatases, pode ser considerada a principal (JOHNSON, 2009). Em humanos, a fosforilação destes resíduos corresponde, respectivamente, a 86,4% em serinas, 11,8% em treoninas e 1,8% em tirosinas (OLSEN et al., 2006). As quinases podem existir nas formas ativa e inativa, as quais são reguladas por uma variedade de mecanismos incluindo fosforilação, modulação alostérica e interações proteína-proteína (JOHNSON, 2009).

A primeira demonstração de que a fosforilação atua como um mecanismo regulatório foi descrita com a ativação da glicogênio fosforilase da sua forma menos ativa (forma *b*) para sua forma ativa (forma *a*) na presença de ATP (FISCHER & KREBS, 1955). A glicogênio sintase foi a segunda enzima cujo controle por fosforilação foi descoberto e durante anos este foi considerado o principal mecanismo de regulação do metabolismo de glicogênio. Algum tempo depois, o isolamento e a purificação de uma quinase dependente de AMPc (PKA) demonstrou que os eventos de fosforilação de proteínas dentro das células eram bem mais amplos do que se imaginava (WALSH; PERKINS; KREBS, 1968).

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

A PKA altera as atividades de proteínas-alvo fosforilando grupos específicos de serina e treonina. É ativada por concentrações de AMP cíclico (AMPc) e, por isso, é também conhecida como proteína quinase dependente do AMP cíclico (PKAc). Esta enzima é formada por duas subunidades: uma reguladora (R), com alta afinidade pelo AMPc, e uma catalítica (C). Na ausência de AMPc, a subunidade C torna-se inativa pela formação de um complexo tetramérico R₂C₂. A ligação do AMPc à subunidade R induz mudanças conformacionais que resultam na dissociação da holoenzima inibida (YU et al., 2004). A PKA existe em todas as células animais e acredita-se que seja responsável pelos efeitos do AMP cíclico na maioria delas. Os substratos da PKA diferem nos diferentes tipos celulares, o que explica por que os efeitos do AMP cíclico variam tanto dependendo do tipo celular (ALBERTS et al., 2004). Em *N. crassa* está bem caracterizado o gene que codifica PKA quando comparado com a sequência de *S. cerevisiae*, ele apresenta a subunidade regulatória *mcb* e um fenótipo característico de acúmulo de AMPc quando este gene está ausente (BORKOVICH et al., 2004).

O cálcio (Ca^{2+}) é um importante sinalizador celular e, por isso, sua concentração intracelular livre é estritamente regulada. Nos mamíferos, as células contêm um grande número de proteínas que se complexam ao cálcio com diferentes afinidades e especificidades. Algumas dessas proteínas possuem baixa afinidade e atuam principalmente como “tampões”

que limitam a difusão de Ca^{2+} . Outras proteínas ligam-se ao cálcio com alta afinidade e especificidade e são responsáveis por vários eventos bioquímicos e outras proteínas são reguladas indiretamente através de um sinal de transdução. É o caso da calmodulina (CaM) que possui dois domínios globulares que contêm, cada um, dois sítios de ligação ao Ca^{2+} , ligados por uma alfa hélice flexível. A ligação com o Ca^{2+} induz uma mudança conformacional na CaM, expondo resíduos hidrofóbicos que promovem a interação do complexo Ca^{2+} /CaM com diversas proteínas, incluindo a família de serina/treonina quinases CaMK (SILVA et al., 2009). As primeiras CaMK a serem descobertas foram as quinases da cadeia leve da miosina, que ativa a contração da musculatura lisa e a fosforilase quinase, resultando na degradação do glicogênio. Muitas CaMK, contudo tem especificidade mais ampla e parecem ser responsáveis pela medição de muitos dos efeitos do Ca^{2+} nas células animais. O exemplo melhor estudado de CaMK multifuncional é o da CaMKII, encontrada em todas as células animais, especialmente no sistema nervoso. Com a ativação advinda do Ca^{2+} ela se torna ativa e se auto fosforila, continuando ativa mesmo quando os níveis de Ca^{2+} intracelular diminuem, prolongando assim a atividade quinase exercida em seus alvos (ALBERTS et al., 2004).

A PKC também é uma quinase que se liga ao Ca^{2+} , mas neste caso a ligação é direta, onde ocorre a translocação do citosol para a membrana da célula. Esta proteína é uma das três principais quinases serina/treonina e está envolvida em eventos de transdução de sinais, respondendo a estímulos específicos hormonais, neuronais e de fatores de crescimento. A família PKC inclui 12 isoformas, as quais são produtos de diferentes genes e são distribuídas em vários tecidos, demonstrando diferenças de acordo com sua localização (ALBERTS et al., 2004). Por análise de homologia de sequências foram identificadas 25 proteínas possivelmente envolvidas com as vias de sinalização que utilizam o Ca^{2+} como mediador em *N. crassa*, isto indica que este fungo apresenta uma complexa maquinaria intracelular regulada por este mediador (BORKOVICH et al., 2004).

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

de uma cascata MAPK esta na via de Hog1p de *S. cerevisiae*. Ssk2/22p (MAPKKK) ativa, fosforila Pbs2p (MAPKK) assim se tornando ativa e fosforilando Hog1p (MAPK) levando ao fenótipo de aumento da osmolaridade celular (BORKOVICH et al., 2004).

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

Em *N. crassa* foram anotados 107 genes codificadores de proteínas quinases. Destes 107, 32 foram analisados por diversos autores relacionando com algum processo celular. Nesta lista inclui-se várias denominações, classificando-as em famílias ou denotando um nome específico de acordo com sua função, alguns deles são: MAPK, PKA, PKC, checkpoint kinase 2, ATM (*Ataxia telangiectasia mutated; mus-21*) ATR (ATM e Rad3-related homologs (*mus-9*), NDR (*Nuclear Dbf2-related*) *cot-1* e *dbf-2*. Essas quinases estão envolvidas na regulação de vários processos, incluindo: crescimento celular, fusão das hifas, conidiação, desenvolvimento sexual feminino, modificações ocasionadas por estresse, reparo de danos no DNA e ciclo circadiano (PARK et al., 2011). Recentemente, Park et al. (2011) publicaram os primeiros resultados de morfologia e resistência a antimicrobianos relacionados às linhagens mutantes nos genes codificadores de proteínas quinases. Estas linhagens mutantes se tornaram um material interessante para o início dos estudos acerca dos mecanismos regulatórios das vias de sinalização reguladas por proteínas quinases em nível pós-traducional.

Objetivos

De uma maneira geral, o objetivo do trabalho foi realizar uma busca de proteínas quinases que atuam regulando o metabolismo de glicogênio no fungo *Neurospora crassa*. Para isto, uma coleção de linhagens mutantes do fungo contendo genes que codificam proteínas quinases, individualmente nocauteados foi utilizada. Especificamente, este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos:

- Avaliar o conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes. Nesta parte o conteúdo de glicogênio foi quantificado antes e após choque térmico (transferência de 30 para 45°C). É conhecido que a linhagem selvagem apresenta uma diminuição do conteúdo de glicogênio após choque térmico. O objetivo é selecionar linhagens mutantes que apresentarem perfis diferentes ao da selvagem nas duas condições experimentais utilizadas.
- Quantificar a atividade da enzima glicogênio sintase nas linhagens selecionadas. Uma vez identificadas as proteínas que atuam na regulação do metabolismo do carboidrato, o objetivo do trabalho foi identificar as prováveis proteínas que poderiam fosforilar a enzima GSN, uma vez que é uma enzima contendo múltiplos sítios de fosforilação. A medida de atividade foi realizada na presença e ausência do modulador alostérico G6P, uma vez que a relação +/- G6P é um indicativo do grau de fosforilação da enzima. Os resultados obtidos foram importantes para definir quais proteínas quinases poderiam atuar diretamente na fosforilação da enzima.
- Analisar as diferentes isoformas de fosforilação da enzima GSN das linhagens mutantes selecionadas. O objetivo foi identificar quais proteínas quinases poderiam atuar diretamente na fosforilação da enzima utilizando 2D-PAGE seguida de *Western blot* e anticorpos anti-GSN.
- Produzir em *E. coli* e purificar as proteínas PHO85-like e PCL10-like. A proteína quinase PHO-85-like foi identificada como uma provável quinase que fosforila GSN. Esta quinase atua regulando o metabolismo de glicogênio dependendo de sua ciclina parceira. Portanto, o objetivo foi clonar, produzir em *E. coli* e purificar as proteínas na forma recombinante. As proteínas purificadas serão utilizadas, futuramente, em ensaios de fosforilação *in vitro* com a enzima GSN.

Materiais e Métodos

1. Linhagens utilizadas

1.1. *Neurospora crassa*

Para realizar os estudos propostos, foi utilizada a linhagem de *N. crassa* FGSC#09718 (*mat a mus-51::bar+*) e linhagens mutantes do fungo individualmente nocauteadas em genes codificando proteínas quinases através da inserção de uma marca de seleção, as quais foram obtidas junto ao *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Essas linhagens foram submetidas ao choque térmico, e aquelas que apresentaram alteração no fenótipo para acúmulo do glicogênio, tendo como parâmetro a linhagem selvagem, foram selecionadas.

A relação das linhagens analisadas encontra-se listada na Tabela 1.

Tabela 1. Linhagens mutantes analisadas.

# FGSC	ORF	ANOTAÇÃO*
11164	NCU08346	serine/threonine protein kinase
11169	NCU02814	serine/threonine-protein kinase chk2
11170	NCU02814	serine/threonine-protein kinase chk2
11252	NCU07378	serine threonine protein kinase
11316	NCU04096	serine/threonine-protein kinase 3
11317	NCU04096	serine/threonine-protein kinase 3
11319	NCU06419	MAP kinase kinase
11322	NCU00406	protein kinase CHM1
11323	NCU00406	protein kinase CHM1
11324	NCU03894	serine/threonine-protein kinase ste-20
11326	NCU02234	MAP kinase kinase kinase
11327	NCU02234	MAP kinase kinase kinase
11338	NCU09064	conserved hypothetical protein
11433	NCU00682	serine/threonine-protein kinase PRKX
11434	NCU00682	serine/threonine-protein kinase PRKX
11523	NCU00772	serine/threonine-protein kinase 24
11479	NCU03071	MAP kinase kinase kinase SskB
11480	NCU00587	mitogen activated protein kinase kinase
11481	NCU04612	mitogen activated protein kinase kinase 2
11482	NCU02393	mitogen-activated protein kinase 2
11513	NCU06240	cAMP-dependent protein kinase type 3
11841	NCU03187	G2-specific protein kinase nimA
11989	NCU06422	conserved hypothetical protein
12000	NCU09071	serine/threonine-protein kinase cot-1
12018	NCU02751	serine/threonine-protein kinase
12019	NCU02751	serine/threonine-protein kinase
13416	NCU07280	serine/threonine-protein kinase gad8
13515	NCU09258	serine/threonine protein kinase

14065	NCU03571	serine/threonine protein kinase
14525	NCU07296	serine/threonine-protein kinase orb6
14539	NCU07580	cyclin-dependent protein kinase
15734	NCU06544	protein kinase C-like protein
16077	NCU04326	protein kinase
16736	NCU04990	protein serine/threonine kinase
16737	NCU06202	serine/threonine protein kinase
16738	NCU06249	serine/threonine protein kinase
16739	NCU09189	conserved hypothetical protein
16741	NCU01335	cell division control protein 15
17940	NCU03242	serine/threonine-protein kinase cbk1
17942	NCU04335	protein kinase
17943	NCU04335	protein kinase
17944	NCU04426	cell division protein kinase
17945	NCU04426	cell division protein kinase
17948	NCU05638	conserved hypothetical protein
17954	NCU06179	serine/threonine-protein kinase hal4
17955	NCU06230	serine/threonine protein kinase
17956	NCU06421	conserved hypothetical protein
17957	NCU06486	conserved hypothetical protein
17958	NCU06583	conserved hypothetical protein
17959	NCU06626	phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4
17961	NCU06685	protein kinase
17963	NCU07399	serine/threonine kinase 16
17964	NCU07872	protein kinase Yak1
17965	NCU07880	protein kinase
17966	NCU08177	protein kinase

*<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>

1.2. *Escherichia coli*

As linhagens de *E. coli* foram utilizadas para a amplificação dos plasmídios e para a realização dos ensaios de produção das proteínas recombinantes de *N. crassa* investigadas neste trabalho.

As linhagens utilizadas foram:

DH10 β : (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*dlacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *endA1* *recA1* *deoR* Δ (*ara,leu*)7697 *araD139* *galU* *galK* *nupG* *rpsL* λ -)

BL21(DE3) pLys-S: (F- *ompT* *hsdSB*(rB m) (DE3) pLysSRARE2 (Cam))

BL21(DE3)pLys-S Rosetta: (F- *ompT* *hsdSB*(rB m) (DE3) pLysSRARE2 (Cam))

ArticExpress(DE3): (F- *ompT* *hsdS*(rB- mB-) *dcm*+ Tetr *gal* λ (DE3) *endA* Hte [*cpn10* *cpn60* Gentr].

2. Meio de cultivo para *Neurospora crassa*

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

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

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

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

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

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

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

3. Propagação das linhagens, obtenção dos conídios e preparo das culturas permanentes

Para a propagação das linhagens e obtenção de conídios, inóculos das linhagens mutantes rejuvenescidas foram realizados em meio VM sólido, as culturas foram incubadas a 30°C em câmara BOD durante 2 dias e em seguida, transferidas para a luz à temperatura

ambiente por mais 8 dias, totalizando 10 dias de cultivo. Após esse período, os conídios foram coletados em 10 mL de água destilada estéril, filtrados em gaze estéril para retenção das hifas, contados em câmara de Neubauer e utilizados para os experimentos de choque térmico.

4. Choque térmico

Para os experimentos de choque térmico, uma suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^7 células/mL foi inoculada em 100 mL de meio VM líquido e incubada a 30°C/250 rpm/24 h. Após esse período, os micélios foram coletados por filtração e as amostras foram rapidamente divididas em duas partes iguais. Uma das partes foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostras não submetidas ao choque térmico; amostras **ZERO**) e a outra parte foi transferida para um frasco contendo meio VM líquido fresco, pré-aquecido a 45°C, e incubado nesta temperatura a 250 rpm, durante 30 minutos (amostras submetidas ao choque térmico; amostras **HS30**). Após o choque térmico, as amostras foram coletadas por filtração, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para utilização futura.

