

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

**Caracterização Funcional de Fatores de
Transcrição Hipotéticos de *Neurospora crassa***

Aluna: Flávia Adolfo Corrocher

Orientadora: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

2012

FLÁVIA ADOLFO CORROCHER

**Caracterização Funcional de Fatores de
Transcrição Hipotéticos de *Neurospora crassa***

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**

FICHA CATALOGRÁFICA

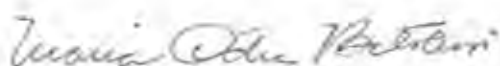
C825c	<p>Corrocher, Flávia Adolfo</p> <p>Caracterização funcional de fatores de transcrição hipotéticos de <i>Neurospora crassa</i> / Flávia Adolfo Corrocher. - Araraquara : [s.n], 2012</p> <p>101 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química</p> <p>Orientador: Maria Célia Bertolini</p> <p>1. Biotecnologia. 2. Proteínas. 3. Expressão gênica. 4. <i>Neurospora crassa</i>. I. Título.</p>
-------	---

FLÁVIA ADOLFO CORROCHER


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

Araraquara, 16 de janeiro de 2012.

BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Cleslei Fernando Zanelli
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



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

Dados curriculares

Flávia Adolfo Corrocher

1. Dados pessoais

Filiação: Nivaldo Aparecido Corrocher e Marta Adolfo Corrocher

Nascimento: 28 de janeiro de 1987- Araras-SP, Brasil

Documento de Identidade: 43.777.585-9

Cadastro de Pessoa Física: 365.302.428-56

Endereço Pessoal: Rua Irineu Carpini, 51 – Vila Queiróz
CEP: 13600-499- Araras- SP

Endereço Profissional: Instituto de Química de Araraquara- UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
Rua Prof. Francisco Degni s/n – 14.800-900 Araraquara-SP

Profissão: Biomédica

2. Formação acadêmica

2009-2011: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Título: Caracterização funcional de fatores de transcrição hipotéticos de *Neurospora crassa*. Orientador: Maria Célia Bertolini, Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

2005-2008: Graduação em Biomedicina, Fundação Hermínio Ometto- UNIARARAS, São Paulo, Brasil.

3. Atividades de Pesquisa

3.1. Trabalho apresentado em congresso

CORROCHER, F.C.; GONÇALVES, R. D.; CUPERTINO, F. B.; BERTOLINI, M. C. Functional characterization of hypothetical transcription factors. In: XL Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Foz do Iguaçu 2011.

3.2. Participação em eventos

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

Evento: “PROTEIN DAY GE Healthcare”, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara 2011.

Seminário: “Pipetas Gilson: como aumentar a vida útil e obter melhores resultados, Instituto de Química, UNESP-Araraquara, 2010

SBG- Sociedade Brasileira de Genética- IX Simpósio Nacional de Biologia Molecular Aplicada à Medicina, São Paulo, 2008

Curso de Perícia Criminal, São Paulo-SP, 2008

1º Simpósio de Diagnósticos Moleculares da Uniararas, 2008.

3º Feira Das Profissões da Uniararas, 2007.

Monitoria no Curso de Especialização em Análises Clínicas: “*Agentes antimicrobianos: recomendações, uso terapêutico e profilático; resistência aos fármacos*”, Uniararas, 2007

Workshop de Biotecnologia - Uniararas, 2006.

Comemoração solene do Dia do Biomédico, Brasília, 2005

Jornada Integrada da Uniararas- JIU, 2005.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Marta e Nivaldo, que sempre me ensinaram a conduzir pelo melhor caminho, o qual permitiu meu aprendizado e amadurecimento pessoal. Eles sempre foram meus exemplos de vida para que hoje eu me tornasse a pessoa que sou.

À minha irmã Paula, que esteve presente durante a realização deste trabalho e em todos os momentos que precisei dela, pelo companheirismo, amor, respeito e amizade.

Ao meu namorado Saulo, que sempre me levantou nos momentos difíceis com sua palavra amiga, por me proporcionar momentos maravilhosos durante esses anos, por todo carinho, amor, compreensão e principalmente paciência.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, pela oportunidade de trabalho, pelos ensinamentos, paciência, confiança e por me fazer entender como realmente funciona um trabalho de pesquisa.

Ao pessoal do laboratório, Eliane, Thiago, Fernanda Cupertino, Fernanda Zanolli, Rodrigo, Susi, Stela e Ana Paula, pelo companheirismo, amizade e por poder compartilhar histórias e muitas, mas muitas risadas! São amigos que com certeza vou levar pra sempre comigo, mesmo estando distantes. Vocês são muito especiais!

Aos amigos que passaram pelo laboratório, Amanda, Henrique, Vivi e Mônica, que também marcaram e fizeram parte dessa fase da minha vida. Pela amizade, conversas, risadas e momentos vividos juntos.

Aos técnicos de laboratório, Fátima, Waldenir, Fernando, Zilda e especialmente ao Tarsício, por ser essencial na rotina do laboratório e estar sempre bem humorado.

Aos companheiros de trabalho, Messias, Heloisy e Eric, por compartilhar os momentos de descontração no laboratório, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus pais, minha irmã e meu namorado por todo carinho, atenção, amor e por acreditarem na minha capacidade.

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

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

"É impossível avaliar a força que possuímos sem medir o tamanho do obstáculo que podemos vencer, nem o valor de uma ação sem sabermos o sacrifício que ela comporta."

H. W. Beecher

"Vencer é acreditar nas pessoas e saber que por mais difícil que alguém possa parecer, há sempre uma intenção positiva para consigo. Vencer é ter a esperança sempre renovada, lembrando que o sol nasce todos os dias e para todos. Vencer é ter um sentimento profundo de fé, força e perseverança mesmo em momentos difíceis."

Flavio Souza

Resumo

O fungo *Neurospora crassa* é um organismo amplamente utilizado como organismo modelo na compreensão de aspectos fundamentais da biologia dos eucariotos. Nosso laboratório tem utilizado este fungo para estudar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio. A avaliação de uma coleção de linhagens mutantes individualmente nocauteadas em genes que codificam fatores de transcrição permitiu identificar várias proteínas potencialmente envolvidas na regulação do metabolismo do glicogênio neste organismo modelo. As linhagens mutantes selecionadas apresentaram alterações no perfil de acúmulo de glicogênio e expressão do gene que codifica a enzima glicogênio sintase (*gsn*) durante a situação de estresse térmico. Entre estas, as linhagens mutantes nas ORFS NCU03043, NCU01629 e NCU04731, anotadas como proteínas hipotéticas no banco de dados do genoma do fungo, foram selecionadas para o presente estudo. Através de análises de Blast, a proteína codificada pela ORF NCU04731 mostrou ser homóloga ao grupo de fator de transcrição SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein) de mamíferos, que atuam como principal regulador da síntese de colesterol. Estas proteínas possuem domínio transmembrana e são ativadas após clivagem. Uma proteína ortóloga a SREBP (*Sre1*) foi identificada em *Schizosaccharomyces pombe*, entretanto, enquanto a habilidade de resposta a esteróis é conservada, as SREBPs de fungo regulam genes envolvidos na resposta transcricional à hipóxia, sendo necessárias para o crescimento em baixas concentrações de oxigênio. A proteína codificada pela ORF NCU03043 mostrou homologia a proteínas FlbC e FLE1 de fungos, as quais estão envolvidas na conidiação e desenvolvimento asexual. A linhagem *flbC*^{KO} de *N. crassa* apresentou defeitos na progressão do ciclo celular e morfologia e a proteína FLBC é necessária para indução da conidiação e para o crescimento e desenvolvimento normal do fungo. Análise da expressão gênica mostraram que o gene *flbC* foi altamente expresso no início da germinação dos conídios mostrando a importância da proteína para o crescimento vegetativo do fungo. Análises *in silico* revelaram a existência dos *motifs* de DNA *sre1* e *flbC* na região promotora dos genes *gsn* e *gpn*. Os genes que codificam as proteínas foram clonados e as proteínas recombinantes foram produzidas em *E. coli*. A proteína FLBC foi purificada por cromatografia de afinidade e utilizada em ensaios de ligação DNA-proteína utilizando um fragmento de DNA do gene *gpn* contendo o *motif* FLBC descrito em *A. nidulans*. Resultados preliminares não permitiram a identificação de complexo DNA-proteína. O *motif* de ligação para a proteína SRE1 foi analisado usando extrato celular da linhagem selvagem fracionado em cromatografia de afinidade e um fragmento de DNA do promotor *gsn*. Foi verificado que proteínas presentes no extrato foram capazes de se ligar ao fragmento de DNA. Estes resultados deverão ser comprovados.

Palavras-chave: *Neurospora crassa*, proteínas SRE e FLB, expressão gênica, *shift* de DNA, proteína recombinante.

Abstract

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for fundamental aspects of eukaryotic biology. We have been studying the biochemical and molecular mechanisms involved in glycogen metabolism regulation in this fungus. The screening of a set of knocked-out strains in genes encoding transcription factors was previously performed as an attempt to identify transcription factors regulating glycogen metabolism in *N. crassa*. Mutant strains presenting changes in glycogen accumulation and glycogen synthase gene (*gsn*) expression under normal growth temperature and under heat shock stress were selected. Among them, the mutant strains in the ORFs NCU03043, NCU01629 and NCU04731, annotated as hypothetical proteins in the fungus genome database were studied in the present work. By Blast analysis, the proteins NCU04731 showed homology to a group of mammalian transcription factors SREBPs (Sterol Regulatory Element Binding Protein), which act as regulators of cholesterol synthesis and requiring cleavage from the membrane for activation. A SREBP orthologue was identified in *Schizosaccharomyces pombe* (Sre1), however while the ability to respond to sterol is conserved, fungal SREBPs regulates genes involved in the transcriptional response to hypoxia and are required for growth under low-oxygen conditions. The proteins encoded by the ORF NCU03043 showed homology to the fungal proteins FlbC and FLE1 involved in conidiation and asexual development. The *N. crassa flbC^{KO}* strain presented defects in cell cycle progression and morphology. FLBC protein is necessary for proper induction of conidiation and is important for growth and development in *N. crassa*. *flbC* gene expression was highly induced in the early times of conidia germination confirming the importance of this protein to the fungus vegetative growth. *In silico* analysis revealed the presence of the *sre1* and *flbC* DNA motifs in the *gsn* and *gpn* promoters. The genes encoding the proteins were cloned and the recombinant proteins were produced in *E. coli*. The protein FLBC was purified by affinity chromatography and used in DNA-binding assays together a DNA fragment from the *gpn* promoter containing the *A. nidulans* FLBC motif. DNA-protein complex was not observed. A SRE1 putative binding site from the *gsn* promoter was analyzed using chromatographic fractions from wild-type mycelium cellular extract fractionated by affinity chromatography. DNA-protein complexes were observed confirming SRE1 binding to the DNA *cis* element present in the *gsn* promoter.

Keywords: *Neurospora crassa*, SRE and FLB proteins, gene expression, shift of DNA, recombinant protein.

Lista de Abreviaturas

bHLH: *basic helix-loop-helix*

BSA: Albumina bovina sérica

C-terminal: região carboxi-terminal

cpm: cintilações por minuto

DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxiribonucléico

DTT: ditioneitol

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FGSC: *Fungal Genetics Stock Center*

FT: *flow through*

GPN: glicogênio fosforilase do fungo *Neurospora crassa*

GSN: glicogênio sintase do fungo *Neurospora crassa*

GST: Glutathione S-Transferase

GSY2: glicogênio sintase da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

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

HSE: *Heat shock elements*

IPTG: isopropyl-beta-D-tiogalactopiranosídeo

kb: kilobase

kDa: Kilodalton

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

N-terminal: região amino terminal da proteína

NBT: cloreto p-nitroazul de tetrazólio

ORF: *Open Reading Frame*

pb: pares de base

PCR: Polimerase Chain Reaction

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA: ácido ribonucléico

rpm: rotações por minuto

SSC: Solução salina citrato

SDS: Duodecil sulfato de sódio

SSPE: Solução salina fosfato-EDTA

STRE: *Stress responsive elements*

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

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

Tris: hidroximetilaminometano

V: volts

VM: Meio mínimo de Vogel

WT: *wild type*

Sumário

RESUMO	09
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO	17
1. O fungo <i>Neurospora crassa</i> como modelo de estudo	17
2. O metabolismo do glicogênio e sua regulação	19
3. Expressão gênica em eucariotos e fatores de transcrição	23
4. Fatores de transcrição e regulação do metabolismo de glicogênio em <i>N. crassa</i>	25
OBJETIVOS	29
MATERIAIS E MÉTODOS	31
1. Linhagens utilizadas	31
1.1. <i>Neurospora crassa</i>	31
1.2. <i>Escherichia coli</i>	31
2. Meio de cultura	31
2.1. <i>N. crassa</i>	31
2.2. <i>E. coli</i>	32
3. Propagação das linhagens de <i>N. crassa</i> e obtenção dos conídios	32
4. Análise do crescimento das linhagens de <i>N. crassa</i>	32
4.1. Crescimento em <i>race tubes</i>	32
4.2. Análises do crescimento em frascos <i>Erlenmeyers</i>	33
4.3. Análises do crescimento em placas	33
5. Ensaio de choque térmico	34
6. Preparo de extrato celular e determinação do conteúdo de glicogênio	34
7. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por <i>Northern blot</i>	35
8. Clonagem das ORFs	36
8.1. Clonagem através de biblioteca de cDNA	36
8.2. Clonagem dos cDNAs por RT-PCR	37
9. Preparo e transformação das células competentes de <i>E. coli</i>	39
10. Mini-extração de DNA plasmidial	40
11. Extração de DNA genômico do fungo <i>Neurospora crassa</i>	40
12. Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes	41
13. Ensaios de produção e purificação das proteínas recombinantes	41
13.1- Subclonagem das ORFs em vetores de expressão	41
13.2. Ensaio de indução e análise de solubilidade	42
13.3. Confirmação por <i>Western blot</i>	43
13.4. Purificação de proteínas recombinantes	43
13.4.1. Purificação de proteína recombinante em pequena escala	44

13.4.2. Purificação em larga escala	45
14. Análise da ligação DNA-proteína por EMSA	45
14.1. Preparo do extrato bruto protéico	46
14.2. Preparo e marcação das sondas de DNA	46
14.3. Competidores específico e inespecífico para os ensaios	47
14.4. Ensaio de mobilidade em gel	48
15. Análise computacional dos fatores de transcrição selecionados	48
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
1. Determinação do conteúdo de glicogênio e análise da expressão do gene <i>gsn</i>	50
2. Características dos fatores de transcrição	52
3. Análises por Blast e alinhamento de seqüência das proteínas	55
4. Confirmação do nocaute gênico nas linhagens mutantes	57
5. Análises de crescimento e morfologia das linhagens mutantes	57
5.1. Análises de crescimento	57
5.2. Análises morfológicas	66
5.3. Análise de crescimento em condições de anaerobiose	68
5.4. Análise da capacidade de conidiação e germinação	70
6. Análise da expressão do gene <i>flbC</i>	72
7. Clonagem das ORFs e subclonagem em vetores de expressão	75
8. Ensaio de produção e análise de solubilidade das proteínas recombinantes	80
9. Purificação de proteína recombinante	83
10. Análise da ligação DNA-proteína SRE1 por EMSA	86
11. Análise da ligação DNA-proteína FLBC por EMSA	91
PRINCIPAIS CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS	98

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 as suas facilidades de manipulação e o conhecimento das características genéticas e bioquímicas envolvidas em seu ciclo de vida. O fungo *Neurospora crassa* é provavelmente um dos fungos filamentosos melhor conhecido, sendo amplamente utilizado como organismo modelo em estudos de expressão gênica, desenvolvimento e diferenciação celular, ritmo circadiano, defesa do genoma, bem como outros aspectos da biologia de eucariotos. Uma das principais vantagens desse fungo é que ele pode crescer em meio simples (meio mínimo) contendo fonte de carbono, uma mistura de sais e alguns micronutrientes sendo que o único requisito é a biotina. Tem seu crescimento ótimo em pH 5,4, mas é bastante tolerante e consegue se desenvolver numa faixa de pH variando entre 4,0 e 7,5 (METZENBERG, 1979)

O ciclo de vida de *N. crassa* (figura 1) compreende duas fases: vegetativa, onde é possível observarmos estruturas de propagação denominadas conídios, e a sexual de reprodução, onde é possível verificar a presença dos corpos de frutificação. Sendo um fungo heterotálico, *N. crassa* possui dois tipos de indivíduos sexualmente compatíveis, designados A e a (FINCHAN; DAY; RADFORD, 1979). É um fungo haplóide durante seu crescimento, exceto quando ocorre o encontro dos dois *mating types*, havendo assim o cruzamento e o desenvolvimento do ciclo sexual. 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). As hifas possuem septos, os quais permitem movimentos de organelas entre os compartimentos, a freqüente fusão entre as hifas produz uma rede complexa denominada micélio (HICKEY et al., 2002). A via sexual de produção de esporos resulta na formação dos ascósporos visíveis. Caso *Neurospora* seja inoculada em meio sólido deficiente em certos componentes ou que contenha nitrato como única fonte de nitrogênio, a hifa irá enrolar-se formando o ascogônio o qual é envolto em tecido de hifas estéreis. Esta estrutura feminina é o protoperitécio, que por ação de feromônios expõe um tipo de hifa especializada, o tricógino. Quando um conídio, microconídio ou pedaço de hifa de *mating type* oposto encontra o tricógino, o doador de núcleo (macho) é conduzido para dentro do ascogônio, onde encontra o núcleo residente (fêmea), estas células unem-se gerando o asco (METZENBERG, 1979). A estrutura feminina se desenvolve gerando o peritécio, um

corpo de frutificação que pode conter até 200 ascos e cada um contém os quatro produtos de uma meiose. Em seguida ocorre uma mitose resultando em quatro pares de ascósporos haplóides e homocarióticos, sendo dois pares de cada *mating type* (figura 1).