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

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

O conteúdo de glicogênio foi determinado nas linhagens selvagem e mutantes do fungo, submetidas ou não ao choque térmico, através da digestão do glicogênio com α -amilase e amiloglicosidase após precipitação com etanol, de acordo com protocolo descrito por Hardy & Roach (1993). Para isto, as proteínas contidas em 100 µL de cada uma das amostras foram precipitadas com 25 µL de uma solução TCA 50% a $10.000 \times g$, 4°C, 15 min. Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos, misturados com 4 volumes de etanol absoluto gelado durante 30 min a -80°C e centrifugados a $20.000 \times g$, 15 min, 4°C. Os precipitados contendo glicogênio foram dissolvidos em 400 µL de uma solução tampão (acetato de sódio 50 mM pH 5,2; CaCl_2 5 mM) contendo 1 µL de cada uma das enzimas

amiloglicosidase (30 mg/mL, em tampão acetato de sódio 50 mM pH 5,2; CaCl_2 5 mM) e α -amilase (10 mg/mL, no mesmo tampão) e incubados a 37°C durante 12 h. Um volume de 12,5 μL de cada uma das amostras digeridas foi tomada para a determinação do conteúdo de glicose livre, utilizando o *kit Glicose PAP Liquiform* (Labtest) num comprimento de onda de 550 nm. O conteúdo de glicogênio das amostras foi expresso em μg glicogênio/mg de proteínas totais.

6. Ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase de *Neurospora crassa*

As amostras para a realização do ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase (GS) foram as mesmas utilizadas para a quantificação de glicogênio diferindo no tampão utilizado (descrito em detalhes no item 5). Para o preparo do extrato celular bruto, uma pequena quantidade de cada um dos micélios congelados foi totalmente pulverizada em nitrogênio líquido, em gral de porcelana. Em seguida, aproximadamente 200 mg de cada uma das amostras pulverizadas foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de um tampão de lise gelado (HEPES 50 mM, pH 7,4; KCl 137 mM; glicerol 10% acrescido de inibidores de proteases (PMSF 10 mM; leupeptina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e homogeneizada em vortex. As frações sobrenadantes foram isoladas após centrifugação ($7.000 \times g/10 \text{ min}/4^\circ\text{C}$), recolhidas em tubos eppendorf novos e usadas para a determinação da atividade GS e de proteínas totais (HARTREE, 1972), utilizando BSA como padrão.

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

7. Identificação de isoformas fosforiladas da enzima GSN por *Western blot*

7.1. Extração de proteínas totais para a eletroforese bidimensional

Para os experimentos de eletroforese bidimensional, uma suspensão de conídios contendo aproximadamente 10^7 células/mL foi inoculada em 100 mL de meio VM líquido e incubada a 30°C/250 rpm/24 h. Após esse período, os micélios foram coletados por filtração e as amostras foram rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Para o preparo do extrato celular bruto, uma pequena quantidade de cada uma das amostras congeladas foi totalmente pulverizada em nitrogênio líquido, em gral de porcelana. Em seguida, aproximadamente 200 mg de cada uma das amostras pulverizadas foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de um tampão de lise gelado (HEPES 50 mM, pH 7,4; NaCl 137 mM; glicérol 10%) acrescido de inibidores de proteases (PMSF 100 mM; leupeptina 1 mM e pepstatina 1 mM) e dos inibidores de fosfatases (NaF 25 mM; EDTA 1 mM e $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 10 mM) e homogeneizada em vortex. O rompimento celular foi finalizado com a utilização de *glass beads* (Sigma, 1.180 μ) em 8 ciclos de homogeneização em vortex por 30 seg e intervalos de 30 seg em gelo. As frações sobrenadantes foram isoladas após centrifugação (10.000 x g/10 min/4°C) e recolhidas em tubos eppendorf novos.

As frações do sobrenadante recolhidas foram limpas utilizando o kit 2-D *clean-UP* (Amersham Biosciences) segundo as instruções do fabricante e foram quantificadas utilizando o kit 2-D Quant (Amersham Biosciences) também seguindo as instruções do fabricante.

7.2. Separação por eletroforese bidimensional

As amostras de proteínas totais foram separadas por 2D-PAGE usando o sistema de isoeletrofocalização *IPGphor*TM (GE Healthcare) e tiras *Immobiline*TM *DryStrip* (13 cm, linear, GE Healthcare) na faixa de pH 4-7, conforme especificações do fabricante.

Um volume de solução protéica correspondente a 250 μ g foi adicionado a 250 μ L de solução contendo tampão de amostra (uréia 7 mM; tioréia 2 mM; CHAPS 4%; Tris-HCl 30 mM; azul de bromofenol 0,001%), 1,25 μ L de *IPGbuffer* (GE Healthcare), 50 μ L de *DeStreak*TM *Rehydration Solution* (GE Healthcare) e DTT 2,8 mg/mL. Para evitar evaporação foi adicionado *IPG Cover Fluid* (GE Healthcare) sobre cada tira. Depois de 24 horas de rehidratação (sem aplicação de potencial), a isoeletrofocalização foi conduzida com corrente de 50 μ A por tira a 20°C por 100 V (10 h), 500 V (500 Vh), 1000 V (750 Vh), 8000 V (11325 Vh), 8000 V (5067 Vh) e 100 V (10 h), totalizando 19642 Vh.

Após a isoeletrofocalização, a tira foi equilibrada por duas vezes durante 15 minutos cada com 3 mL do tampão de equilíbrio (Tris-HCl 50 mM (pH 8,8); uréia 6 mM; glicérol 30%; SDS 2%; azul de bromofenol 0,001%; DTT 10 mg/mL) (GIANAZZA et al., 1985; BJELLQVIST et al., 1993). A tira também foi equilibrada uma vez durante 15 minutos com 3 mL do tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida 25 mg mL⁻¹ ao invés de DTT.

As proteínas foram separadas na segunda dimensão em gel SDS-poliacrilamida 9% (18 x 16 cm) utilizando o sistema *Hoefer™ SE600* (GE Healthcare). A corrida foi realizada a 10 mA por 30 minutos e 45 mA por gel em tampão de corrida Tris-glicina (LAEMMLI, 1970). O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250.

7.3. Western blot

Ensaio de *Western blot* foram realizados utilizando o anticorpo primário anti-glicogênio sintase de *N. crassa* (anti-GSN) produzido em coelho e o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase, conforme protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Para isto, os extratos protéicos foram separados por eletroforese bidimensional (descrito em detalhes no item 7.2) e as proteínas contidas nos mesmos foram transferidas para membranas de nitrocelulose, com o auxílio do sistema de transferência TE 62 Transfer Unit (GE Healthcare), em tampão de transferência gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; glicina 150 mM, de metanol 200 mL/L), durante 16 horas a 100 V. As membranas foram bloqueadas com TBST 1x gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%), contendo 6% de leite em pó desnatado, sob suave agitação, a 4°C durante 4 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 5 min, à temperatura ambiente, com TBST 1x e em seguida, incubada com o anticorpo primário anti-GSN (1:1.000) em TBST 1x acrescido de 3% de leite em pó desnatado, durante 16 h a 4°C, sob suave agitação, a membrana foi lavada novamente 3 vezes, durante 5 min, à temperatura ambiente, com TBST 1x e em seguida, incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:10.000; Sigma) em TBST 1x acrescido de 3% de leite em pó desnatado, durante 4 h a 4°C, sob suave agitação. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBST 1x e as proteínas foram reveladas em 10 mL de tampão de revelação para peroxidase (Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; ácido p-cumárico 1,5 µL, adicionado de 50 µL de luminol (125mM) e 1,5 µL peróxido de hidrogênio (100%).

8. Clonagem das ORFs NCU07580 e NCU08772 por RT-PCR

Para a clonagem das ORFs NCU07580 e NCU08772, oligonucleotídeos apresentando os respectivos códons de iniciação (AUG) e de terminação (UAG e UGA) da tradução foram desenhados (Tabela 2) baseados nas seqüências nucleotídicas das ORFs depositadas no banco de dados de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) e adicionados de sítios para as enzimas de restrição *NdeI*, *NheI* e *BamHI*, para a amplificação das ORFs e posterior subclonagem das mesmas no vetor de expressão pET28a (Novagen).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem molecular.

ORF	PARES DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	SÍTIO DE RESTRIÇÃO
NCU07580	Nc7580-F: 5'-gTACAT <u>ATg</u> gACggCAggAAACACCC-3' Nc7580-R: 5'-CgggATCC <u>CTA</u> GTAGCCCTCGTAGTTG-3'	<i>NdeI</i> e <i>Bam</i>HI
NCU08772	Nc8772-F: 5'-CATATgTCACCCAATCCCgAACAC-3' Nc8772-R: 5'-ggATCCTCAgCCTCGGCGGCAGCTTC-3'	<i>NheI</i> e <i>Bam</i>HI

Os códons de iniciação (AUG) e de término (UAG e UGA) da síntese protéica estão representados em negrito e sublinhados na seqüência. Os sítios para as enzimas de restrição encontram-se em negrito na tabela.

8.1. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído de micélio obtido a partir da linhagem selvagem do fungo, após crescimento vegetativo, pelo método de cloreto do lítio (SOKOLOVSKY et al., 1995). Para isto, o micélio foi pulverizado em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para tubo eppendorf contendo uma mistura de 750 µL de tampão de lise: 750 µL fenol saturado em Tris-HCl 100 mM, pH 8,0 (DEPC) e homogeneizado em vortex durante 20 min, em temperatura ambiente. A fase aquosa foi coletada a 9.300 x g, 10 min, 4°C e os RNAs contidos na mesma foram precipitados com 0,75 volumes de uma solução LiCl 8 M (DEPC) a 4°C, durante 2 h e coletados a 15.700 x g, 10 min, 4°C. Os precipitados contendo os ácidos nucléicos foram solubilizados em 300 µL de água DEPC e novamente precipitados com acetato de sódio 3 M (DEPC) e etanol absoluto gelado a -80°C, durante 30 min. Os RNAs totais foram coletados a 15.700 x g, 15 min, 4°C, lavados duas vezes com uma solução de etanol 70% (DEPC) gelada a 15.700 x g, 5 min, 4°C, secos, dissolvidos em 50 a 100 µL de água DEPC e quantificados por espectrometria a 260 nm. A qualidade das preparações foi avaliada pela relação 260/280 nm.

8.2. Clonagem por RT-PCR

Os cDNAs correspondendo às ORFs NCU07580 e NCU08772 foram amplificados por RT-PCR, usando o RNA total obtido, conforme descrito anteriormente. Para isto, cerca de 4 µg de RNA total foram tratados com DNase RQ1 RNase-Free DNase (Promega), conforme instruções do fabricante, a fim de eliminar contaminações por DNA genômico.

A síntese da primeira fita de cDNA (sscDNA) foi efetuada utilizando o oligonucleotídeo oligo-dT (Invitrogen) e o kit comercial *Superscript® III First-strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen). As reações de amplificação foram realizadas combinando os oligonucleotídeos F e R das respectivas ORFs, em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), no volume final de 50 µL. Nestas reações, 2 µL de sscDNA foram adicionados de 0,5 µL (1,25 U) da

Enzima *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes), 1 μ L de cada um dos respectivos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/ μ L), 10 μ L de 5x *Phusion Buffer GC*, 1 μ L de uma solução de dNTPs (10 mM cada) e 1,5 μ L de DMSO, num volume final de 30 μ L. A mistura foi homogeneizada e submetida a uma reação de PCR convencional.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x (Tris-HCl 400 mM, pH 8,0; ácido acético glacial 200 mM; EDTA 10 mM), contendo brometo de etídio 0,5 g/mL. Os fragmentos de DNA foram removidos do gel, purificados utilizando o kit GeneClean (MP Biomedicals) e clonados no vetor pMOS-Blue (*Blunt Ended PCR Cloning kit*, GE Healthcare). Para isto, os fragmentos de DNA purificados foram incubados juntamente com o vetor pMOS, nas concentrações indicadas pelo kit, a 15°C, 15 h e os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* DH10B. Os transformantes foram selecionados em meio de cultura 2YT contendo glicose 2% (triptona 1,6%; extrato de levedo 1,0%; NaCl 0,5%; glicose 0,2%), contendo 100 μ g/mL de ampicilina, na presença de 40 μ L de uma solução de X-GAL (40 mg/mL). As colônias resultantes foram inoculadas em meio 2YT contendo glicose, os DNAs plasmidiais dos transformantes foram extraídos e analisados por digestão com endonucleases de restrição. Culturas permanentes dos clones positivos carregando as construções plasmidiais pMOS-7580 e pMOS-8772 foram preparadas e armazenadas à -80°C.

9. Mini-extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de *boilling prep* descrito por Holmes & Quigley (1981). As colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% e incubados a 37 °C durante uma noite. Células das culturas bacterianas foram coletadas em tubos eppendorf de 1,5 mL e suspensas em 350 μ L de solução STET (Tris 10 mM, pH 8,0; sacarose 8%; Triton X-100 0,5%; EDTA 50 mM, pH 8,0) contendo lisozima 30 mg/mL. As suspensões celulares foram submetidas a um choque térmico em banho-maria fervente durante 40 segundos e imediatamente resfriadas a -20 °C, 10 min. Os restos celulares foram isolados após centrifugação (23.700 x g/10 min/4 °C) e os ácidos nucléicos contidos no sobrenadante foram precipitados pela adição de 40 μ L de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 420 μ L de isopropanol, a -20°C, 15 min e coletados por centrifugação (23.700 x g/15 min/4 °C). Os precipitados foram dissolvidos em 100 μ L de água estéril e as proteínas contidas na mistura foram extraídas pela adição de fenol saturado em tampão TE a 9.300 x g, 5 min, 4°C. Os ácidos nucléicos contidos na fase aquosa foram novamente precipitados pela adição de 40 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 300 μ L de etanol absoluto gelado a -20°C, 15 min, coletados por centrifugação (23.700 x g/15 min/4°C), lavados 2 vezes com 750 μ L de uma solução de etanol 70% gelada, secos e dissolvidos em 20 μ L de água estéril gelada.

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

Para o preparo das células competentes da linhagem DH10B de *E. coli*, células não competentes foram rejuvenescidas em 5 mL de meio 2YT e incubadas a 37 °C a 250 rpm, durante uma noite. Após a obtenção de células jovens, 500 µL deste crescimento foram inoculados em 100 mL de meio 2YT e a cultura incubada a 37 °C a 250 rpm até uma densidade ótica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) estéreis a 700 x g/4 °C/15 min. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de CaCl₂ 100 mM gelada e estéril e dissolvidos em 8 mL de CaCl₂ 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas para as reações de transformação.

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

11. Ensaio de produção das proteínas recombinantes

As proteínas codificadas pelas ORFs NCU07580 e NCU08772 foram produzidas na forma recombinante, fusionadas a uma cauda de poli-His na região N-terminal e purificadas através de cromatografia de afinidade, utilizando Ni⁺² e Co⁺². Para isto, as ORFs foram primeiramente subclonadas no vetor de expressão pET28a, as construções foram utilizadas para transformar células de *E. coli* competentes e as proteínas recombinantes foram induzidas na presença de IPTG. A seguir, encontram-se descritas, de maneira detalhada, todas as etapas da produção e purificação das mesmas.

11.1. Subclonagem das ORFs no vetor de expressão

O vetor de expressão utilizado foi o pET-28a (Novagen), o qual produz as proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda contendo seis resíduos de histidina na porção N-terminal. Para o preparo da construção plasmidial pET28a-7580, um cassete de DNA de 1.014 pb foi removido do plasmídeo pMOS-7580 através da digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e subclonado no vetor de expressão pET28a, nos mesmos sítios. A construção plasmidial pET28a-8772 foi preparada, removendo-se um fragmento de DNA do vetor pMOS-8772 de 1.110 pb através de digestão com as endonucleases de restrição *NheI* e *BamHI* e subclonados no vetor de expressão pET28a, nos mesmos sítios.

Os fragmentos de DNA foram incubados com o vetor pET28a digerido, os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes de *E. coli* DH10B e os transformantes foram selecionados em meio contendo canamicina 100 µg/mL. As colônias resultantes foram inoculadas em meio 2YT contendo glicose, os DNAs plasmidiais foram extraídos e as construções foram checadas primeiro por digestão com enzimas de restrição utilizando as endonucleases *NdeI/BamHI* para a construção plasmidial pET28a-7580 e as endonucleases *NheI/BamHI* para a construção plasmidial pET28a-8772 e, posteriormente por seqüenciamento de DNA utilizando os oligonucleotídeos listados na Tabela 2. Culturas permanentes dos clones positivos foram realizadas e armazenadas a -80°C.

11.2. Ensaio de indução e análise de solubilidade

Os DNAs plasmidiais das construções pET28a-7580 e pET28a-8772 foram utilizados para transformar células competentes de três linhagens produtoras diferentes de *E. coli*, a linhagem BL21(DE3)pLys-S, a linhagem BL21-Rosetta(DE3)pLys-S e a linhagem ArticExpress(DE3). A seleção dos transformantes foi realizada em meio de cultura 2YT + 0,2% glicose, suplementado com 100 µg/mL de canamicina e cloranfenicol 34 µg/mL para as células produtoras BL21(DE3)pLys-S e BL21-Rosetta(DE3)pLys-S ou 100 µg/mL de canamicina, 20 µg/mL gentamicina e 75 µg/mL de espectinomicina para as células produtoras ArticExpress(DE3).

Como controle negativo dos ensaios de expressão, as células competentes das diferentes linhagens foram transformadas com o vetor de expressão pET28a vazio. Como controle positivo dos ensaios de expressão utilizando a linhagem *E. coli* BL21(DE3)pLys-S, foi usada a construção plasmidial pET-XAC2369, a qual expressa uma proteína de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* com aproximadamente 24 kDa. Como controle positivo dos ensaios de expressão utilizando as linhagens produtoras BL21-Rosetta(DE3)pLys-S e ArticExpress(DE3), foi usada a construção pET-CopB, a qual também codifica uma proteína de *X. citri* com aproximadamente 65 kDa. As amostras controles foram ensaiadas paralelamente aos transformantes pET-7580 e pET-8772.

Para a identificação dos melhores clones produtores das proteínas recombinantes, colônias isoladas de cada transformação com as linhagens BL21 e/ou Rosetta foram utilizadas em ensaios de produção das proteínas recombinantes, após indução com IPTG. Pré-inóculos dos transformantes foram realizados em 5 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% mais os antibióticos adequados para cada linhagem produtora. Um mL de cada pré-inóculo fresco foi incubado em 50 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% e dos respectivos antibióticos, a 37°C, 250 rpm até uma D.O._{600nm} de aproximadamente 0,6 – 0,8. Alíquotas de 2 mL de cada cultura foram coletadas (amostras não induzidas; NI), as células foram isoladas por centrifugação a 23.700 xg/4°C/2 min e mantidas em gelo. O restante das culturas foi adicionado

de IPTG numa concentração final de 0,4 mM e as proteínas recombinantes foram induzidas a 37°C, 250 rpm, 4 h. Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (9.300 x g/4 °C/10 min) e mantidas em gelo.

Para a identificação dos melhores clones produtores de proteínas recombinantes a partir da linhagem *E. coli* ArcticExpress(DE3), a produção de proteínas recombinantes seguiu o protocolo descrito pelo fornecedor da linhagem. Pré-inóculos foram realizados em 5 mL de meio 2YT suplementado de glicose 0,2% na presença de canamicina, gentamicina e espectinomicina e as culturas foram incubadas durante 16 horas a 37 °C, 200 rpm. Após o crescimento, 1 mL das culturas foi inoculado em 50 mL de meio 2YT acrescido de glicose 0,2% na presença dos antibióticos até atingir uma $DO_{600nm} = 0,4 - 0,6$. Aliquotas de 2 mL de cada amostra não induzida foram removidas (amostras NI) e as células foram coletadas por centrifugação a 23.700 x g/4 °C/2 min e reservadas em banho de gelo. O restante das culturas foi adicionado de IPTG numa concentração final de 0,4 mM e as proteínas recombinantes foram induzidas a 12°C/200 rpm/24 horas e ao final da indução as células foram coletadas por centrifugação (9.300 x g/4°C/ 10 min) e mantidas em gelo.

Os precipitados celulares foram suspensos em 10 mL de um tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 20 mM; glicerol 5%; Tween-20 0,5%; Triton X-100 0,5%, acrescido de EDTA 5 mM, PMSF 1 mM e benzamidina 10 mM como inibidores de proteases) e as células foram lisadas em sonicador (SONICS, Vibra Cell), na potência de 30%, com 3 pulsos de 30 segundos, em intervalos de 30 segundos em gelo. Os lisados celulares foram centrifugados a 48.300 x g/4 °C/10 min e os sobrenadantes recolhidos em tubos limpos (frações solúveis; S). Os precipitados foram completamente suspensos em 3 mL do tampão de lise (frações insolúveis ou precipitados; P) e as células não-induzidas foram suspensas em 300 µL do mesmo tampão. As proteínas totais de cada uma das amostras foram quantificadas por Hartree (1972), utilizando BSA como padrão. Aproximadamente 20 µg de cada uma das amostras foram analisados por SDS-PAGE 12% (LAEMMLi, 1970), a 200 V em sistema de eletroforese vertical Mini-Protean III (Bio-Rad) e reveladas com Coomassie-Blue Brilliant R-250.

11.3. Análise da expressão das proteínas recombinantes por *Western blot*

A fim de confirmar a produção das proteínas recombinantes, ensaios de *Western blot* foram realizados, utilizando o anticorpo anti-His conjugado com fosfatase alcalina, conforme protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001). Para isto, os extratos protéicos foram fracionados por SDS-PAGE 12% e as proteínas contidas nos mesmos foram imobilizadas em membranas de nitrocelulose, com o auxílio do sistema de transferência Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell (BioRad), em tampão de transferência gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 8,0; glicina 150 mM, de metanol 200 mL/L), durante 2 horas a 100 V, 250 mA. As membranas

foram bloqueadas com TBST 1x gelado (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5; NaCl 500 mM, Tween-20 0,05%), contendo 6% de leite em pó desnatado, sob suave agitação, a 4°C durante 16 horas. Após o bloqueio, a membrana foi lavada 3 vezes, durante 5 min, à temperatura ambiente, com TBST 1x e em seguida, incubada com o anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (1:10.000; Sigma) em TBST 1x acrescido de 3% de leite em pó desnatado, durante 2 h em temperatura ambiente, sob suave agitação. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBST 1x e as proteínas recombinantes produzidas foram reveladas em 10 mL de tampão bicarbonato (NaHCO₃ 100 mM, pH 9,8; MgCl₂ 1 mM), adicionado de 100 µL de NBT (cloreto p-nitrozol de tetrazólio; 30 mg/mL em DMF 70%; BioRad) e 100 µL BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina; 15 mg/mL em DMF; BioRad).

12. Purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU07580

Um pré-inóculo fresco, contendo células de *E. coli* linhagem BL21 Rosetta (DE3) pLys-S transformadas com a construção pET-7580, foi preparado e inoculado em 200 mL de meio 2YT suplementado com glicose 0,2%, acrescido de canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. A cultura foi mantida a 37°C/250 rpm durante 4 h, até uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6 – 0,8. Em seguida, a produção da proteína recombinante foi induzida nas mesmas condições após a adição de IPTG, as células foram coletadas a 9.300 x g/4°C/20 min e suspensas em 2 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM; glicerol 10%; Triton X-100 0,01%) acrescido de uma mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM; DTT 1 mM; benzamidina 25 mM; 5 µg/mL de cada antipaína, pepstatina A e leupeptina). As células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N₂ líquido e água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonicador, após 5 ciclos de 10 seg, com intervalos de 1 min em banho de gelo, os restos celulares foram removidos por centrifugação a 23.700 x g/4 °C/20 min e o sobrenadante contendo a proteína recombinante na forma solúvel foi coletado e submetido a uma cromatografia de afinidade seqüencial em bancada, usando resina de Ni⁺² e Co⁺².

Para isto, as proteínas recombinantes contidas no sobrenadante em 2 mL foram inicialmente incubadas com 300 µl da resina Ni²⁺-NTA-agarose (Qiagen), previamente condicionada em tampão de lavagem (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10% v/v) contendo inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM; DTT 1 mM; benzamidina 25 mM; 5 µg/mL de cada antipaína, pepstatina A e leupeptina) a 4°C sob suave agitação, durante 1 h. Após o período de incubação, o sobrenadante (amostra FT1 – *flow through*) foi removido por centrifugação a 100 x g/2 min/4°C. A resina contendo a proteína recombinante foi lavada 4 x com tampão de lavagem gelado acrescido de inibidores de proteases e todas as lavagens foram coletadas e combinadas em uma única fração (FT2 – *flow through*) para verificar uma

possível perda da proteína recombinante durante a etapa de lavagem. Depois de lavada a resina, as proteínas foram eluídas 2 x em 300 µL tampão de eluição (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 100, 200, 300 ou 500 mM, glicerol 10%, PMSF 0,5 mM; DTT 1 mM; benzamidina 25 mM; 5 µg/mL de cada antipaína, pepstatina A e leupeptina) contendo 100, 200, 300 e 500 mM de imidazol, respectivamente (frações E1, E2, E3 e E4), totalizando 600 µL para cada fração. As frações coletadas foram dialisadas contra um 1 L de um tampão de diálise (Tris-HCl 10 mM, pH 7,9; KCl 300 mM; glicerol 20%; EDTA 1 mM e DTT 0,5 mM) durante uma noite, a 4°C. As proteínas dialisadas foram centrifugadas a 23.700 x g/15 min/4°C para remover prováveis precipitados protéicos, alíquotas destas frações foram reservadas para futura análise por SDS-PAGE e o restante das frações foi combinado e novamente submetido a uma cromatografia de afinidade em bancada utilizando 300 µL da resina His-Select Cobalt Affinity Gel (Sigma). O procedimento da cromatografia com resina de Co^{+2} foi o mesmo adotado para a resina contendo Ni^{+2} . As proteínas totais contidas em todas as frações coletadas a partir das resinas de Ni^{+2} e Co^{+2} foram analisadas por SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) e a eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 200 V durante 1 h, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

13. Purificação da proteína recombinante codificada pela ORF NCU08772

Um pré-inóculo fresco, contendo células de *E. coli* linhagem BL21 Rosetta (DE3) pLys-S transformadas com a construção pET-8772, foi preparado e inoculado em 1000 mL de meio 2YT suplementado com glicose 0,2%, acrescido de canamicina 100 µg/mL e cloranfenicol 34 µg/mL. A cultura foi mantida a 37°C/250 rpm durante 4 h, até uma $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,6 – 0,8. Em seguida, a produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG, nas condições de 12°C/180 rpm durante 22 h e as células foram coletadas a 9.300 x g/4°C/20 min e suspensas em 100 mL de tampão de lise gelado (Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; NaCl 300 mM; Imidazol 20 mM; glicerol 10%; Triton X-100 0,01%) acrescido de uma mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,5 mM; DTT 1 mM; benzamidina 25 mM; 5 µg/mL de cada antipaína, pepstatina A e leupeptina).

As células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N_2 líquido e água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonicador, após 8 ciclos de 30 seg, com intervalos de 1 min em banho de gelo, os restos celulares foram removidos por centrifugação a 23.700 x g/4 °C /20 min. As proteínas recombinantes contidas no sobrenadante foram purificadas por cromatografia de afinidade em coluna de níquel His-Trap (1 mL) (GE Healthcare) no aparelho de purificação Akta Prime (Amersham). As proteínas fusionadas a cauda de histidina foram eluídas em um gradiente linear de imidazol na concentração de 100mM a 1000mM, preparado no mesmo tampão de homogeneização sem os

detergentes. Os produtos purificados foram analisados em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% (LAEMMLI, 1970) e a eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 200 V durante 1 h, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

Resultados e Discussão

1. Determinação do conteúdo de glicogênio nas linhagens mutantes

As linhagens mutantes analisadas neste trabalho são linhagens contendo ORFs codificadoras de proteínas quinases individualmente nocauteadas pela inserção de uma marca de resistência ao antibiótico higromicina. Estas linhagens foram analisadas, juntamente com a linhagem selvagem, portanto, a possível diferença no fenótipo apresentado é uma correlação da função da proteína quinase ausente na linhagem mutante. Todas as linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem foram analisadas durante o crescimento na temperatura normal (30°C) e após submissão ao choque térmico (transferência de 30°C para 45°C). Os micélios obtidos de cada linhagem, nas diferentes condições, foram utilizados para a quantificação do conteúdo de glicogênio. A dosagem de glicogênio presente nos extratos celulares foi feita por meio da determinação da glicose liberada pela digestão com amiloglicosidase e α -amilase em relação à quantidade de proteína presente no extrato protéico. As famílias das quinases, as quais as proteínas quinases pertencem, bem como a porcentagem de cada uma delas, estão representadas na figura 4.