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 em eventos como carotenogênese e conidiação. O efeito da luz deriva de seu papel central no estado do relógio circadiano, que mesmo na ausência de luz pode influenciar na expressão de grande parte do genoma. Em relação à resposta a temperaturas, *Neurospora* 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 do fungo está organizado em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb de tamanho (SCHULTE et al., 2002) e foi seqüenciado por Galagan *et al.* (2003) revelando ser constituído por cerca de 40 Mb (tabela 1), bem maior se comparado com outros fungos com genomas já conhecidos como *Sacharomyces cerevisiae* e *Schizosacharomyces pombe*. O fungo possui um total de 10.082 genes codificadores de proteínas. Nesse contexto, algo que chama a atenção é que 41% desses genes não possuem ortólogos conhecidos depositados nos bancos de dados, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. Cerca de 57% das proteínas não correspondem às proteínas de leveduras e 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. 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 *Neurospora* como nos demais eucariotos, dependendo do gene e do tamanho da região nucleotídica homóloga que flanqueia o gene de interesse (DUNLAP et al., 2007). Já o mecanismo de recombinação gênica não homóloga é conservado evolutivamente em todos os reinos, sendo o mecanismo predominante em

eucariotos superiores, como humanos, plantas e insetos (NINOMIYA et al., 2004). O conjunto de proteínas envolvidas neste mecanismo são as proteínas Ku70 e Ku80, conservadas tanto em leveduras quanto em humanos. Com a identificação de genes homólogos aos genes codificadores das proteínas Ku70 e Ku80 no genoma do fungo *N. crassa*, *mus-51* e *mus-52*, respectivamente, Ninomiya et al. (2004) desenvolveram um procedimento, baseado em PCR, para inativação dos genes homólogos e, desta maneira, construir linhagens nas quais o processo de recombinação não homóloga é inoperante. O procedimento utilizado pelos autores foi utilizado para a construção de um banco de linhagens de *N. crassa* mutantes nos genes codificadores de proteínas. Dessa forma, linhagens contendo genes individualmente inativados começaram a se tornar disponíveis para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Em 2006, a coleção de linhagens nocauteadas em genes que codificam fatores de transcrição foi adquirida pelo nosso laboratório e a utilização de tais linhagens tornou-se um material interessante para o início dos estudos acerca dos mecanismos regulatórios dessas proteínas.

Assim, a inativação de genes de interesse, juntamente com a análise de sua regulação sob diferentes condições, bem como a análise fenotípica das linhagens mutantes, tem como objetivo ampliar o conhecimento do genoma funcional em fungos, permitindo a comparação entre processos biológicos distintos e mecanismos bioquímicos envolvidos na regulação de vias metabólicas.

2- O metabolismo do glicogênio e sua regulação

O trabalho proposto está inserido em um projeto maior, que tem como objetivo principal estudar os mecanismos bioquímicos e moleculares envolvidos na regulação do metabolismo de glicogênio utilizando o fungo *N. crassa* para o estudo de mecanismos celulares básicos. O glicogênio é um polímero ramificado de glicose encontrado em células de diferentes organismos com a função de armazenamento de energia para as células. Os resíduos de glicose estão unidos covalentemente por ligações glicosídicas lineares α -1,4 e ligações α -1,6, responsáveis pela ramificação da molécula. Sua síntese é bem conservada nos eucariotos sendo que existem três proteínas envolvidas na biossíntese deste polissacarídeo: (i) a glicogenina, uma proteína autoglicosilável que funciona como uma molécula iniciadora para o início da biossíntese do glicogênio; (ii) a glicogênio sintase 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 (NELSON; COX, 2005). Tanto microrganismos quanto mamíferos sintetizam e acumulam o glicogênio em períodos de abundância de nutrientes e o degrada quando as células enfrentam períodos de estresse, como por exemplo, escassez de

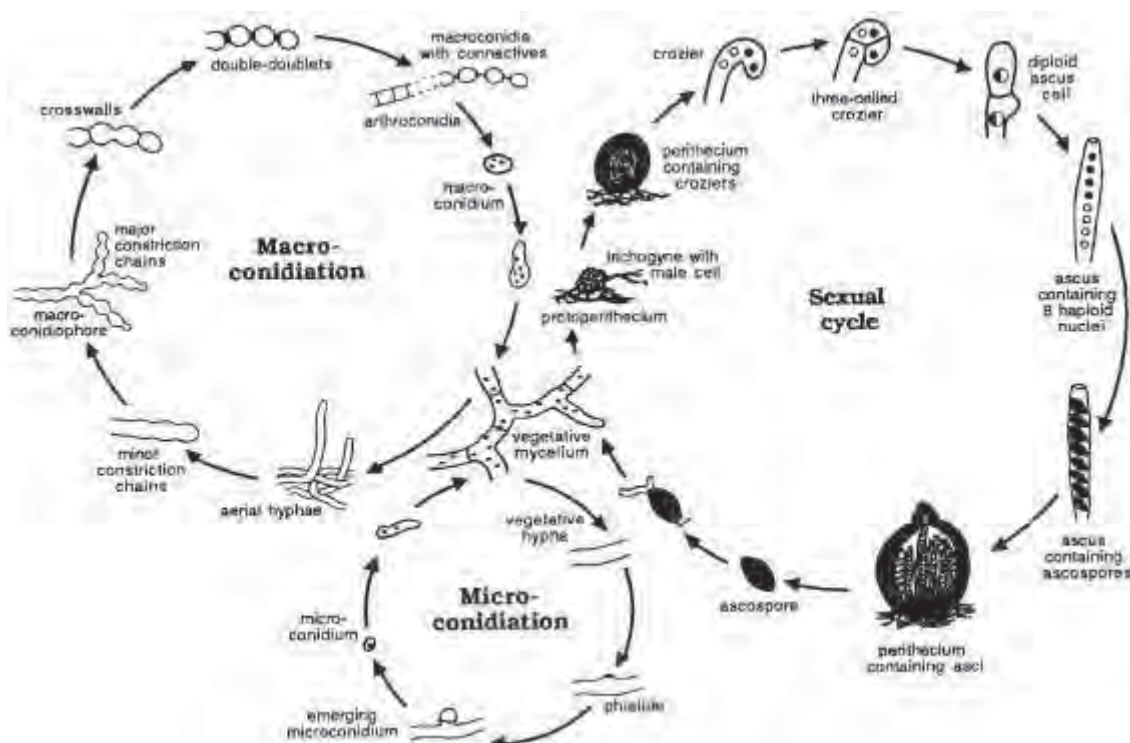


Figura 1- Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. Dependendo das condições ambientais o micélio vegetativo pode entrar em processo de esporulação assexual de macroconidiação e microconidiação, ou pode entrar no ciclo sexual pela formação do protoperitécio, o qual quando fertilizado pode iniciar o desenvolvimento culminando na produção de ascósporos derivados de meiose (SPRINGER, 1993).

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

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

nutrientes. Assim, a variação do conteúdo de glicogênio celular em resposta a diversas situações ambientais indica que seu metabolismo é controlado por um complexo sistema regulatório (HARRIS, 1997).

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

Em nosso laboratório vários aspectos do metabolismo de glicogênio vêm sendo estudados dando ênfase às enzimas que participam da síntese do carboidrato. Assim, estudos de caracterização bioquímica e molecular das proteínas glicogênio sintase e glicogenina foram realizados. Em *N. crassa*, estudos realizados mostraram acúmulo de glicogênio durante a fase exponencial de crescimento, o qual foi acompanhado por um aumento tanto da atividade glicogênio sintase quanto nos níveis de mensageiro *gsn* desta enzima. Sob condição de choque térmico (transferência de 30 para 45°C), o nível do transcrito *gsn* sofre uma acentuada redução e retorna ao nível normal após o restabelecimento da temperatura fisiológica de crescimento da cultura (30°C) (DE PAULA et al., 2002). Estes resultados mostraram que a regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* envolve mecanismos diferentes dos descritos na levedura *S. cerevisiae*, a qual acumula glicogênio sob exposição da cultura ao choque térmico (NI; LAPORTE, 1995).

Freitas e Bertolini (2004) realizaram a caracterização molecular da região promotora do gene *gsn* de *N. crassa* e identificaram vários elementos regulatórios de DNA na região 5'-flanqueadora do gene *gsn*. Uma grande quantidade de HSEs (Heat-Shock Elements) e dois elementos STREs (Stress Responsive Elements) foram localizados, um deles localizado no promotor do gene e outro dentro de um intron na região 5'-UTR. É importante salientar que a seqüência codificadora é interrompida por quatro pequenos introns e um outro grande (aproximadamente 500 pb) localizado na região 5'-UTR. Experimentos bastante preliminares no laboratório parecem indicar a participação deste intron na regulação da expressão do gene *gsn*. Os HSEs são elementos regulatórios de DNA encontrados em múltiplas cópias nos promotores de genes responsivos ao choque térmico e, em geral, conferem uma forte indução

frente ao estresse térmico, podendo agir tanto como elementos proximais ao TATA Box quanto como *enhancers* (BIENZ; PELHAM, 1986). Através de ensaios de retardamento em gel (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*, EMSA) utilizando fragmentos de DNA do promotor *gsn*, um contendo elementos HSE e outro contendo a região correspondente ao STRE, e fragmentos da região 5'-UTR, contendo ou não o elemento STRE, bandas de DNA de mobilidade reduzida foram observadas com extratos nucleares de células do fungo submetidas ao choque térmico (FREITAS; BERTOLINI, 2004). Estes resultados demonstraram fortemente o envolvimento das regiões estudadas na regulação da expressão do gene durante a condição de estresse mencionada. Experimentos realizados pelo nosso grupo foram iniciados com o objetivo de isolar proteínas que ligam a região promotora do gene *gsn* e, desta maneira, participam na regulação da expressão do gene. Esses estudos combinam ensaios de retardamento em gel, acoplados a análise proteômica e identificação das proteínas por espectrometria de massas. Os experimentos realizados levaram à identificação de algumas proteínas do fungo, as quais podem ou não estar envolvidas na regulação do gene na condição de choque térmico (FREITAS et al., 2008).

Através da utilização da coleção de linhagens de *N. crassa* mutantes nas ORFs codificadoras de fatores de transcrição foi possível iniciar uma análise mais detalhada dessas proteínas que poderiam atuar nos mecanismos moleculares envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio. Uma análise sistemática foi realizada com o objetivo de buscar linhagens mutantes que apresentassem um perfil de acúmulo de glicogênio distinto da linhagem selvagem em condições normais de crescimento e em situação de estresse, tal como o choque térmico. Foram identificados 17 fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio. As proteínas identificadas estão classificadas em diferentes famílias de fatores de transcrição, algumas apresentam ortólogos funcionais depositados em banco de dados e a grande maioria corresponde a proteínas anotadas como hipotéticas. Uma busca intensiva por ortólogos funcionais destas proteínas não levou a resultados conclusivos. A análise por *Northern* revelou que em algumas linhagens analisadas o perfil de transcrição do gene *gsn* foi distinto daquele existente na linhagem selvagem, tanto a 30°C como a 45°C. Desta forma, pode-se sugerir que estes fatores de transcrição estão envolvidos na regulação do metabolismo do carboidrato atuando diretamente na regulação da transcrição do gene *gsn* (GONÇALVES et al., 2011). Considerando que a grande maioria dos fatores de transcrição identificados foram anotados como proteínas hipotéticas é importante a realização de estudos mais sistemáticos para tentar atribuir uma função específica a estas proteínas dentro da regulação do metabolismo do carboidrato. Para isto, a produção das proteínas na forma recombinante é extremamente necessária para a realização de estudos futuros. É importante salientar que poucos fatores de transcrição de *N. crassa* e de outros fungos filamentosos foram, até o momento, bem caracterizados ao nível protéico.

3- Expressão gênica em eucariotos e fatores de transcrição

Há várias etapas no processo da expressão gênica, e todas elas podem ser reguladas. Dessa forma, uma célula pode controlar as proteínas que sintetiza pelo controle transcricional, que determina quando e com que frequência um gene é transcrito, pelo controle de processamento, transporte de RNA e finalmente através do controle da tradução, selecionando quais mRNAs no citoplasma serão traduzidos em proteínas. Depois de sintetizadas, as proteínas são submetidas ao controle da atividade, ativando ou inativando essas moléculas (ALBERTS et al., 2004).

A regulação da transcrição em eucariotos é em geral muito mais complexa e atualmente menos compreendida do que o mecanismo de regulação de genes procarióticos. Nas células eucarióticas, o genoma é constituído pelas moléculas de DNA associadas a uma grande quantidade de proteínas que interagem de forma dinâmica com a cadeia nucleotídica, sendo responsável pela sua compartimentalização no núcleo bem como pelo controle da expressão gênica. Essas proteínas pertencem a duas classes distintas: histonas e proteínas não-histonas. Histonas são pequenas proteínas que interagem com o DNA sob forma de octâmeros, os quais são constituídos por dois pares das histonas H2A, H2B, H3 e H4, formando um *core* globular que interage com a molécula de DNA (LUGER et al., 1997). O conjunto de octâmeros de histonas que são unidos pelas histonas H1 forma um complexo nucleoproteico denominado de nucleossomo, o qual representa um dos mais estáveis complexos DNA-proteína sob condições fisiológicas (LI; CAREY; WORKMAN, 2007). Essa estrutura é extremamente conservada nos organismos eucarióticos ao longo da evolução e constitui a unidade básica da cromatina. As histonas estão sujeitas a um grande número de modificações pós-traducionais que ocorrem pela ação de proteínas, como por exemplo, acetilação e metilação de lisinas e fosforilação dos resíduos de serina e treonina. Alterações nas estruturas das histonas provocam alterações na estrutura da cromatina e, conseqüentemente, alteram o padrão de regulação gênica. Esse mecanismo recebe o nome de modelagem da cromatina e é amplamente usado para descrever alterações na estrutura durante processos regulatórios (ALMER et al., 1986).

Outro mecanismo responsável pela regulação da expressão gênica em eucariotos é a presença de determinadas seqüências nucleotídicas que atuam como sítios alvos para fatores de transcrição. O complexo conjunto de elementos regulatórios controla o início da transcrição de genes estruturais envolvendo as RNA polimerases. A transcrição de cada gene é controlada por uma região regulatória do DNA próxima ao sítio reconhecido pela RNA polimerase II onde a transcrição se inicia, essas regiões apresentam diferentes combinações de seqüências específicas de DNA que recebem o nome de elementos *cis*, cada qual é reconhecido por proteínas que se ligam especificamente a essas seqüências. Essas proteínas são conhecidas

como fatores de transcrição ou proteínas regulatórias. Os eucariotos apresentam em seus genomas inúmeros elementos *cis*, que atuam como sítios alvos para a interação de diferentes proteínas regulatórias (LEVINE; TIJAN, 2003).

As seqüências regulatórias *upstream* da unidade transcricional podem ser divididas em duas categorias principais: os *upstream promoter elements* e os *enhancer elements*. Os *upstream promoter elements* possuem geralmente 100 a 200 pares de base e se localizam relativamente perto do sítio de iniciação da transcrição. Dentro destes, há seqüências de DNA reconhecidas por uma grande quantidade de proteínas gerais que constituem a maquinaria multiproteica da RNA polimerase II, requerida para o reconhecimento do promotor e síntese de RNA (LEVINE; TIJAN, 2003). Os *Enhancer elements* são seqüências curtas de DNA encontradas mais distante do sítio de iniciação que os *upstream promoter elements* e contêm seqüências reconhecidas por fatores de transcrição que se ligam especificamente a estas controlando a ativação ou repressão transcricional seletiva dos genes. A cadeia polipeptídica de ativação dos fatores de transcrição é geralmente dividida em duas regiões funcionalmente diferentes, uma se liga a seqüências específicas de DNA (domínio de ligação) e outra ativa a transcrição (domínio de ativação). Estas proteínas acentuam a ligação da RNA polimerase ao promotor por contribuir com a formação de um complexo iniciador estável. Quando o fator de transcrição se liga ao *enhancer* distante do promotor, o DNA forma um *loop* ativando a região da proteína que participa da formação do complexo iniciador da transcrição (BRADEN; TOOZE, 1999).

As proteínas regulatórias reconhecem regiões pequenas de seqüência definida da dupla-hélice de DNA e, desta forma, determinam quais dos milhares de genes em uma célula serão transcritos. Centenas de proteínas regulatórias já foram identificadas em um grande número de organismos. Embora cada uma dessas proteínas tenha características únicas, a maioria se liga ao DNA como homo ou heterodímeros, e o reconhecem através de um pequeno número de motivos (*motifs*) estruturais, entre eles: os motivos zinc-finger, hélice-volta-hélice e zíper de leucina e outros. Na maioria dos casos, a proteína faz um grande número de contatos com o DNA, envolvendo pontes de hidrogênio, ligações iônicas e interações hidrofóbicas, por assim, uma interação altamente forte e específica. A seqüência de aminoácidos que forma o motivo determina a seqüência de DNA em particular que será reconhecida (ALBERTS et al., 2004).

Em suma, para que ocorra o controle da expressão gênica, é necessário que os mecanismos regulatórios estimulem ou inibam a transcrição por meio do recrutamento da maquinaria protéica requerida pela RNA polimerase II e proteínas modificadoras de cromatina para desbloquear o promotor dos genes alvos. Uma conseqüência da modelagem da cromatina é a exposição ou inibição dos elementos *cis* aos fatores de transcrição, que podem estar na superfície do nucleossomo ou no interior dos mesmos, fazendo com que genes específicos

sejam ativados ou reprimidos no momento específico. Nosso grupo de pesquisa vem fazendo uso de técnicas que utilizam da especificidade das proteínas regulatórias para identificar a ocorrência de interações com a região promotora de genes que podem atuar no mecanismo de expressão dessas proteínas.

4- Fatores de transcrição e regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa*

Como descrito anteriormente 17 fatores de transcrição foram identificados em nosso laboratório como proteínas provavelmente envolvidas na regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* (GONÇALVES et al., 2011). Algumas destas proteínas apresentam ortólogos funcionalmente caracterizados em outros microrganismos e a grande maioria está anotada, no banco de dados do fungo como proteínas hipotéticas. Nesses experimentos, a expressão do gene que codifica a enzima glicogênio sintase (*gsn*) e o acúmulo de glicogênio foram analisados em condições normais de crescimento e após exposição ao estresse térmico, sendo que, as linhagens que apresentaram um perfil distinto da linhagem selvagem foram selecionadas. O presente trabalho tem como objetivo iniciar os estudos com três fatores de transcrição anotados como proteínas hipotéticas, os produtos das ORFs NCU03043, NCU01629 e NCU04731. Neste trabalho pretendemos dar início ao estudo com estas proteínas tanto ao nível molecular e bioquímico como funcional como uma tentativa de entender melhor as suas participações no mecanismo de regulação gênica neste fungo.