As 55 linhagens mutantes foram analisadas em 4 experimentos independentes e comparadas ao padrão já conhecido da linhagem selvagem, ou seja, uma redução do conteúdo de glicogênio quando o micélio é submetido ao choque térmico (DE PAULA et al., 2002). Como resultado das análises, 27 linhagens foram selecionadas por apresentarem um perfil diferente da linhagem selvagem, tanto na condição normal de crescimento quanto após choque térmico. Estas 27 linhagens foram reanalisadas nas mesmas condições e os valores de conteúdo de glicogênio estão representados na figura 5.

Analisando os perfis obtidos, verificamos que doze linhagens (seguindo a ordem dos gráficos na figura 5) (NCU02814, NCU09064, NCU3071, NCU04612, NCU09071, NCU01335, NCU04426, NCU06421, NCU06179, NCU08346, NCU00406 e NCU06240) mostraram uma redução bastante acentuada do conteúdo de glicogênio após choque térmico, oito linhagens (NCU07280, NCU09189, NCU04335, NCU05638, NCU06626, NCU06685, NCU04096 e NCU07880) apresentaram o mesmo perfil da linhagem selvagem, ou seja, diminuição no conteúdo de glicogênio após o choque térmico, mas apresentando diferenças nas quantidades de acúmulo de glicogênio, três linhagens (NCU06544, NCU00682 e NCU07872) apresentaram conteúdos de glicogênio aumentados em relação a selvagem após o choque térmico, duas linhagens (NCU03187, NCU08177) apresentaram o conteúdo de glicogênio antes e após choque térmico muito semelhantes e duas linhagens (NCU07580, NCU02234) apresentaram o conteúdo de glicogênio aumentado após o choque térmico. Após a avaliação dos resultados, as linhagens que apresentaram alterações mais acentuadas foram selecionadas para a realização do ensaio de atividade da enzima glicogênio sintase. Estas linhagens estão apresentadas na Tabela 3, a qual mostra os produtos gênicos codificados pelas ORFs

(<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora>) e algumas características bioquímicas, tais como MM e pI teóricos, preditas de cada uma delas.

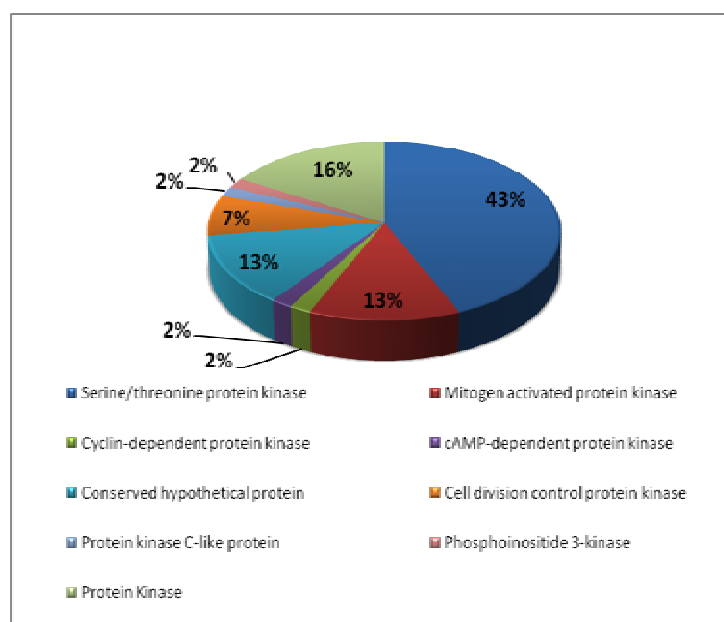


Figura 4. Representação esquemática da porcentagem de linhagens mutantes utilizadas, agrupadas de acordo com as famílias das proteínas quinases cuja ORF foi nocauteada.

Dentre as ORFs selecionadas, algumas delas estão anotadas no banco de dados do fungo como codificadoras de proteínas que desempenham funções já conhecidas participando de alguma via de sinalização. O produto da ORF NCU03071 denominado OS-4, uma quinase da família MAPK, está relacionado com o equilíbrio celular frente ao estresse osmótico em *N. crassa*. O nocaute nesta ORF levou a um aumento na susceptibilidade à morte na condição de estresse osmótico (FUJIMURA et al., 2003). Além do estresse osmótico esta proteína está envolvida em uma via de sinalização de resposta a estímulo luminoso, a qual é ativada em *N. crassa* a partir da ação do complexo WCC (*White Color Complex*) (LAMB et al., 2011). O complexo WCC é formado pela associação dos fatores de transcrição WC-1 e WC-2, os quais são ativados por luz e regulam a expressão de genes responsivos a luz. Estudos prévios em nosso laboratório mostraram que alguns fatores de transcrição que estão envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio são também responsivos a luz e/ou regulam o relógio biológico no fungo (GONÇALVES et al., 2011).

O produto da ORF NCU03187 foi anotado como NIMA, uma proteína envolvida na sinalização da fase G2 do ciclo celular em *Aspergillus nidulans*, um fungo da classe dos ascomicetos assim como *N. crassa* (PU et al., 1995). O produto da ORF NCU07872 foi

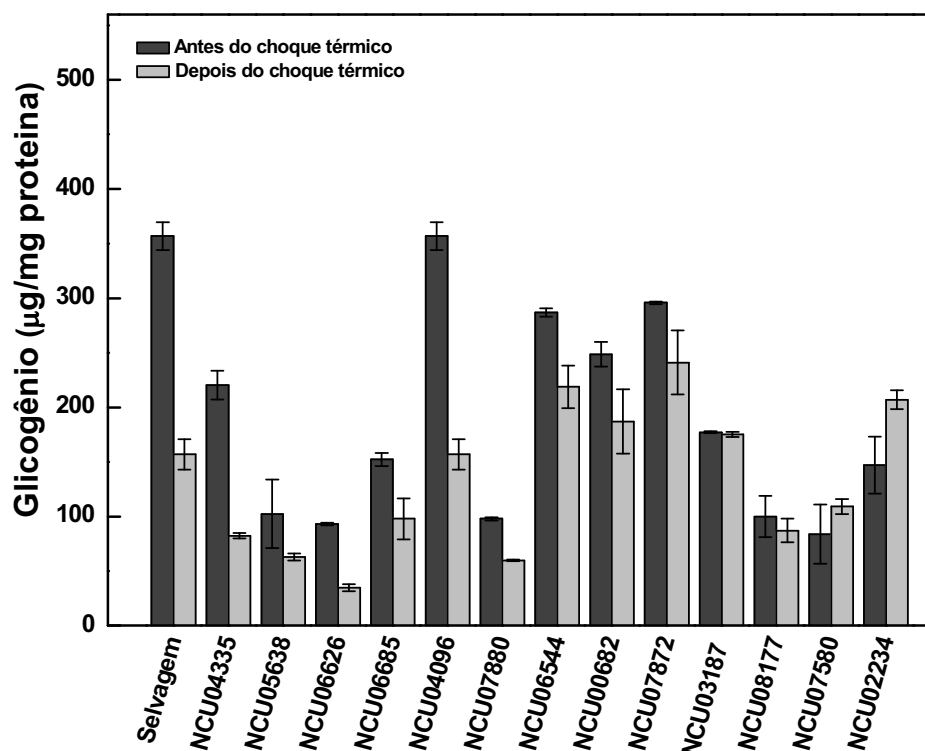
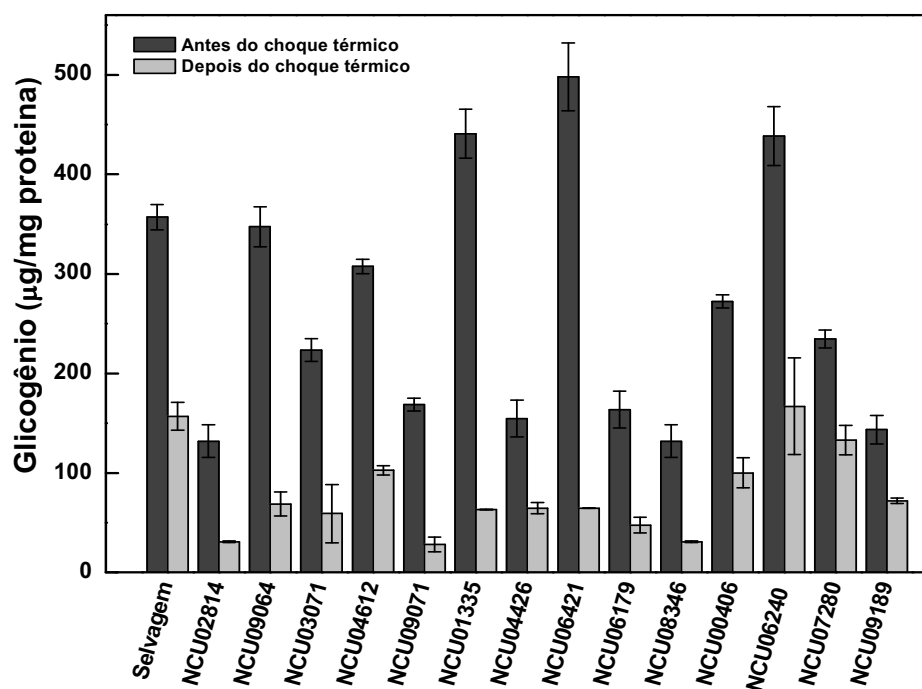


Figura 5. Concentração de glicogênio nas linhagens selvagem e mutantes selecionadas. O conteúdo de glicogênio foi quantificado antes e após choque térmico, como descrito em Materiais e Métodos.

Tabela 3. Dados bioquímicos obtidos por predição teórica e classificação das proteínas quinases selecionadas

FGSC	NCU#	Produto Gênico*	Classificação**	Resíduos de AA	MM	pl
11169	02814	serine/threonine-protein kinase chk2	S/T K	703	78,1	6,6
11317	04096	serine/threonine-protein kinase 3	S/T K	829	92,2	9,4
11318	06419	MAP kinase kinase	MAPK	518	55,5	7,6
11322	00406	protein kinase CHM1	CHP	833	91,7	9,1
11326	02234	MAP kinase kinase kinase	MAPK	2178	23,5	7,2
11338	09064	conserved hypothetical protein	CHP	1233	13,8	9,9
11434	00682	serine/threonine-protein PRKX	S/T K	416	47,8	6,2
11479	03071	MAP kinase kinase kinase SskB	MAPK	1367	15,5	6,1
11481	04612	mitogen activated protein kinase kinase	MAPK	392	43,9	5,9
11841	03187	G2-specific protein kinase nimA	CDCPK	858	94,3	9,4
12000	09071	serine/threonine-protein kinase cot-1	S/T K	701	79,8	9,0
13416	07280	serine/threonine-protein kinase gad8	S/T K	644	71,5	8,3
14539	07580	cyclin-dependent protein kinase	CDK	337	38,8	7,3
15734	06544	protein kinase C-like protein	PKC	1142	12,7	7,7
16739	09189	conserved hypothetical protein	CHP	651	73,1	5,2
17942	04335	protein kinase	CHP	757	83,7	8,7
17944	04426	cell division protein kinase	CDCPK	390	43,6	5,0
17948	05638	conserved hypothetical protein	CHP	815	91,7	8,9
17954	06179	serine/threonine-protein kinase hal4	S/T k	497	55,0	8,8
17956	06421	conserved hypothetical protein	CHP	306	34,1	6,8
17958	06583	conserved hypothetical protein	CHP	1266	14,3	6,5
17959	06626	phosphoinositide 3-kinase subunit 4	P3K	1563	17,5	7,8
17961	06685	protein kinase	CHP	1151	12,6	10,1
17964	07872	protein kinase Yak1	S/T K	937	10,4	9,4
17965	07880	protein kinase	CHP	492	54,7	9,2
17966	08177	protein kinase	CHP	763	84,7	6,8

*<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora>. **S/T K, *serine/threonine protein kinase*; MAPK, *mitogen activated protein kinase*; CHP, *conserved hypothetical protein*; CDCPK, *cell-division control protein kinase*; CDK, *cyclin-dependent protein kinase*; PKC, *protein kinase C*; P3K, *phosphoinositide 3-kinase*. MM, massa molecular teórica. pl, ponto isoelétrico teórico. As predições teóricas de MM, pl e o número de resíduos de AA foram realizadas utilizando a ferramenta PsortII (<http://psort.nibb.ac.jp/cgi-bin/runpsort.pl>).

anotado como YAK1, ortóloga à proteína Yak1p de *S. cerevisiae*, a qual mostrou ser uma quinase que fosforila os fatores de transcrição Hsf1p e Msn2/4p de levedura, atuando na resposta celular em condições de estresse térmico (LEE et al., 2008). O produto da ORF NCU07580 corresponde ao homólogo da proteína quinase dependente de ciclina Pho85p de *S. cerevisiae*, uma proteína quinase de múltiplas funções dependendo da ciclina parceira. Foi mostrado que esta quinase atua diretamente no controle do metabolismo do glicogênio, regulando por fosforilação a atividade da enzima glicogênio sintase quando ligada principalmente às ciclinas Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p e Pcl10p (HUANG et al., 1998; WANG et al.,

2001). Uma proteína homóloga à ciclina Pcl10p foi identificada no banco de dados de *N. crassa* e corresponde ao produto da ORF NCU08772.

Outra linhagem que apresentou alterações no conteúdo de glicogênio e que apresenta uma função previamente estabelecida é a mutante na proteína codificada pela ORF NCU06544, cujo produto, denominado NPKC, modula respostas a estímulos provenientes da luz, regulando o fotorreceptor de luz azul WC-1 (FRANCHI et al., 2005).