A proteína codificada pela ORF NCU03043 é um fator de transcrição com domínio de ligação ao DNA do tipo *Zinc finger C₂H₂ type* (figura 4). Esse domínio é o clássico entre todos os domínios da família *Zinc Finger*, possuindo duas histidinas e duas cisteínas ligadas a um átomo de zinco. Em relação à estrutura, apresenta duas regiões em beta folha antiparalelas seguidas por uma estrutura em alfa-hélice. Esse fator de transcrição apresenta homologia às proteínas FlbC de diferentes fungos. O gene que codifica esta proteína em *Podospora anserina* foi caracterizado por Coppin (2002) e denominado como *fle1*. A proteína FLE1 é um fator de transcrição do tipo *C₂H₂ zinc finger* que atua como repressora da via de diferenciação sexual feminina de *P. anserina*. Experimentos de RT-PCR mostraram que os RNAs mensageiros estão presentes no micélio e peritécio e a expressão de FLE1 fusionada a GFP foi detectada no núcleo das hifas e ascósporos imaturos. Desta forma, o gene é expresso tanto durante o crescimento vegetativo como na reprodução sexual. A ausência desse gene estimula a produção de órgãos femininos e produção diminuída de microconídios (COPPIN, 2002). Além disso, o fator de transcrição de *N. crassa* possui identidade elevada com a proteína FlbC de *Aspergillus clavatus* e de outros fungos. FlbC é um fator de transcrição que apresenta dois

domínios do tipo C_2H_2 *zinc finger*, necessários à ativação adequada da conidiação que é fundamental para o crescimento e desenvolvimento em *A. nidulans* (KWON et al., 2010). Coppin (2002) descreveu que FLE1 e FlbC podem exercer funções similares já que ambas respondem a sinais desconhecidos que controlam a transição do crescimento vegetativo indiferenciado para o desenvolvimento, mas elas agem de diferentes maneiras. Em *A. nidulans*, FlbC age como um regulador positivo da conidiação, ativando provavelmente a transcrição de outras proteínas reguladoras do desenvolvimento. Em *P. anserina*, FLE1 parece atuar principalmente como um regulador negativo na via de diferenciação sexual feminina. A deleção do gene *flbC* resulta em redução da conidiação e aumento da formação de estruturas sexuais de frutificação sob condições que favorecem o desenvolvimento sexual. Portanto a proteína exerce um papel essencial na ativação da conidiação, crescimento e desenvolvimento em *A. nidulans* (KWON et al., 2010).

Outra proteína selecionada, o produto da ORF NCU04731, contém um domínio de ligação do tipo *helix-loop-helix* (bHLH) (figura 4). Esse domínio é geralmente encontrado em grupos de fatores de transcrição eucarióticos e participam de uma variedade de processos celulares. O domínio é caracterizado por duas alfa-hélices conectadas por um *loop*, em geral, os fatores de transcrição incluindo esse domínio são diméricos, na qual uma das hélices contém resíduos de aminoácidos básicos que facilitam a ligação com o DNA. Esta proteína apresentou homologia às proteínas denominadas SRE1 de *Verticillium dahliae* e outros fungos, sendo que, essa proteína fúngica é homóloga a proteína SREBP de mamíferos. A via SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) é bem descrita em mamíferos, na qual a proteína SREBP é ligada à membrana do RE e controla a síntese de esteróis. SREBP apresenta um domínio de ligação do tipo *helix-loop-helix* (bHLH) e podem ser distinguidas de outros fatores de transcrição bHLH devido à presença de um resíduo de tirosina no lugar de arginina no domínio de ligação. Possuem dois segmentos transmembrana de tal forma que os domínios N- e C-terminal da proteína se projetam na membrana em relação ao citosol com o *hairpin* no retículo endoplasmático (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005).

O primeiro ortólogo da proteína SREBP em fungo foi identificado em *Schizosaccharomyces pombe* e, posteriormente foi caracterizado em outros fungos como *Candida albicans* (LANE et al., 2001) e *A. fumigatus* (WILLGER et al., 2008). A habilidade de resposta ao esteroide de SREBP é conservada entre mamíferos e fungos, no entanto as proteínas fúngicas são fatores de transcrição hipóxicos, necessários para a adaptação a ambientes com baixa concentração de oxigênio (BIEN; ESPENSHADE, 2010). Segundo Todd et al. (2006), estudos demonstraram que existe um ortólogo a esses reguladores de esteroide (SREBPs) na levedura *S. pombe* que são chamados SRE1, as quais agem na via que permite a adaptação a baixas concentrações de oxigênio. A proteína SREBP em levedura funciona

como sensora de oxigênio através do monitoramento da síntese de esterol dependente do oxigênio fornecido.

A proteína codificada pela ORF NCU01629 mostrou-se alterada em relação a linhagem selvagem tanto no acúmulo de glicogênio como na expressão do transcrito *gsn* e também foi selecionada para estudos de caracterização. Esta proteína possui um domínio de ligação ao DNA do tipo *zinc finger C₂H₂* e não apresentou homologia a nenhuma proteína funcionalmente caracterizada em outros organismos.

Embora *N. crassa* tenha sido estudada durante 60 anos pela genética clássica e molecular, relativamente pouco é conhecido sobre a regulação da transcrição neste organismo. A disponibilidade da seqüência completa do genoma do fungo tem permitido a anotação de 182 genes fatores de transcrição (BORKOVICH et al., 2004). Poucos desses fatores de transcrição foram bioquimicamente caracterizados até o momento, e poucos têm sido estudados em qualquer sistema de outros fungos filamentosos. Portanto, um estudo funcional em grande escala de fatores de transcrição de *Neurospora* é oportuno e vai proporcionar uma base para a compreensão de modos complexos de regulação gênica em fungos filamentosos.

Objetivos

O presente trabalho foi desenvolvido com os seguintes objetivos:

- **Avaliar crescimento e morfologia das linhagens mutantes nos fatores de transcrição estudados.** O principal objetivo dessas análises será verificar se a ausência das proteínas pode afetar diferentes aspectos tais como: crescimento, conidiação, extensão das hifas aéreas e morfologia.
- **Verificar a relação funcional das proteínas hipotéticas de *N. crassa* com proteínas homólogas em outros organismos.** O objetivo é identificar a existência de homólogos funcionalmente caracterizados em outros organismos para atribuir funções às proteínas de *N. crassa*. Para isso, as seqüências polipeptídicas dos fatores de transcrição serão analisadas por Blast em busca por homólogos existentes e experimentos serão realizados para a comparação funcional das proteínas do fungo *N. crassa* com proteínas já caracterizadas em outros organismos.
- **Realizar a clonagem das ORFs e a produção das proteínas na forma recombinante.** Os cDNAs que codificam as proteínas estudadas serão clonados e as proteínas serão produzidas na forma recombinante em *E. coli*.
- **Purificar as proteínas recombinantes e realizar ensaios de ligação DNA-proteína.** As proteínas produzidas serão purificadas e usadas em ensaios de retardamento em gel que avaliam a formação de complexos DNA-proteína.

Materiais e Métodos

1. Linhagens utilizadas

1.1. *Neurospora crassa*

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

Linhagem: FGSC#9718 (a, $\Delta mus-51:Hyg^r$), utilizada como selvagem nos experimentos.

Linhagens mutantes: Tabela abaixo

Tabela 2 – Linhagens mutantes de *N. crassa*

Linhagem	Mating type	ORF nocauteada
FGSC#11355	A	NCU03043:: <i>Hyg^r</i>
FGSC#11102	A	NCU01629:: <i>Hyg^r</i>
FGSC#11139	a	NCU04731:: <i>Hyg^r</i>

1.2. *Escherichia coli*

Linhagens utilizadas: DH10 β

BL21(DE3)pLys-S

Rosetta

ArcticExpress

2. Meio de cultura

2.1. *N. crassa*

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens do fungo *N. crassa* foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956). Esse meio foi preparado contendo sacarose, sais de Vogel e biotina. A solução de sais de Vogel foi preparada 50X concentrada, a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 ml de água destilada:

510 g de citrato de sódio.H₂O

250 g de KH₂PO₄

100 g de NH₄NO₃

10 g de MgSO₄.7H₂O

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

5 mL de solução de elementos traços

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

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

5 g de ácido cítrico. H_2O

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

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

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

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

0,05 g de H_3BO_3

0,05 g de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

O meio mínimo de Vogel foi preparado contendo sacarose a 2%, sais de Vogel 1X, biotina 0,1 mg/ml preparada em 50% etanol e 2% de ágar para culturas de meio sólido. O pH do meio mínimo de Vogel é 5.8.

2.2. *E. coli*

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

1,6% triptona

1,0% extrato de levedura

0,5% NaCl

0,2% glicose

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

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

As linhagens foram inoculadas em garrafas contendo meio VM sólido e crescidas inicialmente a 30°C por 48 horas e, em seguida, expostas à luz até um total de 9 a 10 dias. Após esse período, a suspensão conidial foi coletada em aproximadamente 15 mL de água destilada esteril e filtrada com auxílio de uma gaze esteril para retenção das hifas. Os conídios foram contados em câmara de Neubauer e armazenados na temperatura de 4°C.

4. Análise do crescimento das linhagens de *N. crassa*

4.1. Crescimento em *race tubes*

A taxa de crescimento das linhagens selvagem e mutantes foi determinada através do crescimento em *race tubes*, os quais constituem de tubos de vidro (50 cm de comprimento x 2

cm de diâmetro) contendo as duas extremidades curvadas num ângulo de aproximadamente 45° e parcialmente preenchidos com meio VM sólido. Conídios foram inoculados em uma das extremidades dos tubos, os quais foram incubados no escuro à temperatura ambiente por 120 horas. O crescimento do fungo foi monitorado a cada 24 horas, por meio da marcação da frente do crescimento micelial, em centímetros (cm).

4.2. Análises do crescimento em frascos *Erlenmeyers*

O crescimento das 3 linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem, foi analisado em *Erlenmeyers* de 250 mL contendo 50 mL de meio VM sólido, nos quais quantidades iguais de conídios foram inoculados e mantidos a 30°C por 48 horas. Em seguida, os frascos foram transferidos para a temperatura ambiente, sob presença de luz, quando adquirem coloração alaranjada. O aspecto macroscópico das culturas foram fotografados.

A linhagem mutante na ORF NCU03043 foi analisada durante o desenvolvimento e comparada à linhagem selvagem. Para isto suspensões conidiais foram misturadas a 70 mL de meio VM líquido em uma placa de Petri grande estéril e a cultura foi mantida por dois dias a temperatura ambiente até a formação de um “tapete micelial” consistente. Discos da massa micelial formada foram recortados da placa e transferidos com o auxílio de uma alça estéril para a superfície de meio de cultura sólido em diferentes frascos *Erlenmeyers* (um total de sete frascos/linhagem) contendo 30 mL de meio. A formação de conídios foi observada através da lavagem das culturas com água estéril, filtragem em gaze e coleta do filtrado. As suspensões conidiais coletadas diariamente até um total de 7 dias foram separadamente analisadas em microscópio trinocular Zeiss, modelo Axioimager A2. Os discos também foram analisados através de microscopia ótica.

A capacidade de germinação dos conídios desta linhagem foi também analisada e comparada à linhagem selvagem. Para isto, conídios de ambas as linhagens foram inoculados em 30 mL de meio VM líquido e colocados para germinar a 30°C, sob agitação constante de 250 rpm. Amostras foram coletadas após 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas e observadas em microscópio.

4.3. Análises do crescimento em placas

O crescimento radial e o aspecto das hifas foi analisado para todas as linhagens mutantes e comparadas à linhagem selvagem. Para isto, conídios (10^7 cel/mL) das linhagens foram inoculados no centro de placas contendo meio VM sólido (contendo ou não extrato de levedo) e incubados sob a presença de luz a 30°C por 16 horas. As extremidades das hifas foram observadas em um estereomicroscópio trinocular Zeiss, modelo Discovery V8 (Lupa) e fotografadas em aumento de 80X.

Conídios da linhagem selvagem e da mutante na ORF NCU04731 foram utilizados em análises de crescimento em condições de baixas tensões de oxigênio. Placas de Petri foram preparadas contendo meio VM acrescido de sorbose 2%, glicose 0,05% e frutose 0,05%. Placas de 96 *wells* foram utilizadas para a preparação das diluições das amostras onde em cada poço foram colocados 180 μL de meio VM líquido com exceção do primeiro onde foi colocado 200 μL da suspensão conidial numa densidade de 10^8 conídios/mL. Diluições seriadas foram realizadas a partir da amostra inicial até o total de 10 conídios/mL. Posteriormente, 5 μL de cada diluição foram transferidos para a superfície do meio contido em duas placas de Petri. Uma das placas de foi armazenada em câmara de anaerobiose (BBL GasPak Jar) contendo uma vela acesa na tentativa de proporcionar uma reduzida tensão de oxigênio na câmara e manter o crescimento em condições parciais de anaerobiose (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005). Outra placa foi deixada em condições normais. Ambas as placas foram incubadas a 30°C por 24 horas e o crescimento foi analisado.

5. Ensaio de choque térmico

Uma suspensão de conídios de aproximadamente 10^7 células/mL foi inoculada em 30 mL de meio VM líquido em duplicata e submetida à constante agitação de 250 rpm a 30 °C por 24 horas. Após crescimento, a massa micelial foi coletada através de um procedimento de filtração a vácuo com o auxílio de filtros de papel e separada em duas porções. O micélio correspondente a um dos frascos da linhagem foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido após filtração e armazenado a -80°C para ser usado como amostra controle, ou seja, não submetida a choque térmico. A outra amostra foi transferida para um frasco contendo meio VM líquido, pré-aquecido a 45°C, e deixada nesta temperatura por 30 minutos. Em seguida essa segunda amostra foi coletada por filtração, rapidamente congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C como micélio submetido ao choque térmico.

6. Preparo de extrato celular e determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio foi determinado nas células do fungo, submetidas ou não ao choque térmico, através da digestão do glicogênio com amiloglicosidase e α -amilase, após precipitação com etanol absoluto. Para isto, uma pequena porção do micélio congelado a -80°C foi macerado em gral de porcelana na presença de nitrogênio líquido e transferido para um eppendorf contendo 1 mL de solução tampão de lise gelado (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM NaF; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 mM benzamidina; 2 mM TLCK; aprotinina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e pepstatina A 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A mistura foi centrifugada a $10.000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min após uma intensa agitação em *vortex* e a porção sobrenadante foi transferida a um eppendorf limpo. Uma alíquota foi recolhida e utilizada na determinação das proteínas totais do extrato celular pelo

método de Hartree modificado utilizando soroalbumina bovina (BSA) como padrão (HARTREE, 1972).

As proteínas contidas em 100 μL do extrato celular bruto foram coletadas e 25 μL de TCA 50% foram adicionados. Em seguida, o material foi centrifugado a $5.000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi transferido para um tubo eppendorf limpo, adicionado 500 μL de etanol absoluto e deixado 30 minutos a -80°C para a precipitação do glicogênio presente na fração solúvel. Finalmente, a solução foi centrifugada a $17000 \times g/4^\circ\text{C}/10$ min para a coleta do glicogênio, o qual foi lavado duas vezes com 500 μL de etanol 66%, rapidamente seco ao ar, e ressuspenso em 400 μL de solução acetato (acetato de sódio 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 5,2). O glicogênio foi digerido com as enzimas α -amilase (1 μL de uma solução 10 mg/mL) e amiloglicosidase (1 μL de uma solução de 30 mg/mL) durante 12 a 15 horas. O conteúdo de glicose livre foi determinado pelo kit *Glicose PAP Liquiform* (Labtest) segundo as instruções do fabricante. O conteúdo de glicogênio presente em cada amostra foi calculado de acordo com uma curva padrão de glicogênio e expresso em relação à quantidade de proteína total de cada amostra. A curva padrão de glicogênio foi preparada a partir de uma solução de glicogênio puro (Sigma) em solução acetato (acetato de sódio 50 mM, CaCl_2 5 mM, pH 5,2) na concentração de 10 mg/mL.

7. Extração de RNA total e análise da expressão gênica por Northern blot

O RNA total das linhagens mutantes selecionadas e da selvagem foi extraído baseado no método de cloreto de lítio (SOKOLOVSKY et al., 1990). Uma pequena porção do micélio congelado foi macerado em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó bem fininho o qual foi transferido para tubo eppendorf contendo uma mistura de 750 μL de tampão de lise (0,6M NaCl; 10 mM EDTA; 0,1M Tris-HCl, pH 8,0 e 4% SDS) e 750 μL de fenol saturado em Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. A mistura foi agitada em vortex durante 5 minutos e centrifugada a 14.000 rpm/ 4°C por 10 minutos. A porção sobrenadante foi transferida para outro eppendorf contendo 750 μL de clorofórmio, homogeneizados em vortex e uma segunda extração foi realizada através de centrifugação a 14.000 rpm/ $4^\circ\text{C}/10$ min. O RNA presente na fase aquosa formada após centrifugação foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M e mantido a 4°C por 2 horas ou mais. Após esta etapa, a solução foi centrifugada a 14.000 rpm/ $4^\circ\text{C}/10$ min, o precipitado contendo os ácidos nucleicos foi ressuspenso em 300 μL de água tratada com DEPC e novamente precipitado com 30 μL de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 750 μL de etanol absoluto gelado, durante 10 minutos no gelo. A porção correspondente ao RNA total foi coletada através da centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C , lavados duas vezes com etanol 70% gelado e centrifugação a 14.000 rpm/ $4^\circ\text{C}/5$ min. O precipitado seco foi ressuspenso em 50-100 μL de água previamente tratada com DEPC, a concentração do RNA foi

determinada por absorvância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640 e sua pureza analisada através da relação entre as absorvâncias de 260 e 280 nm.

A análise de expressão gênica por *Northern blot* foi realizada segundo protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). Aproximadamente 15 µg de cada amostra de RNA total foi previamente desnaturada em tampão de desnaturação (MOPS 1X, formamida deionizada 50%, formaldeído 20%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,025%, brometo de etídeo 0,05 µg/mL) a 65°C durante 10 minutos. As amostras desnaturadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,2% contendo formaldeído 0,6 M a 65 V por aproximadamente 4 horas em tampão MOPS 1X. O RNA total, após eletroforese, foi transferido por capilaridade para membrana de nylon neutra (Hybond N, Amersham) utilizando solução tampão SSC 2X (NaCl 0,3 M e citrato de sódio 3 mM, pH 7,0) durante a noite. Após esta etapa, os RNAs foram fixados na membrana por *crosslinking* (Ultraviolet Crosslinker UVP mod. CL1000) durante 2 min e, em seguida, a membrana foi lavada com solução tampão SSC 2X durante 1 h. Após a lavagem, a membrana foi pré-hibridizada a 42°C, durante 4 h com 5 mL da solução *ULTRAhyb*TM (Ambion) em forno de hibridização Hybaid. As sondas utilizadas corresponderam a fragmentos de DNA dos genes *gsn* (1350 pb), *gpn* (798 pb) e *flbC* (744 pb). As sondas foram marcadas radiativamente com α^[32P]dATP por *random priming* utilizando o kit *NEBlot*TM (Biolabs) e, em seguida, purificadas por filtração em resina Sephadex G-50 (Sigma) equilibrada em tampão NT (Tris-HCl 1 mM, pH 8,0; NaCl 1 mM e EDTA 2 mM, pH 8,0) a fim de eliminar os nucleotídeos não incorporados. Em seguida, a sonda foi desnaturada a 100°C durante 10 minutos e 100 µL da sonda desnaturada (aproximadamente 10⁷ cpm total) foi adicionada à solução de pré-hibridização *ULTRAhyb*TM (Ambion). A hibridização foi realizada a 42°C durante a noite. Após a hibridização a membrana foi lavada em diferentes condições de estringência antes de ser exposta a filmes radiográficos (Kodak T-Mat G/RA).