2. Dosagem da atividade da enzima glicogênio sintase nas linhagens selecionadas

A atividade GS foi quantificada nos extratos celulares das linhagens mutantes selecionadas na presença e na ausência do modulador alostérico G6P. A medida da atividade na presença do modulador reflete a atividade total da enzima, tanto no estado fosforilado quanto desfosforilado e a atividade na ausência reflete apenas a enzima no seu estado desfosforilado. Portanto, a razão de atividade na ausência e presença de G6P (taxa -/+), representa um índice cinético do estado de fosforilação da enzima, onde valores próximos a zero são correlacionados à proteína altamente fosforilada e valores próximos a 1 refletem o baixo estado de fosforilação da enzima (THOMAS, 1968). A Tabela 4 mostra os valores da razão de atividade -/+ G6P para as linhagens mutantes e selvagem para este ensaio. Os valores apresentados correspondem à média de três experimentos independentes.

Para a linhagem selvagem os valores encontrados foram aumentados quando a mesma foi exposta ao choque térmico, o que significa fosforilação menor do que na ausência do estresse térmico, sendo estes os primeiros relatos de atividade glicogênio sintase nesta linhagem de *N. crassa*. As linhagens mutantes que apresentaram valores aumentados em relação à linhagem selvagem antes e/ou após o choque térmico foram selecionadas (estão destacadas em cinza na Tabela 4). Os valores aumentados sugerem que a ausência da proteína quinase influencia de maneira direta ou indireta na fosforilação da enzima GSN, podendo ser uma quinase que fosforila GSN diretamente ou uma enzima atuante em alguma via regulatória que controla a síntese de glicogênio.

Um extenso estudo envolvendo 89 linhagens de *N. crassa* nocauteadas em ORFs codificadoras de serina/treonina quinases foi realizado por Park et al. (2011), no qual grande parte das 55 linhagens utilizadas neste trabalho foram analisadas. Neste estudo, foram mostradas anormalidades fenotípicas de crescimento e desenvolvimento sexual em um terço das linhagens e parte das linhagens mostrou ser sensível a determinados agentes químicos. Através deste estudo, podemos observar que as quinases relatadas no trabalho de Park et al. (2011) mostraram estar envolvidas em vias que sinalizam o desenvolvimento morfológico, sexual e resistência a agentes químicos. Algumas proteínas analisadas no trabalho de Park e

colaboradores, também foram analisadas neste trabalho. Estas proteínas mostraram estar envolvidas no controle do acúmulo de glicogênio (figura 5), mais especificamente, e algumas mostraram regular o estado de fosforilação da enzima GSN (Tabela 4). Portanto, algumas das proteínas quinases analisadas neste trabalho, devem estar envolvidas em múltiplos processos celulares.

A linhagem nocauteada na ORF NCU09071, a qual codifica a proteína quinase DBF2, mostrou alterações tanto no acúmulo de glicogênio e na atividade GSN. Esta proteína foi previamente demonstrada estar envolvida na regulação do processo de mitose, desenvolvimento conidial e no acúmulo de glicogênio, demonstrado por exposição das células a vapores de iodo e análise do glicogênio por ressonância magnética nuclear (DVASH et al., 2010). Portanto, os nossos resultados confirmaram o papel regulatório, desta proteína, na manutenção dos níveis de glicogênio em *N. crassa*, descrito neste trabalho.

Em *N. crassa* a proteína codificada pela ORF NCU02234 é pertencente à família das MAPK e é denominada MIK-1, sendo a primeira proteína de uma cascata MAPK que culmina na regulação do desenvolvimento celular e regula a produção do metabolito secundário l-DOPA melanina (PARK et al., 2008). A proteína codificada pela ORF NCU07280 é ortóloga à proteína Phk1p de *S. cerevisiae* que regula o processo de manutenção da integridade celular em leveduras (ROELANTS et al., 2002).

Outra proteína muito bem caracterizada em vários processos celulares de *S. cerevisiae* é a proteína Pho85p. Esta proteína pertence à família das Cdk's e apresenta múltiplas funções celulares de acordo com a sua ciclina parceira. A primeira função atribuída a ela foi na regulação do metabolismo de fosfato, onde Kaffman et al. (1995) mostraram que a interação de Pho85p com a ciclina Pho80p resulta na fosforilação do fator de transcrição Pho4p inibindo a sua função no envolvimento no metabolismo do fosfato. Mais tarde outras funções foram atribuídas a esta proteína quando ligada a diferentes ciclinas parceiras. Quando ligada às ciclinas Pcl6p e Pcl7p, Pho85p regula a utilização de variadas fontes de carbono, quando ligada a Pcl1p, Pcl2p, Pcl5p, Pcl9p e Clg1p coordena o desenvolvimento morfológico, quando ligada a Pcl1p e Pcl2p a progressão do ciclo celular e quando ligada a Pcl1p também fosforila o fator de transcrição Gcn4p estabilizando-o. Este fator de transcrição regula os genes da biossíntese de purinas e de aminoácidos (CARROL & O'SHEA, 2002).

A função de Pho85p mais bem caracterizada até o momento é o seu envolvimento na regulação da síntese do glicogênio. Quando esta quinase está ligada às ciclinas Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p e Pcl10p (WILSON; WANG; ROACH, 2005; HUANG et al., 1998) ela está envolvida na regulação do metabolismo deste carboidrato. Este resultado foi observado, pois quando os genes que codificam esta ciclinas foram nocauteados, foram observadas alterações no acúmulo de glicogênio e na atividade glicogênio sintase. Além disso, o complexo Pho85p-Pcl10p fosforila diretamente a enzima Gsy2p, reduzindo sua atividade (HUANG et al., 1998).

Tabela 4. Atividade glicogênio sintase nas linhagens mutantes selecionadas.

NCU#	Produto Gênico*	Atividade GSN**			
		Total		- / + G6P	
		30°	45°	30°	45°
-	selvagem	1.35 +/-0,81	1.58 +/-0,49	0.25 +/-0,01	0.69 +/-0,01
02814	serine/threonine-protein kinase chk2	2.75 +/-0,73	1.67 +/-0,21	0.19 +/-0,02	0.85 +/-0,03
04096	serine/threonine-protein kinase 3	1.79 +/-0,18	0.66 +/-0,32	0.81 +/-0,06	0.62 +/-0,03
06419	MAP kinase kinase	1.06 +/-0,08	0.57 +/-0,56	0.60 +/-0,06	0.64 +/-0,01
00406	protein kinase CHM1	0.90 +/-0,56	1.17 +/-0,06	0.60 +/-0,06	0.87 +/-0,01
02234	MAP kinase kinase kinase	2.56 +/-0,16	1.84 +/-0,34	0.45 +/-0,01	0.90 +/-0,05
09064	conserved hypothetical protein	2.07 +/-0,53	1.23 +/-0,23	0.20 +/-0,06	0.41 +/-0,03
00682	serine/threonine-protein PRKX	1.83 +/-0,23	1.51 +/-0,49	0.35 +/-0,03	0.61 +/-0,01
03071	MAP kinase kinase kinase SskB	2.31 +/-0,63	1.62 +/-0,25	0.30 +/-0,02	0.77 +/-0,03
04612	mitogen activated protein kinase kinase	1.75 +/-0,36	1.08 +/-0,40	0.24 +/-0,01	0.58 +/-0,01
03187	G2-specific protein kinase nimA	1.43 +/-0,12	0.89 +/-1,52	0.35 +/-0,01	0.44 +/-0,00
09071	serine/threonine-protein kinase cot-1	1.30 +/-0,19	1.08 +/-0,33	0.32 +/-0,05	0.82 +/-0,06
07280	serine/threonine-protein kinase gad8	0.96 +/-0,01	1.34 +/-0,49	0.46 +/-0,06	0.80 +/-0,07
07580	cyclin-dependent protein kinase	1.89 +/-0,22	1.88 +/-0,35	0.27 +/-0,01	0.48 +/-0,05
06544	protein kinase C-like protein	1.39 +/-0,38	1.63 +/-0,49	0.29 +/-0,03	0.42 +/-0,03
09189	conserved hypothetical protein	1.48 +/-0,04	1.25 +/-0,29	0.39 +/-0,07	0.67 +/-0,11
04335	protein kinase	0.71 +/-1,16	1.44 +/-0,16	0.35 +/-0,04	0.45 +/-0,03
04426	cell division protein kinase	1.39 +/-0,83	1.87 +/-0,11	0.39 +/-0,03	0.49 +/-0,04
05638	conserved hypothetical protein	1.37 +/-0,21	1.00 +/-1,03	0.33 +/-0,02	0.62 +/-0,05
06179	serine/threonine-protein kinase hal4	1.44 +/-0,23	1.72 +/-0,08	0.27 +/-0,01	0.59 +/-0,02
06421	conserved hypothetical protein	1.72 +/-0,15	1.30 +/-0,18	0.30 +/-0,04	0.42 +/-0,06
06583	conserved hypothetical protein	1.78 +/-0,01	2.14 +/-0,20	0.34 +/-0,02	0.80 +/-0,03
06626	phosphoinositide 3-kinase subunit 4	0.98 +/-0,02	1.70 +/-0,51	0.39 +/-0,02	0.60 +/-0,01
06685	protein kinase	1.22 +/-0,05	2.41 +/-0,84	0.23 +/-0,02	0.45 +/-0,07
07872	protein kinase Yak1	0.85 +/-2,01	1.64 +/-0,56	0.31 +/-0,03	0.55 +/-0,05
07880	protein kinase	3.88 +/-1,07	2.14 +/-1,23	0.36 +/-0,02	0.74 +/-0,06
08177	protein kinase	1.44 +/-0,28	2.12 +/-0,48	0.22 +/-0,05	0.91 +/-0,02

As linhagens mutantes que apresentaram valores aumentados na relação -/+ G6P estão destacadas em cinza.

*<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora>. **A atividade glicogênio sintase foi expressa por nmol/min/mg proteína.

3. Análise das isoformas fosforiladas da enzima GSN

Para demonstrar se as quinases que apresentaram relação -/+ G6P aumentada (as salientadas em cinza na Tabela 4) atuam diretamente na fosforilação da enzima GSN, foi realizado uma análise das isoformas fosforiladas da enzima nas linhagens mutantes selecionadas. Esta análise foi realizada através de 2D-PAGE seguida de *Western blot*. Através da combinação destes ensaios é possível identificar as isoformas fosforiladas de uma proteína alvo de fosforilação. Resultados prévios em nosso laboratório mostraram que a enzima GSN apresenta 4 potenciais sítios de fosforilação, uma vez que quando os resíduos dos

aminoácidos serina/treonina correspondentes a tais sítios foram mutados por mutagênese sítio-dirigida, o índice de incorporação *in vitro* de fosfato radioativo foi reduzido em relação à proteína selvagem (BARBOSA, 2007). Além disso, foi verificado que a enzima contendo o 4 prováveis sítios mutados e a enzima truncada na região C-terminal (a qual contém os sítios de fosforilação) ainda mostrou incorporação de fosfato radioativo. Estes resultados sugeriram que a enzima GSN possa apresentar sítio(s) de fosforilação adiciona(is) fora da região C-terminal.

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

Dentre as linhagens que apresentaram alteração no conteúdo de glicogênio (figura 5) e, posteriormente, apresentaram o índice de fosforilação aumentado quando comparado com a selvagem (Tabela 4), selecionamos para este experimento as linhagens com modificações mais pronunciadas e com indicações na literatura de proteínas ortólogas que atuam diretamente na fosforilação da enzima GS em outros organismos. As linhagens mutantes analisadas foram as que codificam os produtos das ORFs: NCU0406, NCU07280, NCU03187 e NCU02234, NCU08177, NCU09064 e NCU07580 e NCU04096 (figura 6). Os resultados mostraram que a proteína GSN na linhagem selvagem apresentou 5 isoformas de fosforilação. As linhagens NCU0406, NCU07280, NCU03187 e NCU02234 apresentaram um perfil de fosforilação levemente modificado mostrando uma isoforma de fosforilação adicional no lado ácido (+), podendo sugerir um aumento na fosforilação da enzima GSN nestas linhagens mutantes. Estes resultados são intrigantes, pois são inconsistentes com os dados da Tabela 4, a qual mostrou uma relação -G6P/+G6P aumentada nestas linhagens, um perfil característico da enzima GSN menos fosforilada.

As linhagens mutantes nas ORFs NCU09064, NCU07580 e NCU03187 mostraram um aumento no tamanho dos *spots* do lado básico, sugerindo que a ausência destas quinases

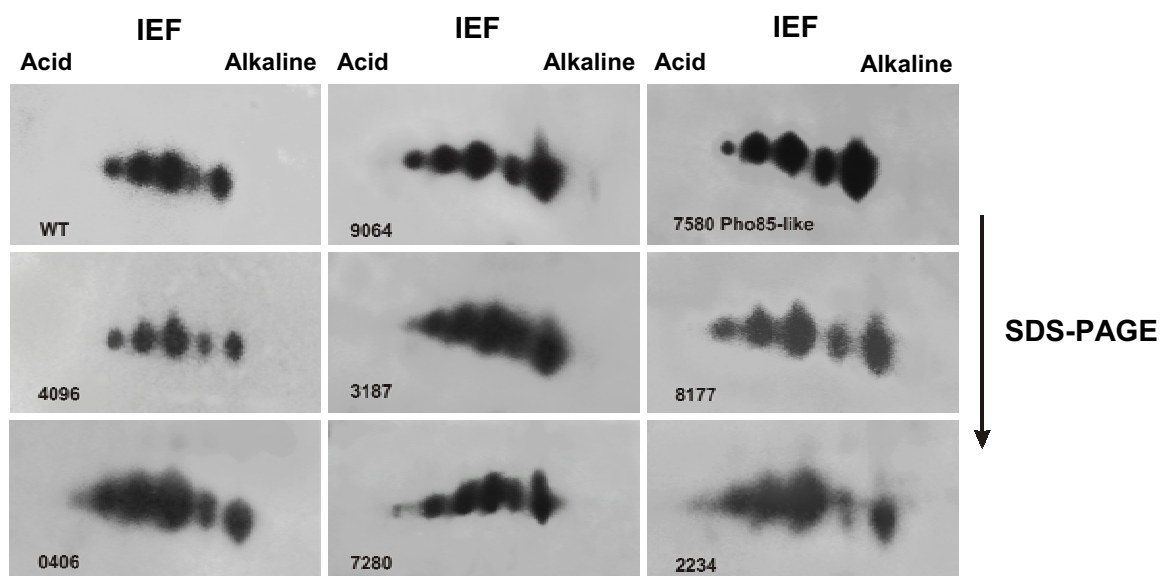


Figura 6. Identificação das isoformas fosforiladas da enzima GSN por *Western blot*. Extratos celulares totais de *N. crassa* linhagem selvagem e mutantes foram submetidos à eletroforese bidimensional seguido de *Western blot* com anticorpos anti-GSN. As linhagens foram crescidas a 30°C, durante 24 h. Os extratos proteicos foram fracionados de acordo com as condições descritas em Materiais e Métodos e as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por *Western blot* utilizando anticorpo anti-GSN. Os números correspondentes de cada ORF são provenientes da sua anotação que se inicia com NCU0. IEF, focalização isoeletrica.

levou a um aumento na formas menos fosforiladas da enzima GSN, sob as condições estudadas. As linhagens mutantes que apresentaram um perfil semelhante ao da selvagem foram as mutantes nas ORFs NCU04096 e NCU08177, sugerindo que a enzima GSN não apresenta modificações nas suas isoformas de fosforilação.