Condições de lavagem:

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

8. Clonagem das ORFs

8.1. Clonagem através de biblioteca de cDNA

A tentativa inicial de isolamento do cDNA referente à ORF NCU04731 foi realizada através do rastreamento de uma biblioteca de cDNA de *N. crassa* (λAD5-NC), construída em fago λ, a qual permite a excisão dos insertos na forma de plasmídeo, através do sistema de recombinação *cre/lox* (BRUNELLI; PALL, 1993). Outros cDNAs foram anteriormente isolados

no laboratório utilizando o mesmo procedimento. O rastreamento da biblioteca foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001). A linhagem bacteriana hospedeira utilizada foi *E. coli* XL-1 Blue, crescida em 10 mL de meio LB adicionado de maltose 0,2% e tetraciclina (concentração final 12,5 µg/mL) até uma densidade ótica a 600 nm próxima de 1,0. As células foram coletadas por centrifugação em uma microcentrífuga refrigerada, lavadas com uma solução de MgSO₄ 10 mM e ressuspensas em MgSO₄ 10 mM até uma densidade ótica a 600 nm de 0,6. Um volume de 200 µL dessa suspensão bacteriana foi transferido para um tubo estéril, juntamente com 100 µL dos fagos na diluição de 10⁻⁶ (melhor diluição obtida através da titulação). A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos, adicionada de 3 mL de *top agarose* LB (mantido a 48 °C) e colocada na superfície de placas contendo meio LB sólido. As placas foram incubadas a 37 °C. Após aparecimento das placas de lise, foram feitas réplicas das placas em membranas de nitrocelulose, as quais foram tratadas com solução de desnaturação (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) por 5 minutos, em seguida com solução de neutralização (0,5 M Tris-HCl, pH 8,0; 1,5 M NaCl) por 5 minutos e depois com tampão SSC 20 x por 5 minutos. O DNA aderido à membrana foi fixado através de *crosslinking* por 2 minutos (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP).

Para o rastreamento da biblioteca utilizamos como sonda um fragmento de 1392 pb, correspondente ao produto de amplificação por PCR da ORF NCU04731 incluindo o domínio de ligação a partir de DNA genômico.

As membranas de nylon neutras (Hybond N, Amersham) foram colocadas em frascos de hibridização contendo 10 ml de uma solução de hibridização contendo formamida deionizada 50%, SSPE 6X, Blotto (5% leite em pó desnatado, 0,02% azida sódica) 0,05X e 100 µg/mL de DNA esperma de salmão desnaturado sob aquecimento a 100µC e deixadas cerca de 1 hora a 42 °C em forno de hibridização (Hybaid). Após este período, a sonda marcada e desnaturada foi adicionada à solução de pré-hibridização e as membranas foram incubadas a 42 °C durante uma noite. Após o período de hibridização, as membranas foram lavadas em diferentes condições de estringência antes de ser exposta a filmes radiográficos (Kodak T-Mat G/RA).

8.2. Clonagem dos cDNAs por RT-PCR

Seqüências de oligonucleotídeos foram desenhadas para a amplificação das ORFs NCU01629, NCU04731 e NCUΔ04731. A ORF NCU03043 já havia sido amplificada por PCR anteriormente por outra aluna no laboratório. Os pares de oligonucleotídeos utilizados estão representados na tabela 3.

Os oligonucleotídeos foram desenhados a partir das seqüências nucleotídicas dos genes que codificam as proteínas, existentes no banco de dados do genoma de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>). As seqüências dos

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para a clonagem molecular.

ORF	Pares de oligonucleotídeos	Sítio de restrição
NCU03043	Nc3043-F: 5'-CAT ATg TCTTATCAATCgAgCCAg-3'	<i>NdeI</i>
	Nc3043-R: 5'-ggATC CTT ATTCCgAgTgTTggCC-3'	<i>BamHI</i>
NCU01629	Nc1629-F: 5'-gCTAg CATg gCCCTCACTCCgCCCTC-3'	<i>NheI</i>
	Nc1629-R: 5'-gAATT CTCAC CTCCCCAAgAATgAC-3'	<i>EcoRI</i>
NCU04731	Nc4731-F: 5'-CAT ATg gCCgATCCCgATgCTgAC-3'	
	Nc4731-R: 5'-gAATT CTCAC gCgCCTgCCAAgCgTTC-3'	<i>NdeI</i>
Δ4731	**Nc4731-1F:5'-CAT ATg gCCggCAgTCCCgATTCCAAC-3'	<i>EcoRI</i>
	**Nc4731-1R:5'-gAATT CTCAT CCAgCgTTCATCTGTTgAgC-3'	

**oligonucleotídeos desenhados para a produção da proteína truncada contendo apenas o domínio de ligação ao DNA.

oligonucleotídeos apresentam em negrito os códons de iniciação (AUG) e de término (UAA, e UGA) da síntese proteica. A ORF NCU04731 também foi amplificada com o objetivo de produzir uma proteína na forma truncada em 248 resíduos de aminoácidos da região N-terminal e 610 resíduos na região C-terminal. A seqüência polipeptídica, a ser produzida, contém apenas a região do domínio de ligação ao DNA com 216 resíduos de aminoácidos (explicado em Resultados). Os sítios correspondentes às enzimas de restrição foram adicionados para facilitar a posterior subclonagem no vetor de expressão pET28a em todas as ORFs.

O isolamento dos cDNAs correspondente às ORFs NCU01629 e NCU04731 foi realizado por RT-PCR, a partir de uma preparação de RNA total disponível no laboratório. Inicialmente, cerca de 4 µg do RNA total da linhagem selvagem do fungo foi tratado com a enzima DNase RQ1 RNase-Free DNase (Promega) numa reação com o volume final de 10 µl, para eliminar contaminações por DNA genômico presente nas amostras de RNA. Em seguida, a síntese do cDNA foi efetuada, utilizando-se o kit comercial *Superscript® III First-strand Synthesis for RT-PCR* (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. As reações de amplificação foram realizadas utilizando combinações dos oligonucleotídeos F e R em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf), no volume final de 50 µl. Foi utilizado 2 µL de cDNA (*template* 1ª fita), 0,5 µL (1,25 U) da Enzima *Phusion DNA Polimerase* (Finnzymes), 1

μL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/ μL), 10 μL de 5x *Phusion Buffer GC*, 1 μL de dNTP (10 mM) e 1,5 μL de DMSO. Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96 C/1 min), anelamento (60-72 C/1 min) e extensão (68-72 C/40 seg a 1,5 min), por 34 ciclos, num volume final de 50 μL de reação.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x (0,4 M Tris; 0,2 M  cido acético glacial; 0,01 M EDTA, pH 8,0) contendo 50 μL de brometo de etídio 1 mg/mL, e em seguida, foram purificados utilizando o kit GeneClean (BioMP). Os fragmentos de tamanhos esperados foram excisados do gel e purificados. Após purificação, foi feita a ligação dos fragmentos no vetor pMOS-Blue (*Blunt Ended PCR Cloning* kit, GE Healthcare) a uma temperatura de 22  C por uma noite e os produtos das reações de ligação foram usados para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* DH10B. Após transformação, a seleção dos transformantes foi feita através do plaqueamento em meio de cultura 2YT suplementado com 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina e 40 μL de X-Gal, sendo o último usado como indicador visual das col nias que expressam a enzima β -galactosidase funcional onde não ocorre a inserção do fragmento desejado. As células foram incubadas a 37  C durante uma noite e as col nias resultantes do crescimento foram selecionadas e submetidas à extração do DNA plasmidial. As diferentes construções plasmidiais foram confirmadas inicialmente por análise de restrição. Células dos clones positivos foram armazenadas a -80 C como cultura permanente em glicerol 16%.

9. 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  tica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon (50 mL) estéreis a 700 x *g*/4  C/15 minutos em microcentrífuga de mesa. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de CaCl_2 100 mM gelada e estéril e dissolvidos em 8 mL de CaCl_2 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas para as reações de transformação.

Para a transformação, 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.

10. Mini-extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de *boiling prep* descrito por Holmes e Quigley (1981). As colônias bacterianas isoladas foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + glicose 0,2% e crescidas a 37 °C durante uma noite, em seguida, cerca de 3 mL da cultura de células foram transferidos para tubos eppendorf de 1,5 mL e foram coletados duas vezes através de centrifugação a 14.000 rpm/1min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspense em 350 µL de solução STET (8% sacarose; 0,5% Triton X-100; EDTA 50 mM, e Tris 10 mM, pH 8,0 contendo 30 mg de lisozima). A mistura foi aquecida em banho de água fervente por 40 segundos, e imediatamente resfriada em freezer -20 °C por 10 minutos. Em seguida, centrifugada a 14.000 rpm/10 min/4 °C.

Com uso de palitos de dente, o precipitado foi retirado e descartado, sendo os ácidos nucléicos precipitados com 40 µL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 420 µL de isopropanol. A seguir, o material foi centrifugado a 14.000 rpm/15 min/4 °C. O precipitado foi dissolvido em 100 µL de água pura e acrescentou-se 100 µL de fenol saturado com tampão. Essa mistura foi vigorosamente agitada em *vortex* e, posteriormente, centrifugada a 14.000 rpm/10min/4 °C. Um volume de 90 µL da fase aquosa foi transferido para um tubo eppendorf novo e o DNA plasmidial foi precipitado com 40 µL de acetato de amônio 7,5 M e 300 µL de etanol absoluto gelado. O DNA plasmidial foi coletado por centrifugação e lavado duas vezes com 800 µL de etanol 70% gelado (14.000 rpm/5 min/4 °C). O DNA foi dissolvido em 20 µL de água após secagem por aproximadamente 15 minutos ao ar.

11. Extração de DNA genômico do fungo *Neurospora crassa*

O DNA genômico da linhagem selvagem e das linhagens mutantes foi extraído baseado no protocolo de Weiland (1997). Para isso, o micélio congelado a -80 °C foi macerado em nitrogênio líquido para a obtenção de um pó fino que foi imediatamente transferido a um eppendorf de 1,5 mL contendo 500 µL de tampão de extração (200 mM Tris-HCl, pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA e SDS 1%) e 500 µL de uma solução de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico na proporção 25:24:1. Os tubos foram homogeneizados por aproximadamente 5 minutos em *vortex* e, em seguida, centrifugados a 16.000 x g/4°C/10 min. A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e o DNA precipitado com 80 µL de acetato de sódio 3M, pH 5,2, e 500 µL de isopropanol gelado. Os tubos foram deixados a -80°C por aproximadamente 10 minutos e, posteriormente, centrifugados a 16.000 x g/4°C/10 min. O precipitado foi ressuspense em 100 µL de água contendo 20 µg/mL de RNase e mantidos em banho a 37°C por 30 minutos para a remoção do RNA. Após esse período, 200 µL de fenol foram acrescentados ao tubo e homogeneizados em *vortex* para a desproteíntização das amostras.

Os tubos novamente foram centrifugados ($16.000 \times g/4^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$) e a fase aquosa transferida para tubo eppendorf limpo, e o DNA foi precipitado com $40 \mu\text{L}$ de acetato de amônio $7,5 \text{ M}$ e $300 \mu\text{L}$ de etanol absoluto gelado. Os tubos foram deixados a -20°C por 2 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados ($16.000 \times g/4^{\circ}\text{C}/10 \text{ min}$) e o precipitado obtido foi lavado com $700 \mu\text{L}$ de etanol 70% por três vezes. O precipitado foi ressuspenso em $100 \mu\text{L}$ de água e a concentração do DNA foi determinada por absorvância a 260 nm e a pureza foi analisada pela relação das absorvâncias $260/280\text{nm}$ em um espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640.

12. Confirmação dos nocautes gênicos nas linhagens mutantes

Para a confirmação de que o nocaute das ORFs foi realmente realizado no genoma das linhagens mutantes selecionadas foram feitas reações de amplificação por PCR utilizando-se como molde cerca de $1 \mu\text{g}$ do DNA genômico das linhagens selvagem (controle) e mutantes. Foram utilizados nas reações de amplificação os mesmos pares de oligonucleotídeos das reações de clonagem por RT-PCR específicos para cada ORF, descritos na Tabela 3. As condições das reações de PCR foram as mesmas descritas no subitem 8.2. Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1%, e a imagem capturada pelo sistema de fotodocumentação.

13. Ensaio de produção e purificação das proteínas recombinantes

13.1- Subclonagem das ORFs em vetores de expressão

Os vetores de expressão utilizados foram o pET-28a (Novagen), o qual produz a proteína fusionada a uma cauda de seis resíduos de histidina e o vetor pGEX-4T1 (Amersham), o qual produz a proteína recombinante fusionada a GST. Os insertos existentes nas construções plasmidiais pMOS-3043, pMOS-1629 e pMOS- Δ 4731 (produção da proteína truncada) foram transferidos para os vetores de expressão.

O cassete de DNA da ORF NCU03043 (1.101 pb) foi retirado da construção pMOS-3043 por digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI*. Como essa ORF possui um sítio de *NdeI* no meio da sequência nucleotídica, a transferência para o vetor de expressão pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas foi realizado em duas etapas. Primeiramente, isolou-se o fragmento maior contendo 744 pb usando as enzimas *NdeI* e *BamHI* e o fragmento foi inserido no vetor de expressão pET28a, linearizado com as mesmas duas enzimas. Em uma segunda etapa, o fragmento menor contendo 357 pb também foi retirado da construção pMOS-3043 usando apenas a enzima *NdeI* e inserido na construção pET28a contendo o fragmento de tamanho maior (744 pb) e aberto com a mesma enzima, resultando na construção pET-3043. Esta mesma ORF (NCU03043) também foi transferida para o vetor de expressão pGEX-4T1.

Neste processo, o fragmento todo foi retirado da construção pMOS-3043 por digestão com a enzima *Bam*HI e ligado ao vetor pGEX-4T1 linearizado com a mesma enzima.

O inserto da ORF NCU01629 (1.263 pb) foi retirado da construção pMOS-1629 por digestão com as enzimas *Nhe*I e *Eco*RI e transferido para o vetor de expressão pET28a previamente digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pET-1629. A ORF NCU Δ 4731 foi retirada da construção pMOS- Δ 4731 por digestão com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI e inserida do vetor de expressão pET28a digerido com as mesmas enzimas, gerando a construção pET- Δ 4731. Os produtos de ligação foram usados para transformar células de *E. coli*. A seleção dos transformantes foi realizada através do plaqueamento em meio de cultura 2YT + 0,2% glicose, suplementado com 100 μ g/mL de canamicina (construções em pET28a) e 100 μ g/mL de ampicilina (construções em pGEX-4T1). Após a extração do DNA plasmidial, os clones positivos foram confirmados por análise de restrição e por seqüenciamento de DNA.

13.2. Ensaio de indução e análise de solubilidade

As construções plasmidiais foram transformadas em *E. coli* BL21(DE)pLys-S, Rosetta ou *ArcticExpress* competentes para a análise de indução e solubilidade das proteínas. Para os ensaios de produção na linhagem de *E. coli* BL21, os controles negativo e positivo foram o vetor pET vazio e a construção pET-XAC2369 (produção de uma proteína de *Xanthomonas citri* subsp. *citri*), respectivamente. A construção pET-CopB (produção de uma proteína de *X. citri*) foi usada como controle positivo no ensaio de indução na linhagem *ArcticExpress*. Na construção em pGEX (pGEX-3043), apenas o controle negativo (pGEX vazio) foi utilizado. Colônias isoladas de cada transformação foram utilizadas nos ensaios de produção das proteínas recombinantes. Inicialmente, as células foram inoculadas em 5 mL de meio 2YT + 0,2% glicose contendo o antibiótico adequado, e incubadas por 16 horas a 37 °C, 200 rpm (pré-inóculo). Após o crescimento, 1 mL da cultura foi inoculado em 50 mL de meio 2YT + 0,2% glicose, nas mesmas condições acima até atingir uma $DO_{600nm} = 0,6-0,8$. Uma alíquota de 2 mL de cada amostra não-induzida (NI) foi retirada em tubo eppendorf e coletada por centrifugação a 14.000 rpm/2 min/4°C. Posteriormente, a produção das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM a 37°C, 250 rpm por 4 horas. As células da linhagem *ArcticExpress* foram induzidas a 12°C, 250 rpm por 24 horas. Ao final da indução as células foram coletadas (14.000 rpm/5 min/4 °C) em centrifuga em Beckman modelo AvantG25 e o sobrenadante foi descartado.

Os precipitados celulares foram ressuspensos nos tampões de lise: Tris (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 mM NaCl; 5% glicerol; 0,5% tween-20; 0,5% triton x-100) ou Hepes (50 mM Hepes, pH 7,0; 500 mM NaCl; 5% glicerol; 0,5% NP-40), acrescidos de 5mM EDTA, 1mM PMSF e 10 mM benzamidina. Posteriormente, as células foram lisadas em sonicador (SONICS, Vibra Cell) com 3 pulsos de 30 segundos e intervalos de 30 segundos no gelo (potência 30%).

O lisado celular foi centrifugado a 20.000 rpm/20 min/4 °C e o sobrenadante recolhido em tubo limpo. O precipitado foi ressuspensão em 3 mL do mesmo tampão de lise, assim como também as células não-induzidas (NI) foram ressuspensas em 300 µL dos tampões.

Após a quantificação de proteínas (HARTREE, 1972), quantidades do extrato total das amostras NI (não-induzida), S (sobrenadante) e P (precipitado) de cada amostra e controles foram separados por SDS-PAGE em gel 12% (LAEMMLI, 1970). A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente a 100 V durante 2-3 horas, no sistema de eletroforese Mini-Protean III (Bio-Rad).

13.3. Confirmação por *Western blot*

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

Para a detecção da proteína fusionada à GST (pGEX-3043), a membrana foi incubada com anticorpo primário anti-GST (IgG coelho) (diluição 1:5.000 em 1X TBST + 3% leite) por 2 horas a temperatura ambiente, lavada com 1X TBST três vezes (5 minutos cada lavagem) e incubada com anticorpo secundário anti-IgG (coelho) conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:30.000 em 1X TBST + 3% leite) por 2 horas a temperatura ambiente. Após as lavagens em 1X TBST, procedeu-se a revelação incubando a membrana durante 40 segundos em 5 mL de uma solução tampão 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, contendo ácido p-cumárico 0,2 mM e luminol 1,25 mM e 1,5 µL de peróxido de hidrogênio 30%. Em seguida, a membrana foi exposta ao filme radiográfico Kodak T-Mat por cerca de 10 segundos à temperatura ambiente.

13.4. Purificação de proteínas recombinantes

Após a confirmação da expressão das proteínas pelo método de *Western blot*, as células de *E. coli* BL21, Rosetta ou *ArcticExpress* carregando as construções produtoras das proteínas recombinantes foram induzidas em maior volume para a realização do procedimento de purificação.

13.4.1. Purificação de proteína recombinante em pequena escala

Células de *E. coli* BL21 expressando a proteína His-3043 foram crescidas em 200 mL de meio 2YT + 0,2% glicose contendo canamicina (100 µg/µL) e cloranfenicol (34 µg/µL). A indução em mesma quantidade de meio também foi realizada em células *E. coli ArcticExpress* expressando a proteína His-1629 e os antibióticos usados foram canamicina (100 µg/µL), spectinomomicina (75 µg/µL) e gentamicina (20 µg/µL). As condições de indução utilizadas nos ensaios que apresentaram produção e solubilidade das proteínas foram mantidas nos ensaios de produção para a purificação da proteína.

Após indução, as células contendo a proteína His-3043 foram coletadas e ressuspensas em 2 mL do tampão de lise Tris contendo uma baixa concentração de Imidazol (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 10% glicerol; 0,01% Triton X-100) acrescentado de uma mistura de inibidores de protease (0,5 mM PMSF, 1 mM DTT, 5 µg/mL de cada antipainá, pepstatina A, leupeptina e benzamidina). Para as células contendo a proteína His-1629, o mesmo procedimento foi realizado, porém, as células foram lisadas em tampão Hepes contendo Imidazol (50 mM Hepes pH 7,0; 500 mM NaCl; 20 mM Imidazol; 5% glicerol; 0,5% NP-40). 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 (5 ciclos de 10 seg, com intervalos de 1 min em gelo) e o sobrenadante recolhido após centrifugação (20.000 rpm/20 min/4°C). Antes de seguir com a purificação da proteína recombinante contida no sobrenadante, uma alíquota foi reservada para a análise por SDS-PAGE (amostra S).

As proteínas recombinantes contidas no sobrenadante foram isoladas com diferentes volumes de resina de Ni-NTA-agarose (Qiagen) na bancada. Inicialmente, a resina foi condicionada através de sucessivas lavagens em tampão de lavagem gelado (mesmo tampão utilizado na lise contendo inibidores de protease). Posteriormente, a resina condicionada foi adicionada ao conteúdo do sobrenadante (aproximadamente 2 mL), o qual foi homogeneizado manualmente e incubado a 4 °C durante 1 hora, sob agitação suave. Após a ligação da proteína à resina, a mesma foi centrifugada e o sobrenadante separado (amostra FT1 – *flow through*). A resina foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e todas as frações das lavagens foram reservadas em um só tubo (FT2 – *flow through*). As proteínas ligadas à resina foram eluídas em diferentes concentrações de imidazol: 100, 300 e 500 mM (E1, E2 e E3) preparado em tampão de eluição (Tris ou Hepes) contendo inibidores de protease. A proteína His-3043 foi

dialisada contra 1 L de tampão de diálise (10 mM Tris-HCl pH 7,9; 100 mM KCl; 20% glicerol v/v; 1 mM EDTA e 0,5 mM DTT) por 16 horas (D1 e D2). As proteínas dialisadas foram centrifugadas (14.000 rpm/20 min/4 °C) para a remoção de eventuais precipitados. Todas as frações foram quantificadas por Hartree (1972) e analisadas em gel SDS-PAGE em gel 12% (LAEMMLI, 1970).

13.4.2. Purificação em larga escala

As culturas celulares submetidas à purificação em larga escala foram crescidas em 1L de meio 2YT + 0,2% glicose, contendo antibiótico conforme a linhagem *E. coli* e vetor, o qual a proteína é expressa. Para a purificação de His-3043, GST-3043 e His-1629, as culturas celulares foram induzidas nas condições que apresentaram melhor solubilidade e o precipitado de células foi ressuspenso em 30-60 mL de tampão de lise acrescentado de uma mistura de inibidores de protease (0,5 mM PMSF, 25 mM benzamida e 50 mM NaF). O tampão Tris (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 300 mM NaCl; 80 mM imidazol; 10% glicerol) foi utilizado na purificação da proteína His-3043, o tampão Hepes (50 mM Hepes pH 7,0; 500 mM NaCl; 150 mM imidazol; 5% glicerol;) na purificação da proteína His-1629 e o tampão PBS pH 7,8 (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4) para purificar a proteína fusionada a GST (GST-3043). As células foram submetidas a três ciclos de choque térmico, alternando entre congelamento em N_2 líquido e banho de água fria. O rompimento celular foi finalizado em sonificador (5 ciclos de 30 seg, com intervalos de 30 seg em banho de gelo) e o sobrenadante recolhido após centrifugação (30.000 x g/4 °C/30 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 histidina foram eluídas em um gradiente linear de concentração de imidazol preparado no mesmo tampão de homogeneização sem os detergentes. A proteína His-3043 foi eluída em um gradiente linear de 80 a 500 mM de imidazol e a proteína His-1629 em um gradiente 150 a 500 mM. Já a proteína fusionada a GST (GST-3043) foi eluída em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 200 mM NaCl e 10 mM de glutatona. Os produtos purificados foram analisados em gel de poli-acrilamida 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).

14. Análise da ligação DNA-proteína por EMSA

Os ensaios de EMSA, também conhecido como ensaio de mobilidade em gel, foram realizados com a proteína recombinante His-3043 e com extrato proteico total de *N. crassa*.

Nesses ensaios, fragmentos de DNA marcados (sondas) dos promotores *gsn* e *gpn* foram testados quanto à capacidade de ligação das proteínas.

14.1. Preparo do extrato bruto protéico

Uma suspensão de conídios da linhagem selvagem de *N. crassa* (aproximadamente 10^9 células/mL) foi inoculada em 2 L de meio VM líquido e colocada a 30°C sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C.

Cerca de 10 g do micélio foi pulverizado em nitrogênio líquido. Em seguida, o pó foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de tampão de lise (15 mM HEPES pH 7,9; 500 mM KCl; 0,5 mM EDTA pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 25 mM benzamidina, 1 mM DTT; 0,5 mM PMSF; 50 mM NaF; 10 µg/µL de antipainá e pepstatina A; 10% (v/v) glicerol) e homogeneizado com *glass beads* em *vortex* (8 pulsos de 30 seg x 30 seg no gelo). A solução protéica foi separada das *beads* por centrifugação (4.000 rpm/4°C/2 min), transferida para tubos eppendorfs limpos de 2 mL e centrifugada a 14.000 rpm/4°C/15 min. O sobrenadante foi dializado contra tampão D (15 mM HEPES pH 7,9, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, glicerol 15%) por 2h e submetido à purificação por cromatografia de afinidade em coluna de Heparina-Sepharose (5 mL) (GE Healthcare) em aparelho de purificação Akta Prime (Amersham). A estrutura da heparina no método utilizado serve como análogo ao DNA permitindo a ligação de proteínas ligadoras de DNA. As proteínas foram eluídas em um gradiente linear de 0,1 a 1,5 M de KCl preparado em tampão D de coluna gelado. As frações coletadas foram dializadas duas vezes contra tampão D, e reservadas para serem testadas quanto à capacidade de ligação com sonda de DNA específica.

14.2. Preparo e marcação das sondas de DNA

Sondas radiativas correspondentes aos fragmentos de DNA a serem analisadas quanto à capacidade de ligação das proteínas foram obtidas por PCR, utilizando *primers* (tabela 4). As reações de amplificação foram realizadas utilizando 1,0 µg DNA, 0,5 µL de enzima *Taq Polimerase* (*Invitrogen*), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 5 µL de tampão de PCR 10x, 2,5 µL de MgCl₂ 50 mM, 1 µL de dNTP (10 mM) e 2 µL de α-[³²P]dATP (10⁴ cpm). Os ciclos da PCR foram: desnaturação (96°C/1 min), anelamento (50-52°C/1 min) e extensão (72°C/1 min), por 39 ciclos, num volume final de 50 µL de reação. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados em *low melting point* agarose 2% em TAE 1X, precipitados com glicogênio 20%, acetato de sódio 3 M (pH 5,2) e etanol absoluto e usados como sondas nos ensaios de EMSA. A capacidade de ligação da proteína recombinante purificada His-3043 foi testada em relação à duas seqüências da região promotora do gene *gpn* contendo o elemento

cis correspondente ao sítio de ligação da proteína homóloga F1bC. Os fragmentos de DNA contendo as seqüências desejadas usados como sonda referente ao promotor *gpn* foram amplificados por reações de PCR contendo 1 µL (100 pmol/µL) dos pares de oligonucleotídeos F1bC-F /F1bC-R.

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios no preparo de sondas para EMSA.

Oligonucleotídeos
SREBP-FP2: 5'-CATgggAgTATTCgTTgC - 3'
SREBP-RP2: 5'-TCTgACCTTTCCCAATCAg - 3'
F1bC-F: 5'-gggAgACggCAAaggCgAT - 3'
F1bC-R: 5'-gAaggACATAgAgATAgg - 3'

Neste processo, um primeiro fragmento de DNA foi amplificado a partir de 400 ng de DNA genômico da linhagem selvagem utilizando a enzima *Taq Polimerase* (*Invitrogen*) em um volume final de 50 µL de reação. Esse fragmento foi excisado do gel de agarose 1%, purificado através do kit GeneClean (BioMP) e clonado no vetor pMOSBlue (pMOS-*gpn*). Para o preparo das sondas de DNA, uma nova reação de PCR contendo 3 µL de α-[³²P]dATP (10⁴ cpm) foi realizada, conforme descrito anteriormente, a partir da construção pMOS-*gpn*. O produto da amplificação foi digerido com as enzimas *SacI* e *HindIII* para a liberação de seqüências de DNA com 241 pb e 313 pb, os quais foram utilizados nas reações de ligação.

Para o preparo da sonda Sre1, um fragmento de DNA do promotor *gsn* contendo o elemento *cis* correspondente ao sítio de ligação da proteína codificada pela ORF NCU04731 foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos SREBP-FP2 e SREBP-RP2. A reação de PCR foi realizada conforme descrito anteriormente e o fragmento de DNA resultante da amplificação gerou uma sonda de 164 pb.

14.3. Competidores específico e inespecífico para os ensaios

Em todas as reações de ligação contendo a proteína e a sonda marcada para análise da interação DNA-proteína foram utilizados o copolímero poli(dI-dC)•(dI-dC) (GE Healthcare) como competidor inespecífico. Em uma segunda etapa do processo, competidores específicos foram preparados como as sondas utilizadas, sem sofrerem marcação radiativa e foram utilizados para a confirmação da especificidade da interação DNA-proteína apresentada. A reação de PCR foi mantida nas mesmas condições descritas com os mesmos oligonucleotídeos, e os fragmentos de DNA foram purificados em *low melting point* agarose 2% em TAE 1X.

14.4. Ensaio de mobilidade em gel

A interação DNA-proteína foi realizada em 30-100 µL de um tampão de ligação 1X (125 mM HEPES pH 7,9, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA pH 8,0, 50% glicerol v/v) contendo uma mistura de inibidores de protease (0,05 mM DTT, 0,025 mM PMSF, 5 µg/mL benzamidina, 5 µg/mL antipain A, 5 µg/mL pepstatina, 5 µg/mL NaF), 2 µg/reação de poli(dI-dC)•(dI-dC) e 2,0 a 20 µg da proteína recombinante His-3043 purificada ou 20-60 µg do extrato total (no caso da sonda Sre1). Na primeira etapa da reação, diferentes concentrações de proteína (purificada ou do extrato celular total) foram incubadas em tampão de ligação à temperatura ambiente adicionadas de 0,6 ng de sonda marcada (10^4 cpm) durante 20 min. Para o ensaio de competição, o competidor específico foi adicionado à reação de ligação 10 minutos antes da adição da sonda marcada. O competidor específico foi adicionado em um excesso molar de 10 a 20X superior à concentração de sonda. Após incubação com a sonda, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 4-5% (29:1) não desnaturante, em tampão TBE 0,5X (300 V, 10 mA, 15°C). O gel foi secado e autoradiografado em filme Kodak T-Mat G/RA.

15. Análise computacional dos fatores de transcrição selecionados

As seqüências nucleotídicas das ORFs que codificam os fatores de transcrição das linhagens mutantes selecionadas e as seqüências polipeptídicas foram identificadas no banco de genes de *N. crassa* (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>). Para a estimativa teórica das propriedades físico-químicas dos fatores de transcrição foi utilizado a ferramenta ProtParam no site do servidor ExPASy (www.expasy.org/tools/protparam-ref.html). A detecção e caracterização dos domínios conhecidos presentes nos fatores de transcrição foi feita por meio das informações disponíveis no genoma do fungo (<http://www.fgsc.net/scripts/strainsearchform.asp>), pelo SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), Pfam 22.0 (<http://pfam.sanger.ac.uk>) e os domínios transmembrana foram analisados pelo SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html).

As seqüências polipeptídicas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), utilizando a ferramenta Blastp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Para o alinhamento múltiplo das seqüências de proteínas que apresentaram similaridades relevantes com a análise do Blastp, foram utilizados os seguintes programas: ClustalW, no site do *European Bioinformatics Institute* (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw>) e o *Boxshade*, no site *Box Shade Server* (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

Resultados e Discussão

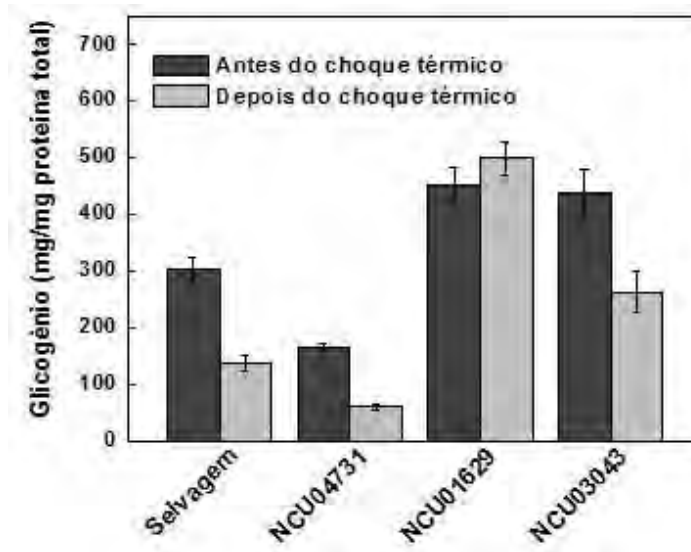
1. Determinação do conteúdo de glicogênio e análise da expressão do gene *gsn*

Linhas de fungo contendo genes (que codificam as proteínas estudadas no presente projeto) nocauteadas pela inserção de uma marca de resistência foram avaliadas em relação aos seus conteúdos de glicogênio e expressão do gene *gsn* por *Northern blot* e comparadas à linhagem selvagem. As linhagens mutantes analisadas, adquiridas junto ao FGSC foram: FGSC#11139, FGSC#11102 e FGSC#11355, as quais apresentam, respectivamente, as ORFs NCU04731, NCU01629 e NCU03043 nocauteadas. Esses experimentos foram realizados anteriormente no laboratório por outros alunos e as linhagens mutantes foram selecionadas por apresentarem perfis de acúmulo de glicogênio distintos da linhagem selvagem. No decorrer deste trabalho foi visto que a linhagem mutante na ORF NCU04731 não estava corretamente nocauteada no gene alvo. Por esse motivo, uma nova linhagem mutante foi adquirida pelo FGSC e, após confirmação do nocaute, novas análises envolvendo acúmulo de glicogênio e expressão do gene *gsn* foram realizadas com a mesma.

As linhagens mutantes foram analisadas em relação ao conteúdo de glicogênio e expressão do transcrito *gsn* na temperatura normal de crescimento (30 °C) e em situação de choque térmico (45 °C) e as quantificações foram realizadas nas amostras dos micélios coletados em tais situações. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 2A. Na linhagem selvagem ocorreu uma redução do conteúdo de glicogênio após o choque térmico quando comparado à condição normal de crescimento. Em relação ao acúmulo de glicogênio nas linhagens mutantes nas ORFs NCU04731 e NCU03043, apesar de também apresentarem diminuição nos níveis de glicogênio após o choque térmico, as quantidades foram diferentes quando se compara às apresentadas pela linhagem selvagem. Já a linhagem mutante na ORF NCU01629 apresentou conteúdos de glicogênio antes e após choque térmico similares e não mostrou redução após choque térmico.

A expressão do gene *gsn* por *Northern blot* foi realizada a partir do RNA total extraído a partir dos mesmos micélios utilizados na dosagem de glicogênio. Nesse experimento, a expressão do gene foi analisada utilizando o transcrito RNA ribossômico 18 S como controle endógeno e os resultados estão apresentados na figura 2B. Resultados obtidos anteriormente no laboratório mostraram que a expressão do gene *gsn* é máxima em 24 horas de crescimento e é drasticamente reduzida após choque térmico (DE PAULA et al., 2002; FREITAS; BERTOLINI, 2004). Esse perfil apresentado pela linhagem selvagem pode ser visto na figura 2B. As três linhagens mutantes apresentaram um perfil de expressão do gene *gsn* diferente da linhagem selvagem. A linhagem mutante na ORF NCU04731 apresentou níveis do transcrito *gsn*, tanto antes quanto depois do choque térmico, superiores em relação aos observados pela linhagem selvagem, apresentando uma pequena redução após choque térmico. A linhagem mutante na ORF NCU01629 apresentou níveis iguais do transcrito do gene *gsn*, antes e depois

A



B

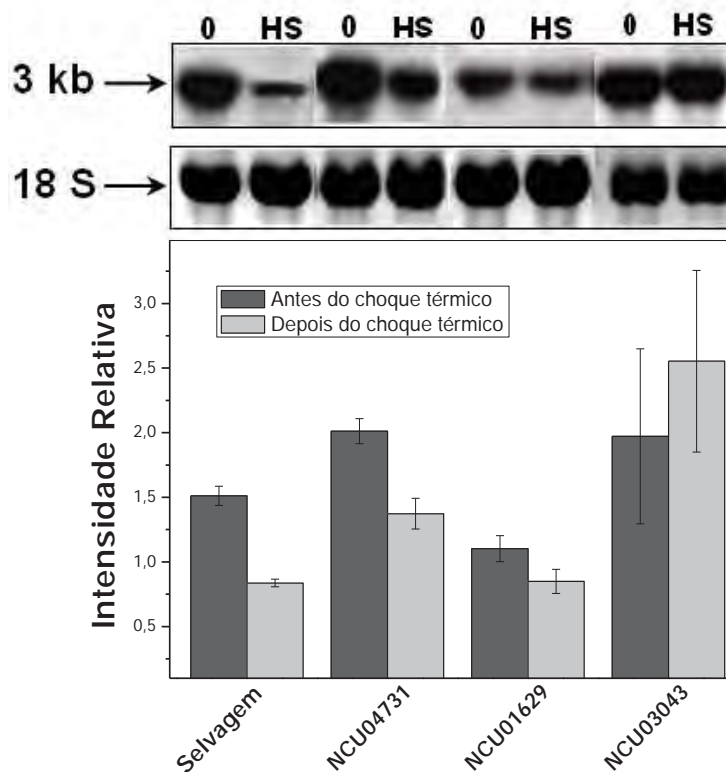


Figura 2- Acúmulo de glicogênio e expressão do gene *gsn* antes e depois do choque térmico nas linhagens mutantes selecionadas. (A) Análise das linhagens mutantes selecionadas juntamente com a selvagem em relação ao acúmulo de glicogênio. **(B)** Expressão do gene *gsn*. Autorradiografia do gel, perfil do RNAr 18S em gel de agarose e análise densitométrica da imagem utilizando o software ImageJ (ABRAMOFF; MAGALHÃES, 2004). A expressão relativa foi calculada pela razão entre *gsn* RNAm/18 S RNAr.

do choque térmico, sendo antes do choque térmico inferior ao apresentado pela linhagem selvagem. Na linhagem mutante que possui a ORF NCU03043 nocauteada, apesar de o perfil de acúmulo de glicogênio ser semelhante ao observado na linhagem selvagem, a expressão do gene *gsn* foi diferente, apresentando níveis aparentemente iguais do transcrito tanto antes como depois do choque térmico. Os experimentos apresentados mostraram que os fatores de transcrição codificados pelas 3 diferentes ORFs podem estar envolvidos na regulação do metabolismo do glicogênio, possivelmente regulando a expressão do gene *gsn*.