Como salientado anteriormente, em *S. cerevisiae* a proteína Pho85p quando ligada à ciclina Pcl10p fosforila diretamente Gsy2p (HUANG et al., 1998). Em *N. crassa*, a proteína ortóloga a Pho85p (ORF NCU07580) também foi mostrada regular os níveis de glicogênio (figura 5), a atividade GSN (Tabela 3) e o estado de fosforilação da GSN (figura 6), sugerindo fortemente que esta proteína deve ser uma proteína quinase candidata à fosforilação direta da enzima GSN. Considerando estes resultados decidimos produzir, na forma recombinante, as proteínas ortólogas a Pho85p e Pcl10p de *N. crassa* para a realização de ensaios futuros de fosforilação *in vitro*, visando comprovar se estas proteínas foram um complexo ativo na fosforilação direta de GSN.

4. Clonagem das ORFs codificadoras das proteínas ortólogas às ciclinas Pcl8p e Pcl10p e subclonagem em vetores de expressão

Utilizando a ferramenta *Blast* iniciamos a busca no banco de dados de *N. crassa* por proteínas ortólogas às ciclinas Pcl8p e Pcl10p. Utilizando essas sequências como *query*, apenas a sequência da proteína Pcl10p resultou em uma única ORF de *N. crassa*, a NCU08772 com *e-value* de 1.28653E-11. Análises adicionais foram realizadas com a sequência codificadora da ORF NCU08772 contra os bancos de dados do fungo *N. crassa* e do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) utilizando vários parâmetros que a matriz propicia, e nenhuma proteína adicional foi encontrada com valores melhores de *e-value*. A proteína identificada no banco dados de *N. crassa* está anotada como *cyclin-dependent protein kinase complex component*, sugerindo que se trata de uma ciclina parceira de proteína quinase. Além disso, o produto da ORF NCU08772 apresentou 32% de identidade à Pcl10p de *S. cerevisiae*.

Alinhamentos de sequências de aminoácidos das proteínas de *N. crassa* semelhantes à Pho85 e Pcl10p de *S. cerevisiae* estão mostrados na figura 7. Como podemos verificar na figura 7A, o produto da ORF NCU07580 corresponde à proteína Pho85, baseado na alta identidade de aminoácidos entre as duas proteínas e devido à presença de alguns domínios conservados característicos de Cdks. Este resultado havia sido obtido em outro trabalho no laboratório (Avaca, 2007). Em relação à proteína codificada pela ORF NCU08772, o alinhamento de sequências mostrou a presença de alguns aminoácidos conservados mais próximos da extremidade C-terminal, como demonstrado na figura 7B. A clonagem desta ORF

NCU07580 1 MDGRKHPS[SS]FQ[LE]KLGE[GT]YATV[FKGR]NR[QT]GEL[VA]LKEI[HL]DSEEGTPSTAIREISLM
Pho85p 1 ---MSSSS[QF]K[LE]KLGN[GT]YATV[YKLN]KT[TC]VY[VA]LKEV[KL]DSEEGTPSTAIREISLM

NCU07580 61 [KEL]KHENI[VA]LH[DVI]HTEN[KL]ML[VFE]YMD[GDL]KKFMD[INGE]---RG[AL]KPHV[IK]SFMH[QL]
Pho85p 58 [KEL]KHENI[VR]LY[DVI]HTEN[KL]TL[VFE]FMD[NDL]KKYMD[SRT]VGNT[PR]GLEL[NL]VKY[FQW]QL

NCU07580 118 [LKG]ID[FCH]KNR[VLHR]DLKPQ[NLL]INSK[GAL]KLGD[FGL]ARAF[GIP]VNTF[SNE]VVT[LWY]RAP
Pho85p 118 [LQGL]A[FCH]ENK[ILHR]DLKPQ[NLL]INKR[GOL]KLGD[FGL]ARAF[GIP]VNTF[SSE]VVT[LWY]RAP

NCU07580 178 [DVL]LGSRTY[NTS]IDIWSA[GC]I[MAEM]FTGR[PLFP]GTTN[EDQ]IVR[IFR]IMGTPT[ERT]WPGLT
Pho85p 178 [DVL]MGSRTY[STS]IDIWSC[GC]I[LAEM]ITGK[PLFP]GTTN[EEQ]LKL[IFD]IMGT[PNE]SLWPSVT

NCU07580 238 SFPEYKPNWQMYATQSLSS[ILP]-----QIDRDGIDLLQRM[LQLR]PELRISAHDA[LQHH]WF
Pho85p 238 KLPKYNPNIQQRP[PRDL]RQV[LQPH]TKEPLDGNLMD[FLH]GLLQ[LNP]DMRLSAKQAL[HHP]WF

NCU07580 293 NDLVHQQHHHQAQQSMMQQPPMMQQQPMMQQHRYGQGPQPNYEGY
Pho85p 298 AEYYHHAS-----

NCU08772	1	-----MSPNPEHGASAPTDPAAADAECKSDSS-----
Pc110p	1	MDMTKNHTTDTEEFDDGDIRVSLGI VDDYNASFELPLKPKFLQSENFSDLTSEWDQSR
NCU08772	28	-----APATPPAPVPFSADPKLFROIQTSHGESDQDVDDITYKVSPLAALKLLSA
Pc110p	61	NTPGLAEGKTEKAQPCGTTDS SKNRIHVEQLLESANEMNNYLAQNTENTNNFQVGLLNGG
NCU08772	78	GIETLVSFTGDIPPTPPRSPITIPHMRGMDAEKQSIVRSNSEKNLARLLQOKSATNSPRR
Pc110p	121	KGLYSSMGDDSSACINGTNFSSSTSNFELSDDELEDTTGCTSSIFDKDLFHQQNGLSIPRR
NCU08772	138	--PFSPAPQR-----HPPPPPSREGHKQ
Pc110p	181	RSPLFKSPITASFEIGDATDVEEQDIDDSIFSECSSITSFDMGGLHISLPHDEEEDQEKT
NCU08772	159	SQSIDGVQLRTPNPTPPGLSSSDAKSALEPYIIVGENSQPLNTQHSATIRK-----F
Pc110p	241	SESENPLLHGIPVDVEVPHISVDEALANFKETIELLLKLSGNRKCTGFNTRVEKKEYSNF
NCU08772	212	YSRLPPPTISITDYLLRIHQYCPMSTAVYLAASLYTHRLATIER-----AIVVTKRNAH
Pc110p	301	YMKSKPTLSSADFLKRIQDKCEYQPTVYLVATFLIDTLFTRDGNNILQLKLNQLQEKEVH
NCU08772	265	RLLLAGIRVAMKALEDLSYPHSKFAKVGCVSETELARLEISFCFLVGFELRVDEEALRGQ
Pc110p	361	RMIIAAVRLSTKLLEDFVHSHHEYFSKVCGISKRLLTKLEVSLLICVCNTKLMVSNRKLAA
NCU08772	325	WEMLKSGVEAWEGVEHDFYGKREVITLRNPFFGREGMQAEAAAAEA
Pc110p	421	SKLLLLNELRSFCV-----

Figura 7. Alinhamento múltiplo de sequência polipeptídicas. **A.** Sequências polipeptídicas da proteína codificada pela ORF NCU07580 de *N. crassa* com a proteína Pho85p de *S. cerevisiae* (Ypl031cp). *Domínio rico em glicina, **Domínio PSTAIRE e ***Domínio T-Loop. **B.** Sequências polipeptídicas da proteína codificada pela ORF NCU08772 de *N. crassa* com a proteína Pcl10p de *S. cerevisiae* (Ygl134wp). Em preto estão representados os resíduos de aminoácidos idênticos e em cinza as trocas conservativas. O alinhamento das seqüências foi realizado com o programa ClustalW2 e a identificação foi realizada com o programa Boxshade Server 3.21.

foi realizada através da amplificação utilizando oligonucleotídeos específicos para a posterior produção da proteína recombinante. Como a proteína quinase homóloga a Pho85p (produto da ORF NCU07580) de *S. cerevisiae*, a qual foi demonstrada como uma das quinases que fosforila a enzima GS em levedura foi identificada em nosso *screening*, também realizamos a clonagem desta ORF visando a produção da proteína recombinante.

A amplificação dos cDNAs foi realizada por RT-PCR a partir de RNA total. De uma forma resumida, este processo se baseia na reação de síntese de cDNA utilizando a enzima transcriptase reversa, a partir do RNA total, seguido por uma reação de amplificação por PCR onde o cDNA foi utilizado como molde. Pares de oligonucleotídeos específicos para cada ORF foram utilizados nas reações de amplificação, os quais estão apresentados na Tabela 2 (Materiais e Métodos). O produto da amplificação da ORF NCU08772 (1.110 pb) foi purificado e confirmado por análise de restrição com a enzima *NdeI* que gerou dois fragmentos de DNA de 305 pb e 805 pb (resultados não mostrados). O fragmento inteiro da ORF NCU07580 (1.014 pb) foi amplificado e confirmado por análise de restrição utilizando a enzima *HindIII* que cliva a ORF em um sítio gerando 2 fragmentos de tamanhos diferentes 238 pb e 776 pb (resultados não mostrados). Os fragmentos amplificados após purificação foram clonados no vetor de clonagem pMOS-Blue originando os plasmídeos pMOS-7580 e pMOS-8772. Os cassetes de DNA correspondentes aos insertos foram transferidos das construções pMOS-7580 e pMOS-8772 para o vetor de expressão pET28a. O inserto correspondente a ORF NCU07580 (1.014 pb) foi transferido para o vetor pET28a através da digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI*, em duas etapas descritas em Materiais e Métodos. O inserto correspondente a ORF NCU08772 (1.110 pb) foi transferido para o vetor de expressão pET28a por digestão com as enzimas *NheI* e *EcoRI*. As construções plasmidiais resultantes foram pET-8772 e pET-7085. Amostras das construções plasmidiais de clones considerados positivos foram confirmadas através de sequenciamento de DNA e armazenados a -80°C para a continuidade do trabalho.

5. Ensaios de produção e análise de solubilidade das proteínas recombinantes

Para a produção das proteínas recombinantes os plasmídeos pET-7580 e pET-8772, foram utilizados para transformar diferentes linhagens de *E. coli*. As culturas celulares de *E. coli* BL21(DE)pLys-S e *E. coli* BL21Rosetta(DE3)pLys-S foram induzidas com uma concentração final de 0,4 mM de IPTG e amostras foram coletadas antes e depois de 4 h de indução a 37 °C. A linhagem ArcticExpress(DE3) foi induzida com uma concentração final de 0,4 mM de IPTG e as amostras foram coletadas antes e depois de 24 h de indução a 12 °C. Células das culturas induzidas foram coletadas e lisadas em tampão de lise e centrifugadas para a separação do sobrenadante (S) e do precipitado (P) para verificar a solubilidade das proteínas. Os experimentos de indução das proteínas recombinantes foram realizados juntamente com os

controles negativo (pET28a vazio) e positivo (pET-XAC3091 e pET-XAC3631). Os controles positivos produzem as proteínas CutC (Massa Molecular esperada de 29 kD) e CopB (Massa Molecular esperada de 40 kD), respectivamente, de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, ambas fusionadas à cauda poli-His. As figuras 8, 9 e 10A mostram os resultados das análises da expressão das proteínas His-8772 e His-7580 em SDS-PAGE, gel 12%. A proteína His-8772 (Pcl10p-like) (indicada pelas setas nas figuras) se mostrou presente tanto na fração solúvel e no precipitado, embora em pequena quantidade em todas as linhagens de bactéria testadas. Além disso, o resultado de *Western blot* confirmou a presença da banda referente à proteína His-8772 (Pcl10-like), com aproximadamente 40 kD, como mostrado na figura 10B. Embora produzida em pequena quantidade, na forma solúvel, esta proteína deverá ser posteriormente purificada por cromatografia de afinidade.

As figuras também mostram os resultados da expressão da proteína His-7580 (Pho85-like), revelando a presença de uma banda correspondente à Massa Molecular esperada da proteína (37 kD). A identificação da proteína por *Western blot* comprovou que a proteína His-7580 (Pho85-like) se apresenta na forma solúvel e em alta concentração nas condições de indução utilizadas, como mostrado na figura 10B. A partir desses resultados, optou-se por seguir os ensaios de purificação com as proteínas Pho85-like e Pcl10-like que apresentaram alta solubilidade.