Os resultados descritos acima motivaram a realização de estudos mais detalhados com essas proteínas a fim de obter uma caracterização funcional dos fatores de transcrição e verificar a relação destas proteínas na regulação da via metabólica do glicogênio.

2. Características dos fatores de transcrição

Utilizando as informações disponíveis no banco de dados do genoma do fungo *N. crassa*, juntamente com a utilização de ferramentas de bioinformática, foi possível obter dados sobre os fatores de transcrição selecionados. A Tabela 5 apresenta algumas informações sobre as proteínas estudadas como o tamanho do cDNA, número de resíduos de aminoácidos, massa molecular e ponto isoelétrico estimados e a família dos fatores de transcrição. As proteínas estudadas encontram-se anotadas no banco de dados do fungo como proteínas hipotéticas. As figuras 3 e 5 indicam o posicionamento e a localização exata dos domínios de ligação ao DNA encontrados nos fatores de transcrição estudados. Nota-se que a proteína codificada pela ORF NCU03043 possui dois domínios da família *zinc finger* na região C-terminal (figura 3). A proteína codificada pela ORF NCU01629 possui três domínios *zinc fingers* localizados mais próximos à região C-terminal e o fator de transcrição codificado pela ORF NCU04731 possui o domínio *helix-loop-helix* (bHLH) na região central da proteína (figura 3). Na figura 5, as sequências de aminoácidos das proteínas são mostradas e as regiões dos domínios encontrados foram salientados.

Uma proteína regulatória reconhece uma seqüência de DNA porque a superfície da proteína é extensivamente complementar às características da dupla-hélice naquela região. Na maioria dos casos, a proteína faz um grande número de contatos com o DNA, envolvendo pontes de hidrogênio, pontes iônicas e interações hidrofóbicas. O primeiro motivo protéico de ligação a DNA a ser reconhecido foi o hélice-volta-hélice, existente na proteína codificada pela ORF NCU04731 (figura 4). Esse motivo é apresentado em proteínas de procariotos e eucariotos sendo formado por duas α -hélices ligadas por uma pequena cadeia estendida de aminoácidos, que constitui a “volta”. As duas hélices são mantidas num ângulo fixo, primariamente através de interações entre elas. Uma dessas hélices se encaixa no sulco maior

Tabela 5: Dados bioquímicos dos fatores de transcrição estudados.

ORF	cDNA (pb)	Resíduos de AA	Massa molecular estimada (kDa)	Ponto isoelétrico	Família do Fator de Transcrição
NCU03043	1.101	366	39,45	8,79	<i>zinc finger C₂H₂</i>
NCU01629	1.263	420	45,91	8,82	<i>zinc finger C₂H₂</i>
NCU04731	3.225	1.075	108,85	6,5	bHLH

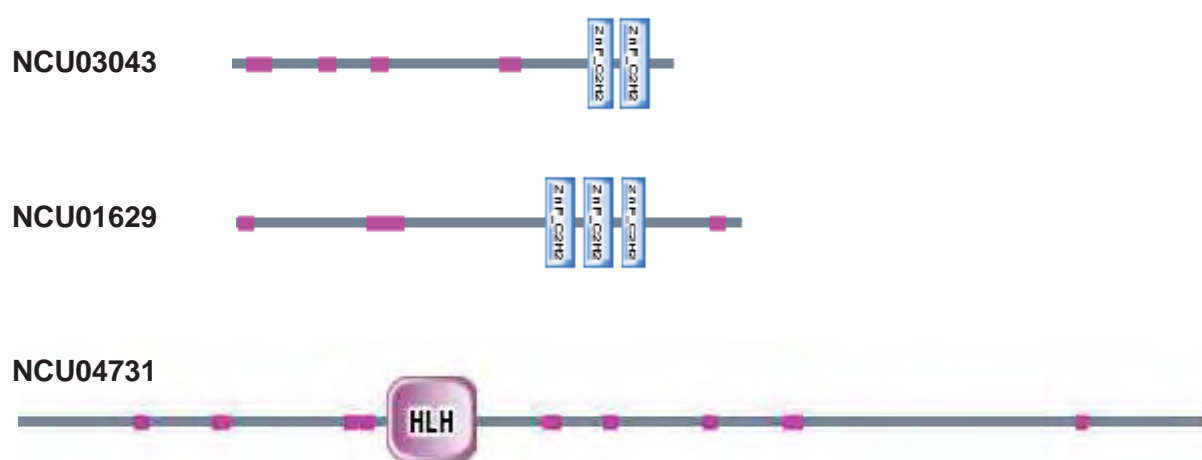


Figura 3- Representação esquemática dos fatores de transcrição selecionados feita pelo servidor EMBL-SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>). O quadrado em rosa claro representa o domínio HLH, barras em azul claro representam domínios C₂H₂ e as barras em rosa representam seqüências com baixa complexidade ou domínios com funções desconhecidas.

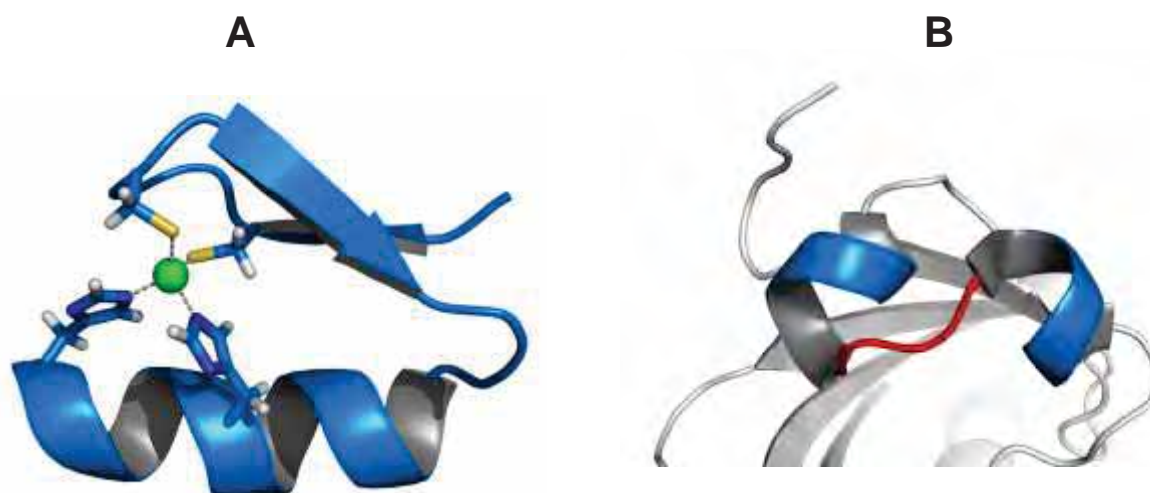


Figura 4- Representação esquemática dos domínios de ligação ao DNA C₂H₂ (A) e bHLH (B).

NCU03043

MSYQSSQPHFTNPWGSSSGPGGPPPPPPPPQPPAPQNMYYINNRRDSAGLPHLNLAALPKRQHDVRNGSVWPHQPAAPGP
 VTTAPAGSAPMADVRRQDQLLSMPQDHLGLNRMHPATSTAYDTSAYTTSASPSTVSTNYPPSTSQYELGYPPATMRG
 AFGMAPDDTARRYSQQGIQPDRRSFQDALEASQGLTMSQETPRNIYDVRNRARGSTDSYGFPPQTHSTGSSVSSAS
 FGGYYGGSVDGSI SDYSTAGSDIE SLGRSLPRPQGLMSSQPPAPQSMMSFSKSVSTSTSKK **HKCKVCDKRFTRP**
SSLQTHMYSHTGKEP **FHCEVEGCGRQFSVVSNLRRHKKVH**KPQSETPSETGSEAGQHSE

2 Domínios de ligação <i>Zinc finger C₂H₂ type</i>
295 a 317 aminoácidos
323 a 347 aminoácidos

NCU01629

MALTPPSLTRSPSTPSHSYCPSESSVGYPSPLVEQQYKISSIYGDQSCSVTSSMDPGSSLPPLSMGQPDWNSTV
 ILPASSATGMPSVLAAYEYSGSYPSYSHDVYHSHHSGHPLSTSTPPPSGPPSSRSP IPPASRTSHPYLSNASMGSSLT
 PRVKMETEYSSMEVSQYPSRSMHTSYPSDSGAYTHNTAGYLSDDGSSGWQKSDYPPLETFYPPGPAQAQTS AFLQ
 NGQRSYRVPRPKRQORRLTTKEEAN **FQCEVKGCGKLF SRSYNYKAHLETH**EPNRDYP **FPCQEAGCTKKFV**
RKTDLQRHHQSVHLKERS **HKCDYCGRLFARKDTLRRHME**DGCSKRFDIGTMDLRPETYDSFARPPSSSGPMS
 QHYTLSSSTNNIDSLPMAIPSLGSSGILSSLSSMRAGGGQGHWSGR

3 Domínios de ligação <i>Zinc finger C₂H₂ type</i>
257 a 281 aminoácidos
289 a 314 aminoácidos
320 a 340 aminoácidos

NCU04731

MADPDADSPGRFQGGGLDSFDISTPLQLDEPTLARHGSLNANVNDAVTNSDPTSIPSSSLADTSRASTGGGPTRQYPNH
 SPPIGHHQPNAYHNGNISPQQQYQQQQQQQQAQAFDFNQDNISNWDLRDSPPFNSGPDFNFGQVPHGLNIPQSWDL
 PVHFSINSQGLQQGQPGQQQQGFYPDTTGAGIDPGIYAAALSIPSPQQQSAEPI SVRRTNINPNIRHKLTPAQQR
 LKTIAMPPhLQYHSPKSAGSPDSNASMGHDKGSASSPDGLEPSKPNRKRKSSDEVEDDDDDDLGHQPVKKTAH **N**
MIKRYRTNLNDKIAALRDSVPALRIMSKSARGEDTTEDREELHGLTPAHKLNKATVLSKATEY
IRHLEKRNRLI EENNSMHARIAAFEKLFMAGAMTGMTNPMQAPPTPIQYQDVAAFMSTPMQTPRGPDPGLIIP
 IPDDMKRILSAQQMNAGRPYVPGPPAIQPGFVANPGVIRRQIQQQQQQHMQGRWNPYLGKMMVGS LAGLMLVEAA
 MEQEASNETTEGRGLYALPLQLIGSFIRSSHLVGGYYISAIDI IAKLKL LLLGALLVWTIFPQSF FDAPKSEKPKG
 PTSAVQAVPSLASPIHVRRQAWLTAIQTVWVPRHNFLLLEATALLLTKLFTLRNVFVGVGTYLWMTGLSEEQEAA RVK
 AWTIALDAQLAGGDVEINRSRLTLTLASGTLPTPHRLMLKALHTRVLLWQLSSKFSLANLPAAKIARSRWNEARQ
 LNMILQRTSTSPEDVLP EHLATLLEQDCDDVLNNSIVQRAHNLA FNRP AFNLVDLTDGMNIVVEDPAVRSPMDAVA
 AWYSSSILQRVLLTSLARAQDGITDATQEI IDEIALAAKIAPIGSNAYLRALVARAVLVSEKRGGSIAAALKASDPS
 LNPDKHPEYGRGVPLIDSPMAQIVPDHDALMALQYAMRI AHLQKFPDPPKQAI AFLNSILPGGTDQPKHEGSSAPV
 RWNAWQAR

1 Domínio de ligação <i>bHLH type</i>
308 a 382 aminoácidos

Figura 5- Seqüências de aminoácidos das proteínas estudadas destacando as regiões dos domínios de ligação ao DNA.

do DNA tendo um papel importante no reconhecimento da seqüência específica de DNA, na qual a proteína se liga. Esse domínio possui a característica de se ligar ao DNA como dímeros assimétricos, que são compostos por dois “meio-sítios” muito semelhantes arranjados simetricamente. Esse arranjo permite que cada monômero protéico faça um conjunto idêntico de contatos e aumente enormemente a afinidade da ligação (ALBERTS et al., 2004).

Outro grupo importante de motivos de ligação ao DNA utiliza uma ou mais moléculas de zinco como um de seus componentes estruturais (figura 4). Esse motivo é conhecido como *zinc finger*, referente à aparência que ele apresenta e está presente nas outras duas proteínas estudadas nesse trabalho (codificadas pelas ORFs NCU03043 e NCU01629). Estudos estruturais mostraram que esse domínio é representado por vários grupos. O grupo no qual a estrutura apresenta duas cisteínas e duas histidinas ligadas por um átomo de zinco (*zinc finger C₂H₂*) é encontrado nas proteínas estudadas. O domínio é formado por uma estrutura simples consistindo de uma α -hélice e uma folha β -pregueada mantidas pelo átomo de zinco. Esse tipo de motivo é freqüentemente encontrado em um grupo contendo outros *zinc fingers* arranjados um após o outro de tal maneira que a α -hélice de cada um encaixa no sulco maior de DNA, formando uma seqüência contínua de α -hélices ao longo do sulco (ALBERTS et al., 2004).

3. Análises por Blast e alinhamento de seqüência das proteínas

As seqüências polipeptídicas das proteínas estudadas foram analisadas por Blast com o objetivo de identificar ortólogos funcionalmente caracterizados em outros organismos. Os resultados dessa análise não são mostrados.

As análises mostraram que a proteína codificada pela ORF NCU03043 apresentou homologia à proteína FlbC de *Magnaporthe oryzae* e de outras espécies de fungo. Essa proteína foi caracterizada em *A. nidulans* (KWON et al., 2010) como um fator de transcrição contendo dois domínios do tipo *zinc finger C₂H₂* envolvido em vias necessárias para a ativação do desenvolvimento normal desse fungo. A proteína é necessária para a ativação da conidiação e controle balanceado do desenvolvimento sexual durante o ciclo de vida do fungo. FlbC é homóloga à proteína FLE1 de *Podospora anserina*, a qual foi caracterizada por Coppin (2002) como uma proteína envolvida na diferenciação dos órgãos sexuais femininos e microconidiação. Foi proposto que a proteína age como repressora da diferenciação sexual feminina a fim de manter o balanço entre as vias sexuais feminina e masculina. A deleção de ambos os genes (*flbC* e *fle1*) resulta em linhagens mutantes que apresentam alterações no desenvolvimento envolvendo conidiação e aspecto morfológico das hifas.

A proteína codificada pela ORF NCU04731 é homóloga a proteína Sre1 da levedura *S. pombe* e à SREBP (Sterol Regulatory Element Binding Protein) de mamíferos (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005), as quais são proteínas de membrana de retículo endoplasmático

e complexo de golgi cuja ativação proteolítica é controlada pela concentração de esterol na célula. Estas proteínas podem ser distinguidas de outros fatores de transcrição do tipo bHLH devido à presença de um resíduo de tirosina no lugar de arginina no domínio de ligação ao DNA. Esse aminoácido único altera as propriedades da proteína de tal forma que Sre1 e SREBPs não se ligam exclusivamente em *motifs* de DNA de promotores, mas também podem se ligar a elementos reguladores de esterol. O controle da síntese de esteróis em mamíferos via SREBP é essencial para a manutenção da estrutura da membrana celular e fluidez em organismos eucariotos. Assim como SREBP, Sre1 também sofre ativação proteolítica dependente de esterol e regula genes necessários para manter a homeostase de esterol celular.

As proteínas SREBPs são sintetizadas como proteínas precursoras inativas na membrana do retículo endoplasmático (RE) e contêm dois segmentos transmembrana de tal forma que as porções C e N-terminal encontram-se localizadas no citosol. A figura 6 mostra a atuação das proteínas SREBP e Sre1 na regulação da síntese de esterol. Na membrana do RE, SREBP se liga a uma proteína sensível a esterol denominada Scap que medeia a regulação de esterol dependente da atividade SREBP. Quando os níveis de colesterol na membrana são suficientes, Scap muda sua conformação e interage com outra proteína denominada Insig, presente no RE e SREBP permanece inativa na membrana do RE. Quando os níveis de colesterol são reduzidos, a ligação Scap-Insig é desfeita e o complexo SREBP-Scap é transportado para o complexo de Golgi. No complexo de Golgi, duas proteases desprendem SREBP da membrana sendo que uma delas cliva de forma a liberar a região N-terminal da proteína no citosol que é então transportada para o núcleo para regular a expressão gênica (ESPENSHADE, 2006). Apesar das similaridades, a via de regulação Sre1 estudada em levedura apresenta algumas diferenças e a mais importante delas é que além atuar na biossíntese de ergosterol, Sre1 é um regulador de resposta à hipóxia. Sob baixas concentrações de oxigênio, a síntese de esterol diminui e Sre1 é clivada, dessa forma, a concentração de oxigênio no ambiente afeta diretamente os níveis de esterol celular e indiretamente regula a atividade Sre1 (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005). A proteína também foi caracterizada em outros organismos como *Cryptococcus neoformans*, como indutora da ativação de genes envolvidos na afinidade de captação de ferro e cobre (CHANG et al., 2007), e em *A. fumigatus*, na regulação de genes que atuam na manutenção da parede celular (WILLGER et al., 2008). Em adição ao papel de adaptação à hipóxia, essas proteínas são importantes para a patogênese e adaptação a drogas antifúngicas.

Uma análise das características do fator de transcrição codificado pela ORF NCU04731 pelo servidor SOSUI mostrou que a proteína de *N. crassa* também possui dois domínios transmembrana. As regiões transmembrana e resíduos de aminoácidos constituintes são mostrados na figura 7.

A proteína codificada pela ORF NCU01629 não apresentou homologia a nenhuma proteína funcionalmente caracterizada em outros organismos, apenas com proteínas hipotéticas de outros fungos como *Sordaria macrospora*, *Magnaporthe oryzae*, *Verticilium dahliae* e *P. anserina*.

Alinhamentos múltiplos das seqüências polipeptídicas dos fatores de transcrição de *N. crassa* ortólogos às proteínas FLE1 e Sre1 foram realizados. A figura 8 mostra o alinhamento entre a proteína NCU03043 de *N. crassa* e as proteínas FLE1 e FlbC de alguns fungos filamentosos. O resultado do alinhamento mostrou que a seqüência da proteína é conservada, revelando uma identidade de 68% em relação à proteína FLE1 de *P. anserina* e quando comparada a FlbC de *Aspergillus clavatus*, *A. fumigatus*, *Neosartorya fischeri* e *A. nidulans* revelou identidades de 66, 62, 62 e 51%, respectivamente. A figura 9 mostra o alinhamento de seqüência da proteína NCU04731 de *N. crassa* e proteínas Sre1 de diferentes fungos (leveduras e fungos filamentosos). O resultado mostrou que uma conservação na região do domínio de ligação ao DNA, sendo a identidade de 40, 52 e 60% em relação às proteínas de *A. fumigatus*, *S. pombe*, *C. albicans*, respectivamente.

Considerando os resultados acima apresentados e a nomenclatura para genes e proteínas em *N. crassa*, neste trabalho os produtos das ORFs NCU03043 e NCU04731 foram denominados de FLBC e SRE1, respectivamente.

4. Confirmação do nocaute gênico nas linhagens mutantes

As linhagens mutantes selecionadas para este trabalho correspondem a linhagens contendo genes alvo nocauteados através da inserção de uma marca de seleção por recombinação homóloga. Com o objetivo de verificar se as linhagens adquiridas pelo FGSC eram realmente mutantes nos genes de interesse, foi realizada a confirmação do nocaute gênico. Para isso, o DNA genômico das linhagens mutantes foram extraídos e utilizados em reações de amplificação por PCR, juntamente com o DNA genômico da linhagem selvagem do fungo. O nocaute gênico da linhagem *flbC*^{KO} já havia sido confirmado anteriormente.

Os resultados apresentados (figura 10) mostraram que os genes *sre1* (3.225 pb) e o correspondente à ORF NCU01629 (1.263 pb) foram amplificados nos tamanhos esperados apenas na linhagem selvagem. Os fragmentos amplificados na linhagem selvagem foram submetidos a análises de restrição que confirmaram a presença dos genes estudados, confirmando portanto, que os mesmos genes estavam ausentes linhagens mutantes.

5. Análises de crescimento e morfologia das linhagens mutantes

5.1. Análises de crescimento

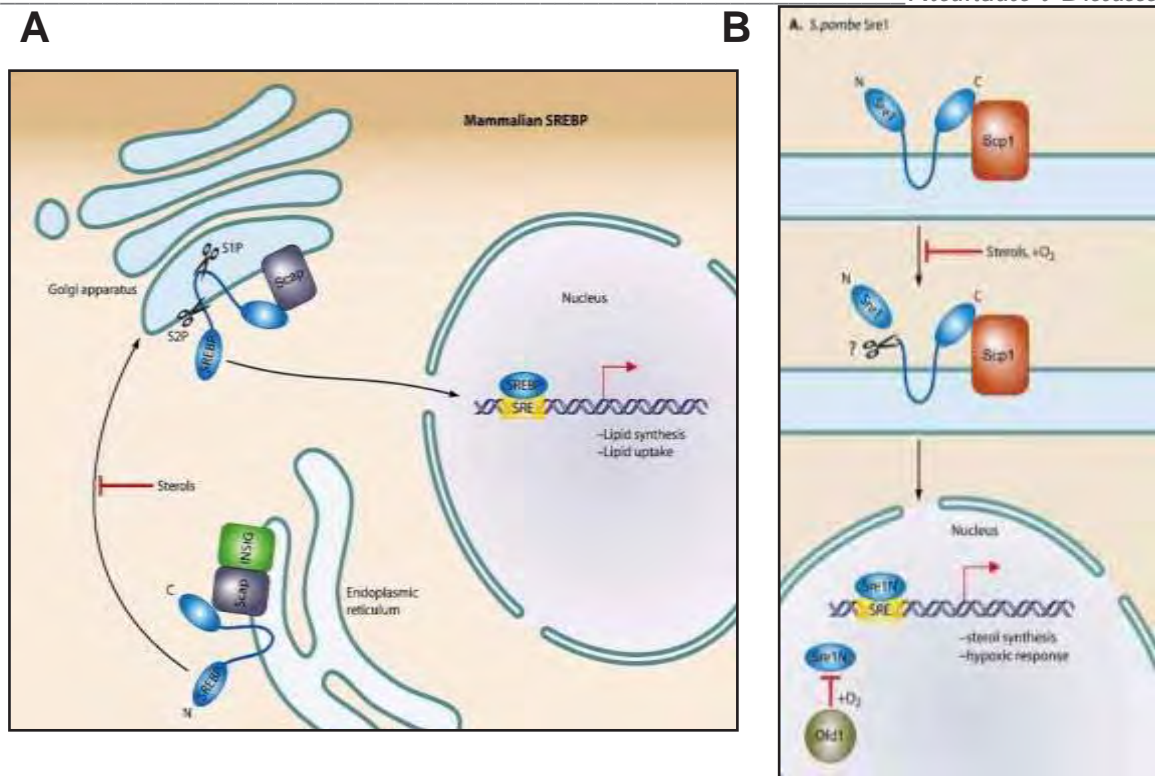


Figura 6- Via SREBP em mamíferos (A) e *S. pombe* (B). (A) Quando os níveis de esterol são insuficientes, a proteína é proteolisada e o fragmento correspondente à região N-terminal migra para o núcleo e ativa genes necessários para a síntese e absorção de esteróis e outros lípidios. (B) Regulação da síntese de esterol e adaptação a baixos níveis de oxigênio (BIEN E ESPENSHADE, 2010).

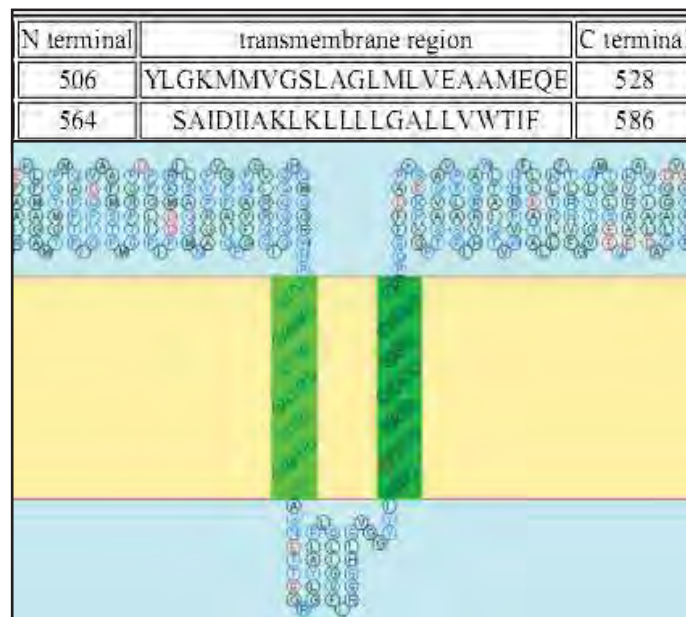


Figura 7- Representação esquemática do produto da ORF NCU04731 de *N. crassa*. Dados obtidos no site http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/sosui_submit.html.

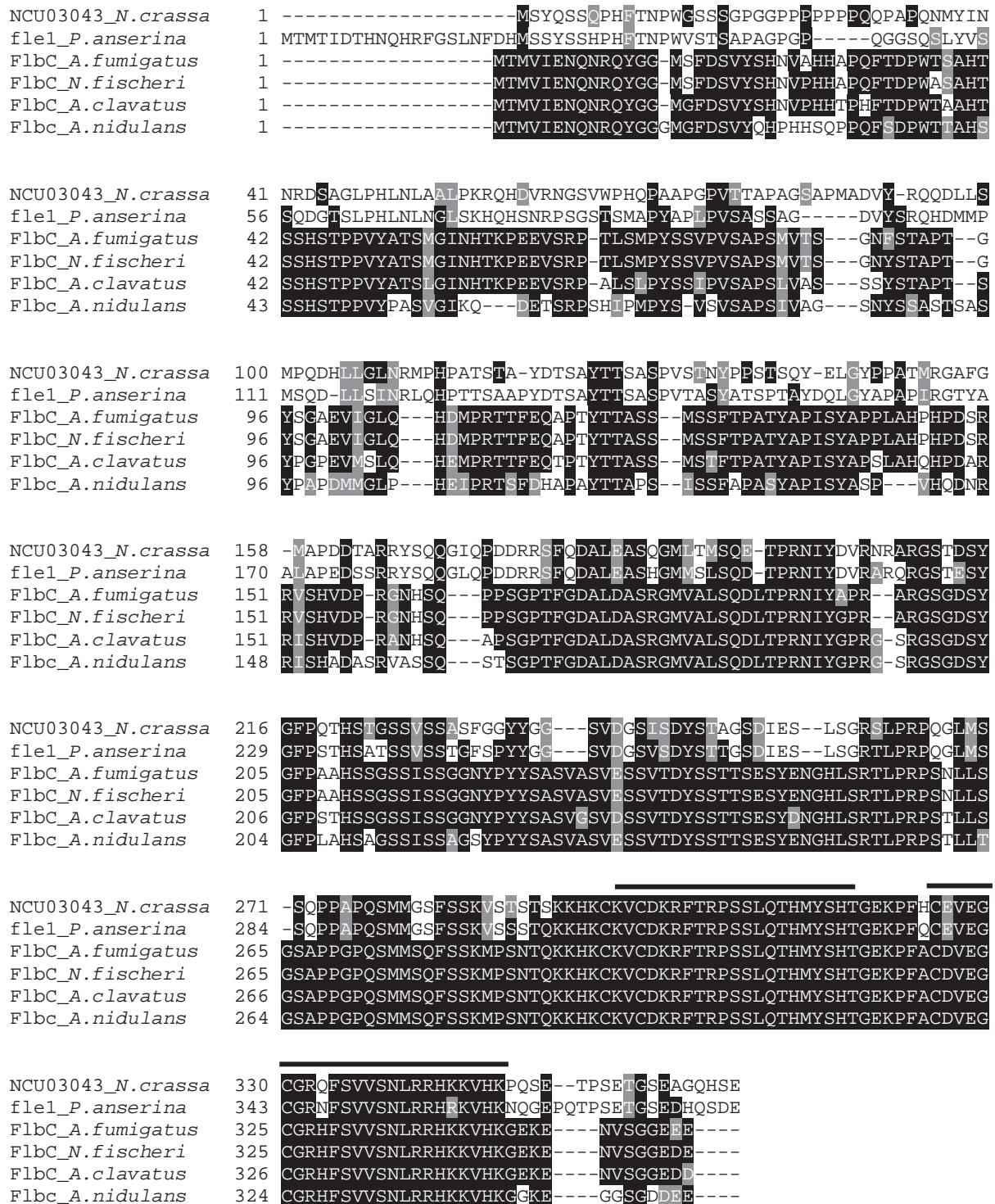


Figura 8- Alinhamento múltiplo de seqüências polipeptídicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU03043 de *N. crassa* com as proteínas FLE1 (*P. anserina*) e FlbC de diferentes fungos filamentosos. Em preto estão representados os resíduos idênticos e em cinza as trocas conservativas. As regiões salientadas representam os domínios de ligação ao DNA.

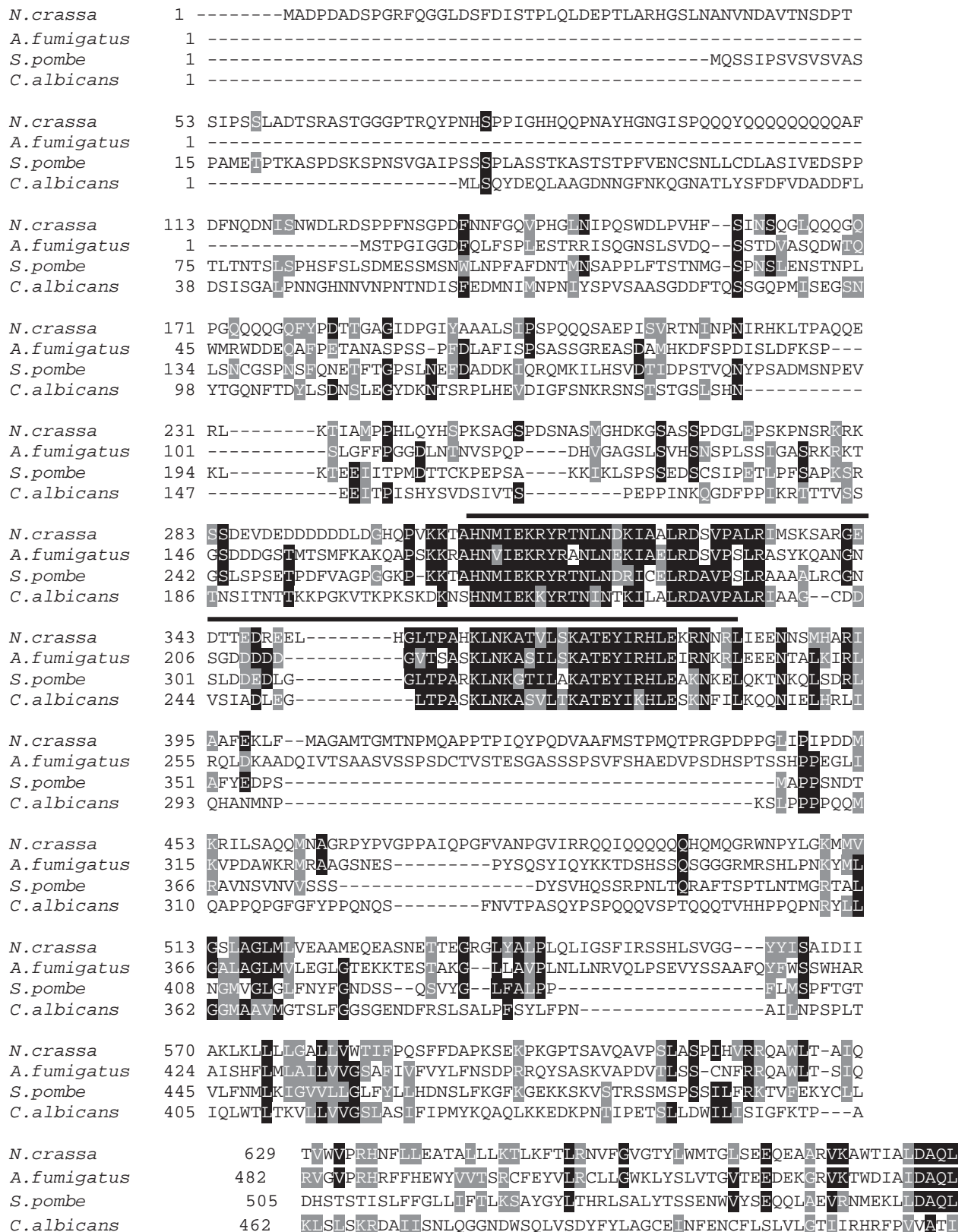


Figura 9- Alinhamento múltiplo de seqüências polipeptídicas do fator de transcrição codificado pela ORF NCU04731 de *N. crassa* com proteínas anotadas como ortólogas a Sre1 de diferentes fungos filamentosos. Em preto estão representados os resíduos idênticos e em cinza as trocas conservativas. As regiões salientadas representam o domínio de ligação ao DNA.

<i>N. crassa</i>	689	AGGDVEINRSRLITLTLASCTLPDTPHRMLKALHTRVLLWQLSS----KFSLANLPAAK
<i>A. fumigatus</i>	542	AGGDAEISKSRSLVITIFAAGTLPRSPMRMLKALHCRITLWVRVGEPPGSWTFNVSNDVARS
<i>S. pombe</i>	565	MGGDAKVDRLRLLMVFASSFSLPPSSHTCALQAMYQLTFNSNTSVP-----SATVSK
<i>C. albicans</i>	522	LNHYLSMKEALLLNLDYKGSNKSLIRLNQLLSKVDGVSIFESTNLT-----TKLTNV
<i>N. crassa</i>	745	IARSRWNEARQLNMILQRTSTSPEDVLPPEHLATLLE-QDCDDVLNNSIVQRAHNTAFNRP
<i>A. fumigatus</i>	602	LARYQWDLARKMNAALPKDHP---DSLPSHLATLLK-IDCDDVMIDTIIQRAANLTWNRP
<i>S. pombe</i>	617	CVAFFWNAAKKQHSKSSVHAELR--ELPECTANLIENSHADDVFSPNMVERLWVLAKCTR
<i>C. albicans</i>	574	FTNRRINANIVDGNHVNYIEFYQRNINYYAIVFN-----WRLLEFIHELNVTYL
<i>N. crassa</i>	804	TAFNLVLDLTDGMNIVVEDPAVRSPMDAAAWYSSSILQRVLLTSLARAQDG--ITDATQE
<i>A. fumigatus</i>	658	TQEGTDDEALLDVVEEDPAIQSSLDALAAWSSHLLQGALLRYFEASSGCPDAKKSRLV
<i>S. pombe</i>	675	DSAQMSDS---IISLSQVVLVLSPLEVLASWYAADLLDALMESLS-----RKYV
<i>C. albicans</i>	625	EQLNDDQSQVLTDLKIIIEAFFGEQDNKLFQYY--QIFTSILNANYAP-----YLFES
<i>N. crassa</i>	862	IIDEIATAAKTAPIGSNAYLRALVARAVLVSEKRGGSIAAALKAS-----
<i>A. fumigatus</i>	718	FKSKIKLADLVAPQPSAAHTRALVMMAVFFERDRVANIGSVLAALPKEKGNKQNASNF
<i>S. pombe</i>	721	ETSEIEEITSLCPKNSSITRHALLAKLVLFENTADSLNEVLAAYKN-----
<i>C. albicans</i>	675	LKDKVSESLKFKRIAYEGTDLTDHEIHNTSSEDEYEQESPVVYKYEP-----
<i>N. crassa</i>	907	-DPSLNPDKHPEYGRGVPLIDSPMAQIVPDHDALMALQYAMR-----
<i>A. fumigatus</i>	778	LDSSLPTSVREEIISTAVRCAMIAAIFNARATGDTSLPATETVEKAIHWFNRLPLDPVELT
<i>S. pombe</i>	768	-----TDLCSQDKRKQSSVLKINLSKLFTHSCLSLALQRIG-----
<i>C. albicans</i>	722	-----TLKSQKSLISSLNLVNEEFILTLCSLTIYKYK-----
<i>N. crassa</i>	949	---IAHLQKFPDPPKQAIAFLNSILPGGTDQPKHEGMSLLAFTAAYCLMELLERHTVCRE
<i>A. fumigatus</i>	838	LLEFAAVYHLLHILASDIDYLASSDSSAPPSPMSKASDMLSSSDDGDGASQRNNNIIP
<i>S. pombe</i>	806	-----YGDVSKRMYQETFPVDSADITPLSFIISWTALNTFAPICTSPKEND---
<i>C. albicans</i>	756	-----KEYDRAIKLLNYLRRLDNDSKTLSLITFTSLTILINELIPCKIEDN---
<i>N. crassa</i>	1006	QCSGALERTAGAIRRWVGSPOG-EQVGLDCKMRQRMTRCSTSIKSVIGMENDPGYGSM
<i>A. fumigatus</i>	898	HPMPNLGRVASELIYWARNAYNPAFYGFTSNLVKVIETECTSLCQTAGVHVADYSCVQEE
<i>S. pombe</i>	853	-----VVEKMAMYVRTAIG-TLKIQDLKLSRKLINSCIDIGS---RQEDLGYVSSA
<i>C. albicans</i>	801	---VNLDLAIRICRDWLENPDLTQYMDEDIKLELKKIIVTKGMIVNGIDVNESDEE----
<i>N. crassa</i>	1065	DCEENEEGGC-----
<i>A. fumigatus</i>	958	KSKAKQAIDSKRRFAGGNEEASDNLLLSDES
<i>S. pombe</i>	901	-----
<i>C. albicans</i>		-----