6. Purificação da proteína recombinante Pho85-like

Com o objetivo de obter a proteína recombinante pura para posteriormente dar início aos ensaios de fosforilação *in vitro*, a purificação da proteína Pho85-like foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando as resinas de Ni²⁺-NTA agarose e His-Select Cobalt Affinity Gel, a qual nos permite purificar uma proteína rapidamente e de maneira simplificada utilizando centrifuga de bancada. Para isso, a proteína foi produzida em pequena escala (200 mL de cultura partindo do pré-inóculo) através da indução a 37 °C com 0,4 mM de IPTG durante 4 h e purificada como descrito em Materiais e Métodos. As figuras 11 e 12 mostram três géis de SDS-PAGE 12% da proteína Pho85-like nas diferentes etapas da purificação com resina de Ni²⁺-NTA agarose e His-Select Cobalt Affinity Gel. Podemos observar que mesmo nas frações de lavagem (FT, *flow through*) ocorreu a perda da proteína recombinante. Com o aumento na concentração de imidazol aumentou, conseqüentemente, o grau de pureza como demonstrado na figura 11. A repurificação com a resina His-Select Cobalt Affinity Gel, das frações após a diálise, está mostrada na Figura 12. Pode ser observado que a proteína está livre de contaminantes aumentando consideravelmente a eficiência da purificação. Pode-se

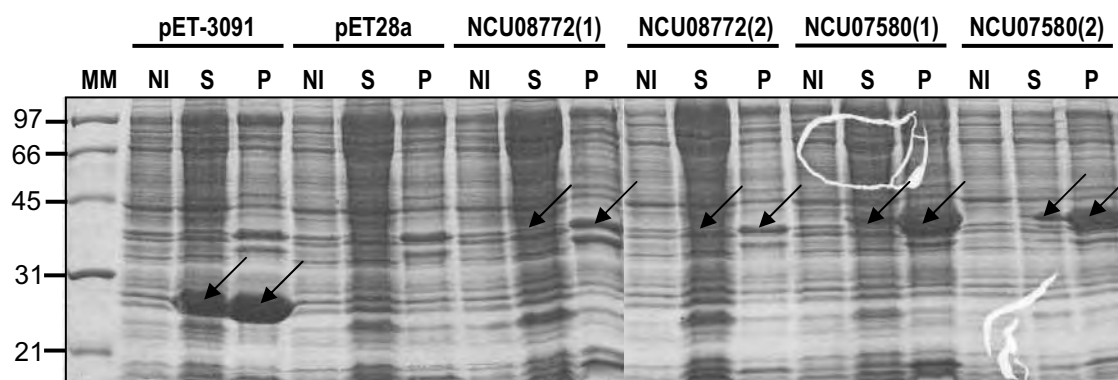


Figura 8. Análise da expressão em *E. coli* BL21(DE)pLys-S das proteínas His-8772 e His-7580. **NI**, amostra não-induzida; **S**, sobrenadante, **P**, precipitado. Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-8772, clones 1 e 2 [NCU08772(1) e NCU08772(2)], o plasmídeo pET-7580, clones 1 e 2 [NCU07580(1) e NCU7580(2)] e pET-28a [controles positivo (CutC) e negativo]. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes com as MM aproximadas de 40 kD (His-8772) e 37 kD (His-7580). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. Os números à esquerda do gel expressam as Massas Moleculares em kD.

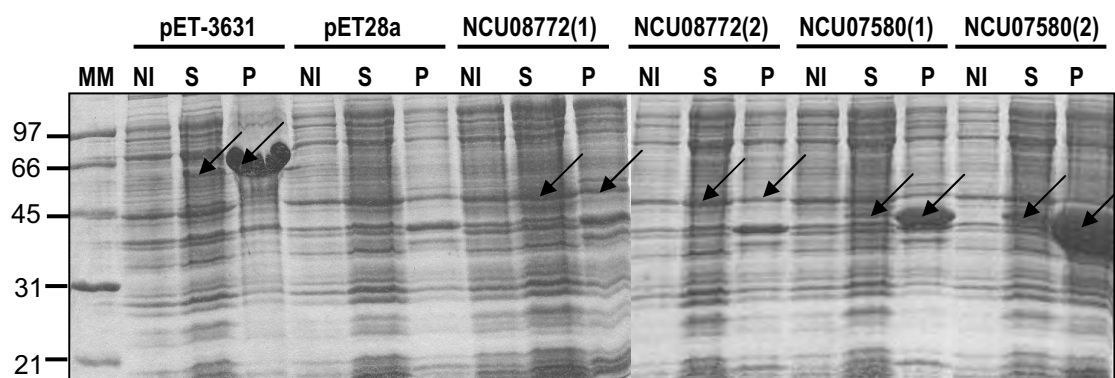


Figura 9. Análise da expressão em *E. coli* BL21Rosetta(DE3)pLys-S das proteínas His-8772 e His-7580. **NI**, amostra não-induzida; **S**, sobrenadante, **P**, precipitado. Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-8772, clones 1 e 2 [NCU08772(1) e NCU08772(2)], o plasmídeo pET-7580, clones 1 e 2 [NCU07580(1) e NCU7580(2)] e pET-28a [controles positivo (copB) e negativo]. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes com as MM aproximadas de 40 kD (His-8772) e 37 kD (His-7580). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-25. Os números à esquerda do gel expressam as Massas Moleculares em kD.

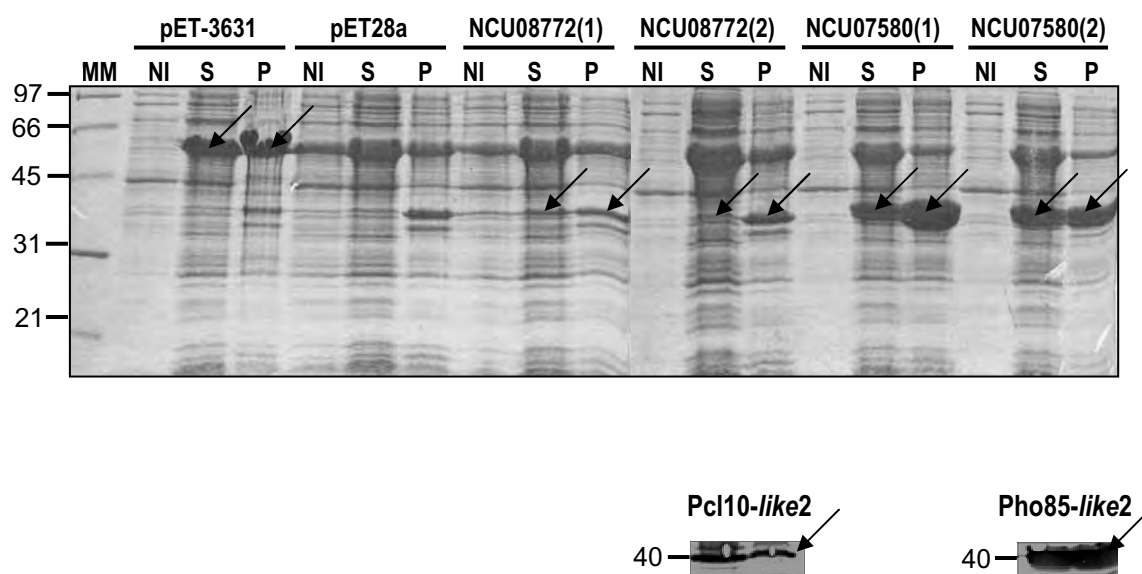


Figura 10. Análise da expressão em *E. coli* ArcticExpress(DE3) das proteínas His-8772 e His-7580. **NI**, amostra não-induzida; **S**, sobrenadante, **P**, precipitado. Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-8772, clones 1 e 2 [NCU08772(1) e NCU08772(2)], o plasmídeo pET-7580, clones 1 e 2 [NCU07580(1) e NCU7580(2)] e pET-28a [controles positivo (copB) e negativo]. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes com as MM aproximadas de 40 kDa (His-8772) e 37 kDa (His-7085). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. **(B)** Análise por *Western blot*. As proteínas, após eletroforese, foram transferidas para membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpo anti-His. As setas indicam as bandas correspondentes às proteínas recombinantes com aproximadamente 40 kD (Pcl10-like2), 37 kDa (Pho85-like2) e a proteína controle positivo CopB. Os números à esquerda do gel expressam as Massas Moleculares em kD.

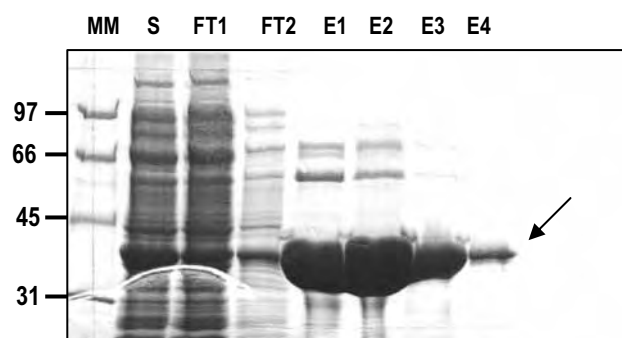


Figura 11. Purificação da proteína Pho85-like produzida em *E. coli* utilizando resina de Ni^{2+} -NTA. **MM**- massa molecular, **S**- sobrenadante, **FT1** e **FT2**- flow through. Eluição com **E1**, 100 mM de imidazol, **E2**, 200 mM de imidazol, **E3**, 300 mM de imidazol e **E4**, 500 mM de imidazol. SDS-PAGE 12%. A seta aponta a banda correspondente à proteína recombinante. Os números à esquerda do gel expressam a Massa Molecular das proteínas em kD.

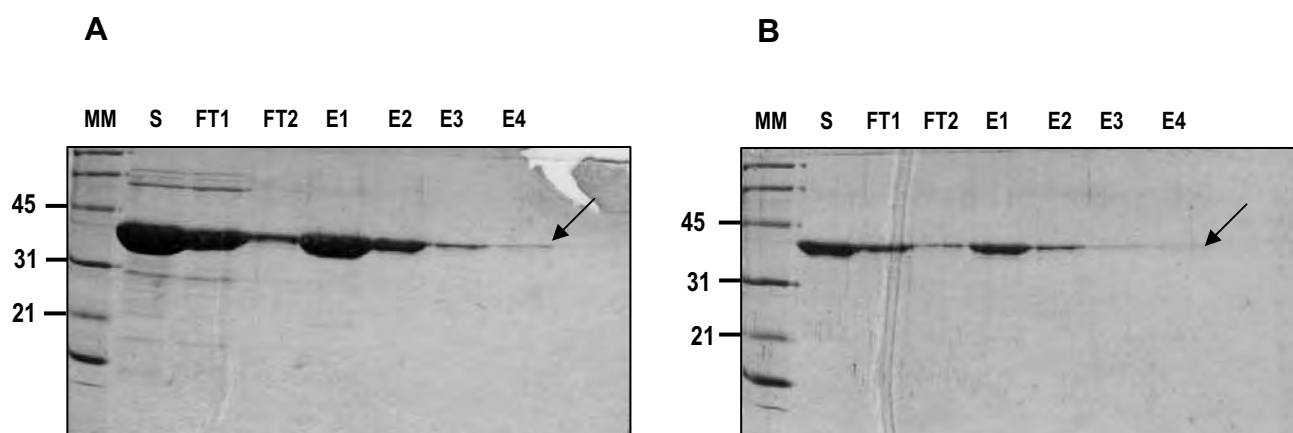


Figura 12. Repurificação da proteína Pho85-like produzida em *E. coli* a partir das frações purificadas com resina de Ni^{2+} -NTA (Figura 11) utilizando a resina His-Select Cobalt Affinity Gel. **(A)** Junção das frações E1 e E2 da purificação com resina de Ni^{2+} após diálise. Eluição com **E1**, 100 mM de imidazol, **E2**, 200 mM de imidazol, **E3**, 300 mM de imidazol e **E4**, 500 mM de imidazol. **(B)** Junção das frações E3 e E4 (Figura 11). Eluição com **E1**, 100 mM de imidazol, **E2**, 200 mM de imidazol, **E3**, 300 mM de imidazol e **E4**, 500 mM de imidazol. **MM**- massa molecular, **S**- sobrenadante, **FT1** e **FT2**- flow through. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. A seta aponta a banda correspondente à proteína recombinante. Os números à esquerda do gel expressam a Massa Molecular das proteínas em kD.

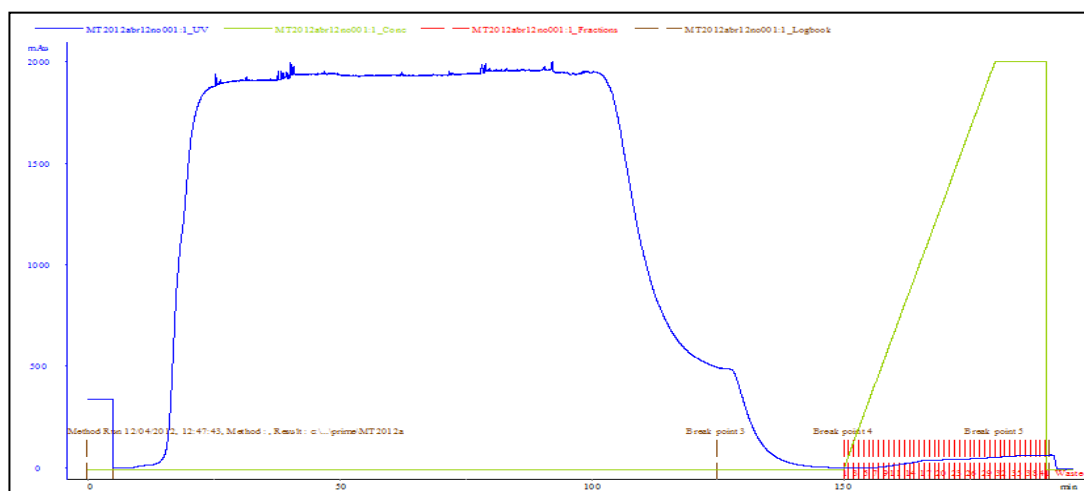
afirmar que a proteína está com um grau de pureza elevado, e em quantidades suficientes para a execução dos ensaios de fosforilação *in vitro* que serão realizados futuramente.

7. Purificação da proteína recombinante Pcl10-like

Com o objetivo de obter a proteína recombinante com alto grau de pureza para posteriormente dar início aos ensaios de fosforilação *in vitro* junto com a proteína Pho85p-like, a purificação da proteína Pcl10-like foi inicialmente realizada por cromatografia de afinidade utilizando-se uma resina de NiNTA agarose, como realizado para a proteína Pho85p-like. Para isso, a proteína foi produzida em pequena escala (200 mL de cultura partindo do pré-inóculo) através da indução a 37 °C. Após indução, as células foram coletadas e ressuspensas em tampão de lise conforme descrito em Materiais e Métodos. Entretanto, esta metodologia não se mostrou adequada para a purificação desta proteína devido à perda da mesma durante o procedimento e, portanto, foi descartada. Pode-se afirmar que é um método simples de purificação, entretanto para esta proteína não foi possível de ser utilizado. A purificação por cromatografia de afinidade utilizando o sistema de purificação AKTA Prime e cultura de 1 L (grande escala) foi utilizado.

Para a purificação das proteínas em maior escala, as condições de indução apresentadas na análise da solubilidade foram mantidas e um gradiente linear de concentração de imidazol foi aplicado na fase de eluição. O perfil de eluição da proteína Pcl10-like é mostrado na figura 13A. A figura 13B mostra as frações da cromatografia obtidas após eluição, na qual foi possível observar que a proteína foi purificada com bom grau de pureza e concentração a partir da fração 10 e a proteína purificada foi mantida até as frações eluídas finais. Com essa concentração e grau de pureza será possível executar futuramente os ensaios de fosforilação *in vitro* utilizando as proteínas recombinantes e a proteína GSN recombinante inteira e mutantes nos diferentes sítios de fosforilação.

A



B

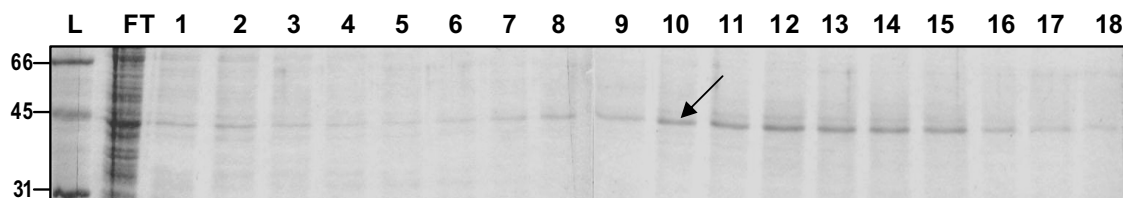


Figura 13. Purificação da proteína Pcl10-like produzida em *E. coli* em grande escala. **(A)** Perfil de eluição da proteína recombinante. **(B)** Análise das frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%. A seta indica as bandas correspondentes à proteína recombinante com aproximadamente 40 KDa. Os números à esquerda do gel expressam as Massas Moleculares aproximadas das proteínas em kDa.

Conclusões

As principais conclusões deste trabalho foram:

Dentre as 55 linhagens nocauteadas em proteínas quinases analisadas neste trabalho, 27 apresentaram alteração no conteúdo de glicogênio na condição normal de crescimento e/ou quando submetidas ao choque térmico. As proteínas ausentes nas linhagens mutantes podem estar envolvidas no controle da síntese e/ou degradação deste carboidrato através da fosforilação direta ou indireta das enzimas regulatórias glicogênio sintase e/ou glicogênio fosforilase.

Das 27 proteínas identificadas, apenas 8 delas correspondem a proteínas com funções já descritas na literatura e apenas uma proteína foi descrita no controle do metabolismo do glicogênio até o presente momento.

Das 27 linhagens mutantes selecionadas, 14 linhagens apresentaram a relação de atividade GSN +/- G6P aumentada quando comparada com a linhagem selvagem na mesma condição de crescimento. Isto indica que o estado de fosforilação da enzima GSN é modificado quando as proteínas quinases estão ausentes, sugerindo serem prováveis quinases que regulam o estado de fosforilação da GSN.

Das 14 linhagens que apresentaram relação de atividade aumentada, 8 linhagens foram selecionadas para a análise das isoformas fosforiladas da enzima GSN presentes nestas linhagens. Foi mostrado que 6 apresentaram alterações no perfil de fosforilação da enzima GSN indicando que estas quinases estão envolvidas ou diretamente ou através de outras vias no controle da fosforilação da enzima GSN na situação ambiental estudada.

Como resultado da análise das linhagens que apresentaram alterações no estado de fosforilação da enzima GSN, a proteína *Pho85-like* mostrou ser uma forte candidata a uma quinase que fosforila diretamente a enzima GSN.

Uma proteína ortóloga à ciclina Pcl10p, a qual é a ciclina parceira da proteína quinase Pho85p em *S. cerevisiae* foi identificada através de análises de *Blast*. A linhagem mutante nesta proteína deverá confirmar o papel da mesma na regulação do acúmulo de glicogênio.

Tanto a proteína *Pho85-like* como *Pcl10-like* ligadas a His-Tag foram produzidas na forma recombinante em *E. coli* e purificadas utilizando cromatografia de afinidade. Com as proteínas puras será possível realizar futuramente ensaios de fosforilação *in vitro* para verificar a ação do complexo na fosforilação direta de GSN.

Referências

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2004.

AVACA, J. S. **A proteína quinase dependente de ciclina NcPHO85 de *Neurospora crassa*. Estudos de caracterização molecular e bioquímica**. 2007. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

AZEVEDO, J. L. Fungos: genética e melhoramento de fungos na biotecnologia. **Biotecnologia Cienc. Desenvolv.**, v. 1, p. 12-15, maio 1997.

BARBOSA, L. C. B. **Caracterização parcial dos sítios de fosforilação da enzima glicogênio sintase de *Neurospora crassa***. 2007. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

BERTOLINI, M. C.; FREITAS, F. Z.; DE PAULA, R. M.; CUPERTINO, F. B.; GONÇALVES, R. D. **Glycogen metabolism regulation in *Neurospora crassa***. 2012. DOI 10.1007/978-94-007-4264-2_3.

BJELLQVIST, B.; PASQUALI, C.; RAVIER, F.; SANCHEZ, J. C.; HOCHSTRASSER, D. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. **Electrophoresis**, v. 14, p. 1357-1365, 1993.

BORKOVICH, K. A.; ALEX, L. A.; YARDEN, O.; FREITAG, M.; TUNNER, G. E.; READ, N. D.; SEILER, S.; BELL-PEDERSEN, D.; PAIETHA, J.; PLESOFKY, N.; PLAMNN, M.; GOODRICH-TANRIKULU, M.; SHUTLE, U.; MANNHAUPT, G.; NARGANG, F. E.; RADFORD, A.; SELITRENNIKOFF, C.; GALAGAN, J. E.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; CATCHSIDE, D.; INOUE, H.; ARAMAYO, R.; POLYMENIS, N.; SELKER, E. U.; SACHS, M. S.; MARZLUF, G. A.; PAULSEN, I.; DAVIS, R.; EBBOLE, D. J.; ZELTER, A.; KALKMAN, E. R.; O'ROUKER, R.; BOWNRING, F.; YADEON, J.; ISHII, C.; SUZUKI, K.; SAKAI, W.; PRATT, R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. R.**, v. 68, n. 1, p. 1-108, Mar. 2004.

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

CARROLL, A. S.; O'SHEA, E. K. Pho85 and signaling environmental conditions. **Trends Biochem. Sci.**, v. 27, n. 2, p. 87-93, Feb. 2002.

,
COOB, M. H. MAP kinase pathways. **Progr. in Biophys. Mol. Bio.**, v. 71, n. 4, p. 479-500, Apr. 1999.

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

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

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

DVASH, E.; KRA-OZ, G.; ZIV, C.; CARMELI, S.; YARDEN, O. The NDR Kinase DBF-2 is involved in regulation of mitosis, conidial development, and glycogen metabolism in *Neurospora crassa*. **Eukaryot. Cell**, v. 9, n. 4, p. 502-513, Apr. 2010.

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

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

FISCHER, E. H.; KREBS, E. G. Conversion of phosphorylase *b* to phosphorylase *a* in muscle extracts. **J. Biol. Chem.**, v. 216, n. 1, p. 121-131, Sept. 1955.

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

FRANCHI, L.; FULCI, V.; MACINO, G. Protein kinase C modulates light responses in *Neurospora* by regulating the blue light photoreceptor WC-1. **Mol. Microbiol.**, v. 56, n. 2, Jan. 2005.

FREITAS, F. Z.; DE PAULA, R. M.; BARBOSA, L. C. B.; TERENCE, H. F.; BERTOLINI, M. C. cAMP signaling pathway controls glycogen metabolism in *Neurospora crassa* by regulating the glycogen synthase gene expression and phosphorylation. **Fungal Genet. Biol.**, v. 47, n. 1, p. 43-52, Jan. 2010.

FUJIMURA, M.; OCHIAI, N.; OSHIMA, M.; MOTOYAMA, T.; ICHIISHI, A.; USAMI, A.; HORIKOSHI, K.; YAMAGUCHI, I. Putative homologs of Ssk2 MAPKK Kinase and PBS2 MAPK Kinase of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by os-4 and os-5 genes for osmotic sensitivity and fungicide resistance in *Neurospora crassa*. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 67, n. 1, p. 186-191, Aug. 2002.

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

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

GOLIAS, C. H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOULOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **Int. J. Clin. Pract.**, v. 58, n. 12, p. 1134-1141, Dec. 2004.

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

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

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

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

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

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

JOHNSON, L. N. The regulation of protein phosphorylation. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 37, n. 4, p. 627-641, Aug. 2009.

KAFFMAN, A.; HERSKOWITZ, I.; TJIAN, R.; O'SHEA, E. K. Phosphorylation of the transcription factor PH04 by a Cyclin-CDK complex, PH080-PH085. **Science**, v. 263, n. 12, p. 1153-1156, Feb. 1994.

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

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.

LAMB, T. M.; GOLDSMITH, C. S.; BENNETT, L.; FINCH, K. E.; BELL-PEDERSEN, D. Direct transcriptional control of a p38 mapk pathway by the circadian clock in *Neurospora crassa*. **Plos. One**, v. 6, n. 11, p. 1-12, Nov. 2011.

LEE, P.; CHO, B.; JOO, H.; HAHN, J. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. **Mol. Microbiol.**, v. 70, n. 4, p. 882-895, Oct. 2008.

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

MANNING, G.; WHYTE, D. B.; MARTINEZ, R.; HUNTER, T.; SUDARSANAM, S. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1912-1934, Dec. 2002.

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

NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora crassa* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 101, n. 33, p. 12248-12253, Aug. 2004.

NOVENTA-JORDÃO, M. A.; POLIZELI, M. L. 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.

OLSEN, J. V.; BLAGOEV, B.; GNAD, F.; MACEK, B.; KUMAR, C.; MORTENSEN, P.; MANN, M. Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. **Cell**, v. 127, n. 3, p. 635-648, Nov. 2006.

PARK, G.; PAN, S.; BORKOVICH, K. A. Mitogen-activated protein kinase cascade required for regulation of development and secondary metabolism. **Eukaryot. Cell**, v. 7, n. 12, p. 2113-2122, Dec. 2008.

PARK, G.; SERVIN, J.; TUNER, G. E.; ALTAMARIANO, L.; COLOT, H. V.; COLLOPY, P.; LITVINKOVA, L.; LI, L.; JONES, C. A.; DIALA, F.; DUNLAP, J. C.; BORKOVICH, K. A. Global analysis of serine-threonine protein kinase genes in *Neurospora crassa*. **Eukaryot. Cell**, v. 10, n. 11, p. 1553-1564, Nov. 2011.

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

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

PU, R. T.; XU, G.; WU, L.; VIERULA, J.; O'DONNELL, K.; YE, X. S.; OSMANI, S. A. Isolation of a functional homolog of the cell cycle-specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. **J. Biol. Chem.**, v. 270, n. 30, p. 18110-18116, May 1995.

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

- ROACH, P. J. Glycogen and its metabolism. **Curr. Mol. Med.**, v. 2, n. 2, p. 101-120, Mar. 2002.
- ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; HURDLEY, T. D.; TAGLIABRACCHI, V. S. Glycogen and its metabolism: some new developments and old themes. **Biochem. J.**, v. 441, n. 15, p. 763-787, Jan. 2012.
- ROELANTS, F. M.; TORRANCE, P. D.; BEZMAN, N.; THORNER, J. Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 4, p.3005-3028, Sept. 2002.
- RUTTER, J.; PROBST, B. L.; McKNIGHT, S. L. Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. **Cell**, v.111, n. 1, p. 17-28, Oct. 2002.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHULTE, U.; BECKER, I.; MEWES, H. W.; MANNHAUPT, G. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, v. 84, n. 1, p. 3-13, Mar. 2002.
- SELKER, E. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. **Annu. Rev. Genet.**, v. 24, p. 579-613, Dec. 1990.
- SILVA, B. V.; HORTA, B. A. C.; ALENCASTRO, R. B.; PINTO A. C. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quim. Nova**, v. 32, p. 453-462, fev. 2009.
- SKURAT, A. V.; WANG, Y.; ROACH, P. J. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 41, p. 25534-25542, Oct. 1994.
- 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.
- THEVELEIN, J. M. Regulation of trehalose mobilization in fungi. **Microbiol. Reviews**, v. 48, n. 1, p. 42-59, Mar. 1984.
- THOMAS, J. A.; SHLENDER, K. K.; LARNER, J. A rapid filter paper assay for UDP glucoseglycogen glycosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glycose. **Anal. Biochem.**, v. 25, p. 486-499, Feb. 1968.

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

TIMBLIN, B. K.; TATCHELL, K.; BERGMAN, L. W. Deletion of the gene encoding the cyclin-dependent protein kinase Pho85 alters glycogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, v. 143, n. 1, p. 57-66, 1996.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiol. Genet. Bull.**, n. 20, v. 13, p. 42-43, 1956.

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

WALSH, D. A.; PERKINS, J. P.; KREBS, E. G. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. **J. Biol. Chem.**, v. 243, n. 13, p. 3763-3765, July 1968.

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

WANG, Z.; WILSON, W. A.; FUJINO, M. A.; ROACH, P. J. The yeast cyclins Pcl6p and Pcl7p are involved in the control of glycogen storage by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. **FEBS Lett.**, v. 506, n. 1, p. 277-280, Sept. 2001b.

WILSON, W. A.; WANG, Z.; ROACH, P. J. Regulation of yeast glycogen phosphorylase by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. **Bioch. Bioph. Res. Co.**, v. 329, n. 20 p. 161-167, 2005.

WILSON, W. A.; ROACH, P. J.; MONTERO, M.; BAROJA-FERNÁNDEZ, E.; MUÑOZ, F. J.; EYDALLIN, G.; VAILE, A. M.; ROMERO-POZUETA, J. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, n. 6, p. 952-985, Nov. 2010.

YU, S.; MEI, C. J.; LEE, C.; CHENG, X. Probing cAMP-dependent protein kinase holoenzyme complex I α and II β by FT-IR and chemical protein footprint. **Biochemistry**, v. 43, n. 7, p. 1908-1920, Jan. 2004.