Figura 9- Continuação

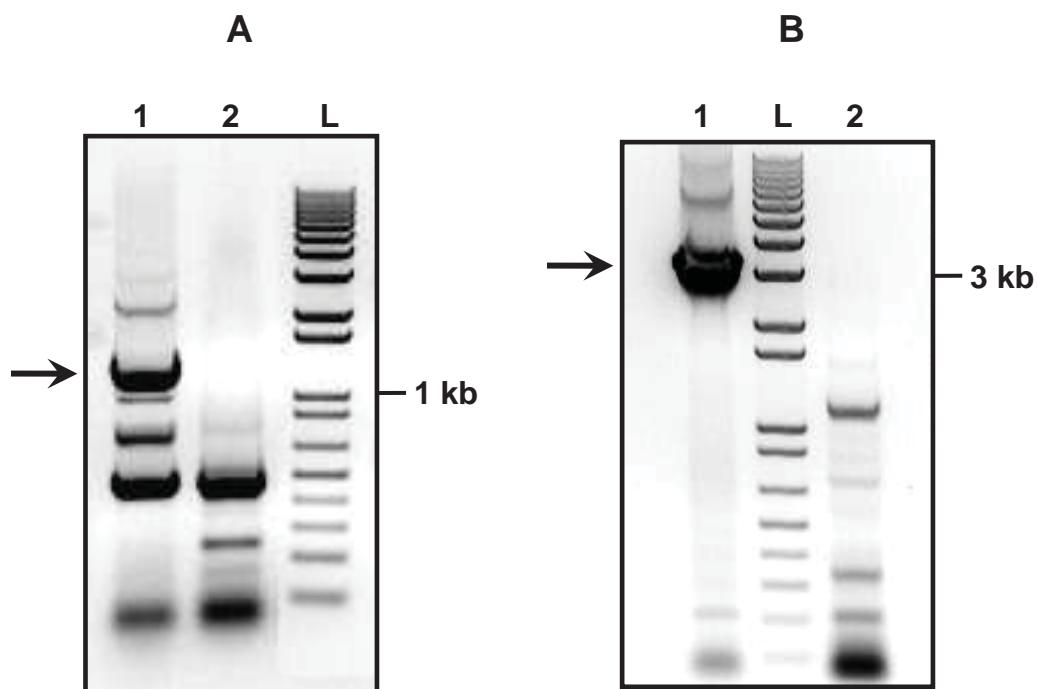


Figura 10- Amplificação de fragmentos correspondentes as ORFs a partir do DNA genômico das linhagens mutantes e selvagem. (A) Amplificação do fragmento correspondente à ORF NCU01629 contendo 1263 pb 1- linhagem selvagem. 2- linhagem mutante (B) Amplificação do fragmento correspondente ao gene *sre1* contendo 3225 pb 1- linhagem selvagem. 2- linhagem mutante.

Um aspecto importante a ser investigado é se a ausência dos fatores de transcrição pode afetar o crescimento das linhagens mutantes. Para isso, as linhagens nocauteadas foram analisadas quanto ao crescimento e comparadas com a linhagem selvagem. A taxa de crescimento linear das linhagens mutantes foi avaliada em *race tubes*. Neste ensaio, conídios das linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem foram inoculados em uma das extremidades do tubo e a frente do crescimento foi marcada até que as linhagens atingissem a outra extremidade do tubo. A figura 11 mostra as taxas de crescimento das linhagens. Os resultados mostraram que somente a linhagem *flbC*^{KO} apresentou um retardo no crescimento não atingindo a outra extremidade do tubo em 120 horas. As outras duas linhagens mutantes na proteína *sre1*^{KO} e na ORF NCU01629 apresentaram padrões de crescimento similares ao da linhagem selvagem.

A análise do crescimento das linhagens mutantes, juntamente com a linhagem selvagem, também foi avaliada em Erlenmeyers contendo meio de cultura sólido. Esse experimento foi realizado no intuito de observar as características morfológicas visíveis das hifas, tais como aspecto da cultura, coloração e crescimento. Os resultados mostraram que as linhagens mutantes na ORF NCU01629 e *sre1*^{KO} cresceram semelhantemente à linhagem selvagem, no entanto, o crescimento da linhagem *sre1*^{KO} foi um pouco inferior e a linhagem *flbC*^{KO} apresentou um menor crescimento perante as demais (figura 12). Foi possível notar após uma semana de crescimento, como mostrado na linhagem *flbC*^{KO}, que essa mesma linhagem apresentou aspecto e coloração diferente das outras e, curiosamente revelou a presença de pigmentos de melanina depositados na região inferior da cultura. Não se sabe se a ausência da proteína resultou diretamente na produção da pigmentação ou se a mesma está envolvida na regulação de outras proteínas que levam ao acúmulo de melanina nos fungos.

Outra análise realizada foi o crescimento radial e a observação das hifas aéreas. O crescimento radial foi realizado a partir dos conídios das linhagens mutantes e da linhagem selvagem em placa contendo meio VM sólido. Como podemos observar na figura 13A, os halos de crescimento das linhagens mutantes foram inferiores à linhagem selvagem. A linhagem *flbC*^{KO} revelou menor crescimento, como também descrito nos resultados anteriores. As outras duas linhagens mutantes (NCU01629 e *sre1*^{KO}) mostraram um padrão de crescimento um pouco inferior ao apresentado pela linhagem selvagem. A linhagem *flbC*^{KO} também foi inoculada em meio de cultura VM sólido enriquecido com extrato de levedo para analisar o aspecto diferenciado das hifas observadas no experimento anterior. Neste experimento foi possível observar que as hifas da linhagem cresceram predominantemente na extremidade da placa, apresentando redução de hifas aéreas e um aspecto “cotonoso”, diferente do perfil observado na linhagem selvagem (figura 13B).

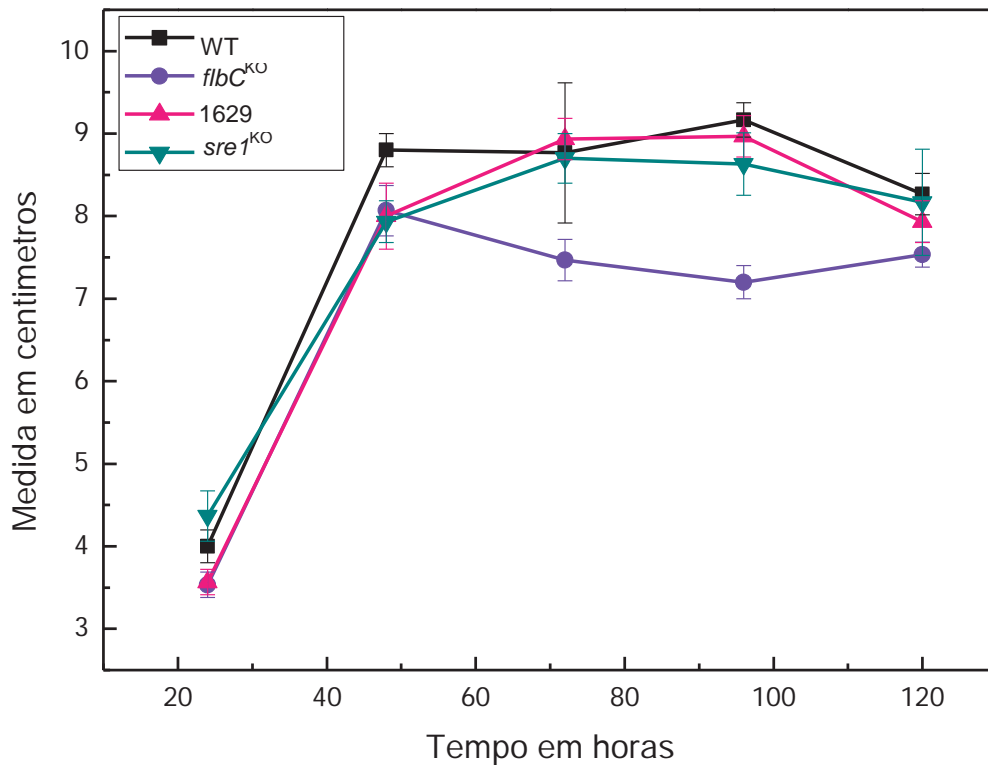


Figura 11- Análise do crescimento linear das linhagens selvagem e mutantes. O crescimento foi analisado em *race tubes*. Os conídios foram inoculados em uma das extremidades, o crescimento foi medido no escuro através da marcação da frente micelial a cada 24 horas até a outra extremidade do tubo.

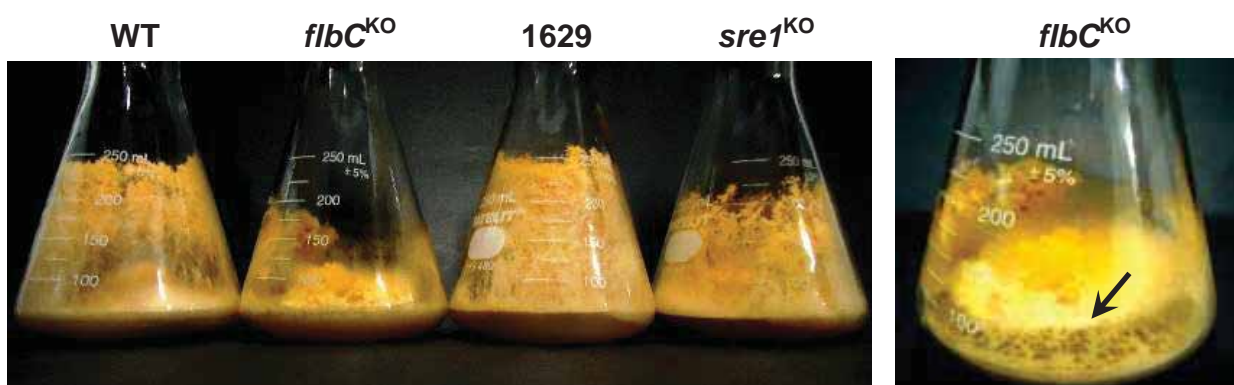


Figura 12- Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutantes em Erlenmeyers. Hifas foram inoculadas no centro do meio de cultura, as linhagens foram mantidas inicialmente a uma temperatura de 30°C por 72 horas e posteriormente à temperatura ambiente na presença de luz. A seta aponta a presença de melanização da linhagem *flbC*^{KO}.

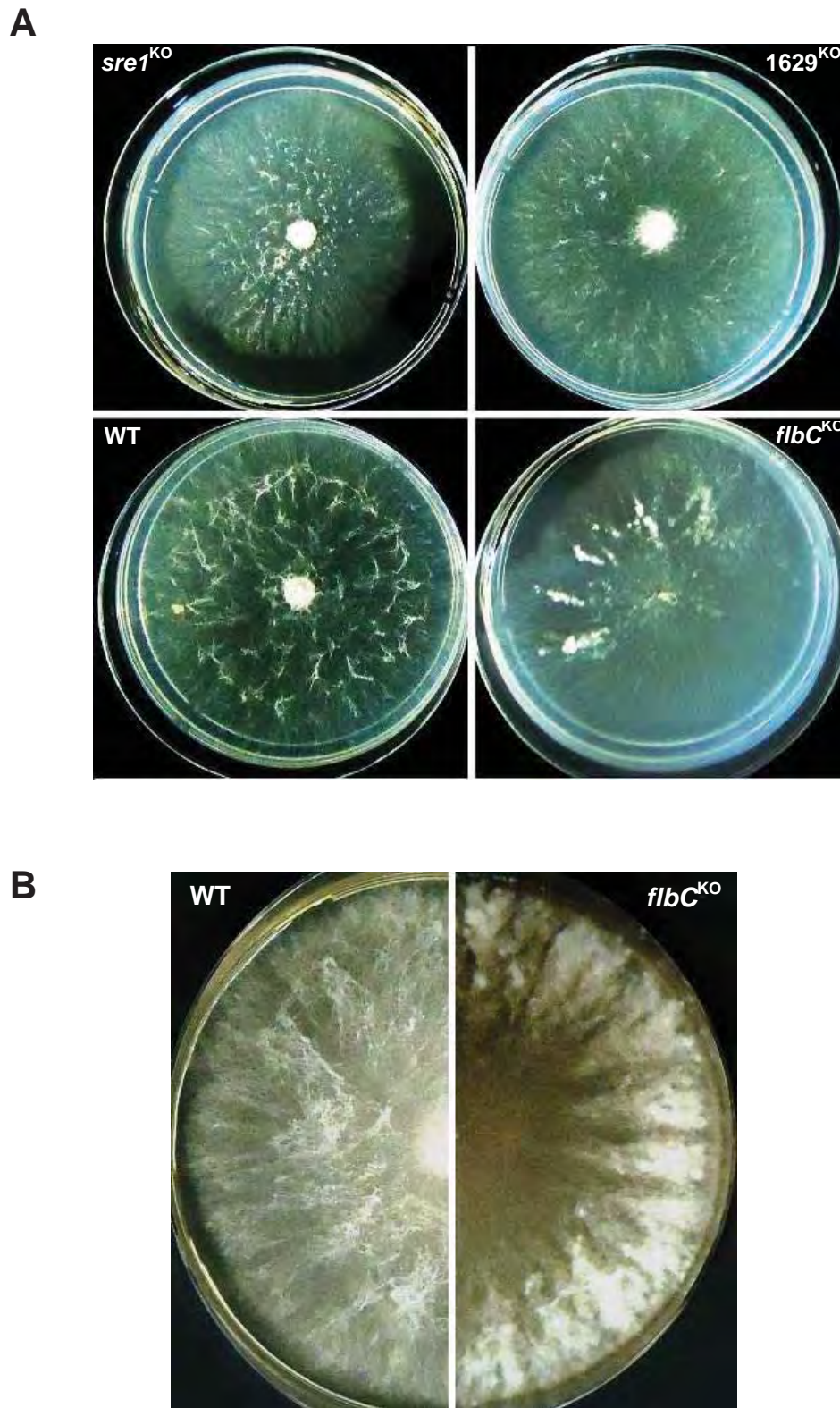


Figura 13- Análise morfológica das linhagens. (A) Crescimento radial das linhagens mutantes e selvagem em meio VM. **(B)** Crescimento radial comparativo da linhagem *flbC*^{KO} e linhagem selvagem em meio enriquecido (VM+extrato de Levedo). Imagens obtidas após 16 h de crescimento.

5.2. Análises morfológicas

As extremidades das hifas aéreas resultantes do crescimento em placa foram analisadas em lupa e as imagens capturadas. Em relação à morfologia das extremidades apicais das hifas (figura 14), a observação em lupa permitiu observar que as linhagens mutantes na ORF NCU01629 e na proteína SRE1 apresentam uma morfologia semelhante à apresentada pela linhagem selvagem. Foi possível notar que a linhagem *flbC*^{KO} apresentou diferenças mais acentuadas dentre todas as linhagens. O perfil das hifas nessa linhagem mutante é claramente distinto, na qual aglomerados de hifas irregulares foram formados nas partes mais internas da cultura, e, nas extremidades, ramificações foram apresentadas.

Através dos resultados de crescimento e morfologia apresentados, foi possível observar que a ausência das proteínas SRE1 e do produto da ORF NCU01629 não resultou em alteração visível na morfologia e no crescimento do fungo. Em contrapartida, os resultados da análise morfológica com a linhagem *flbC*^{KO} mostraram que a proteína tem influência no crescimento e morfologia do fungo *N. crassa*, assim como descrito para outros fungos filamentosos.

Os resultados descritos para linhagens mutantes de outros fungos filamentosos nas proteínas homólogas FLE1 (Coppin, 2002) e FlbC (KWON et al., 2010) mostraram que ambas proteínas também afetam o crescimento e a morfologia. A ausência de FLE1 em *P. anserina* afeta o crescimento e a morfologia micelial, sendo que a linhagem mutante apresenta baixa densidade de hifas aéreas. Um fenótipo comum observado nas linhagens mutantes FlbC de *A. nidulans* é o aspecto da cultura além da inibição do crescimento. Essas linhagens foram denominadas como *fluffy* devido ao aspecto cotonoso diferenciado observado pela massa de hifas. Estudos genéticos e bioquímicos das linhagens *fluffy* levaram à identificação de seis genes FlbA, FlbB, FlbC, FlbD, FlbE e FluG, todos envolvidos na ativação normal do desenvolvimento em *A. nidulans* (ADAMS et al., 1992).

Na figura 13B foi possível observar que a linhagem mutante de *N. crassa* apresentou hifas com o mesmo aspecto descrito nas mutantes *fluffy* e, a análise das extremidades apicais das hifas (figura 14), mostrou a presença de alterações e aglomerados irregulares de hifas, semelhante ao descrito em mutantes FLE1 de *P. anserina*. Nas linhagens mutantes FLE1 de *P. anserina* e FlbC de *A. nidulans* também foram descritas alterações no desenvolvimento sexual após cruzamento. Linhagens mutantes FLE1 mostraram um aumento na produção de protoperitécio (gameta feminino) durante o crescimento sexual, e a ausência de FlbC causa aumento na formação de corpos de frutificação. A análise do crescimento sexual ainda não foi realizada com o fungo *N. crassa* para comparação.

Outro fato que chama a atenção é que, assim como observado na linhagem *flbC*^{KO} de *N. crassa*, o crescimento da linhagem mutante FLE1 de *P. anserina* também mostrou a formação de pigmentos de melanina no crescimento em condições normais (COPPIN, 2002). A

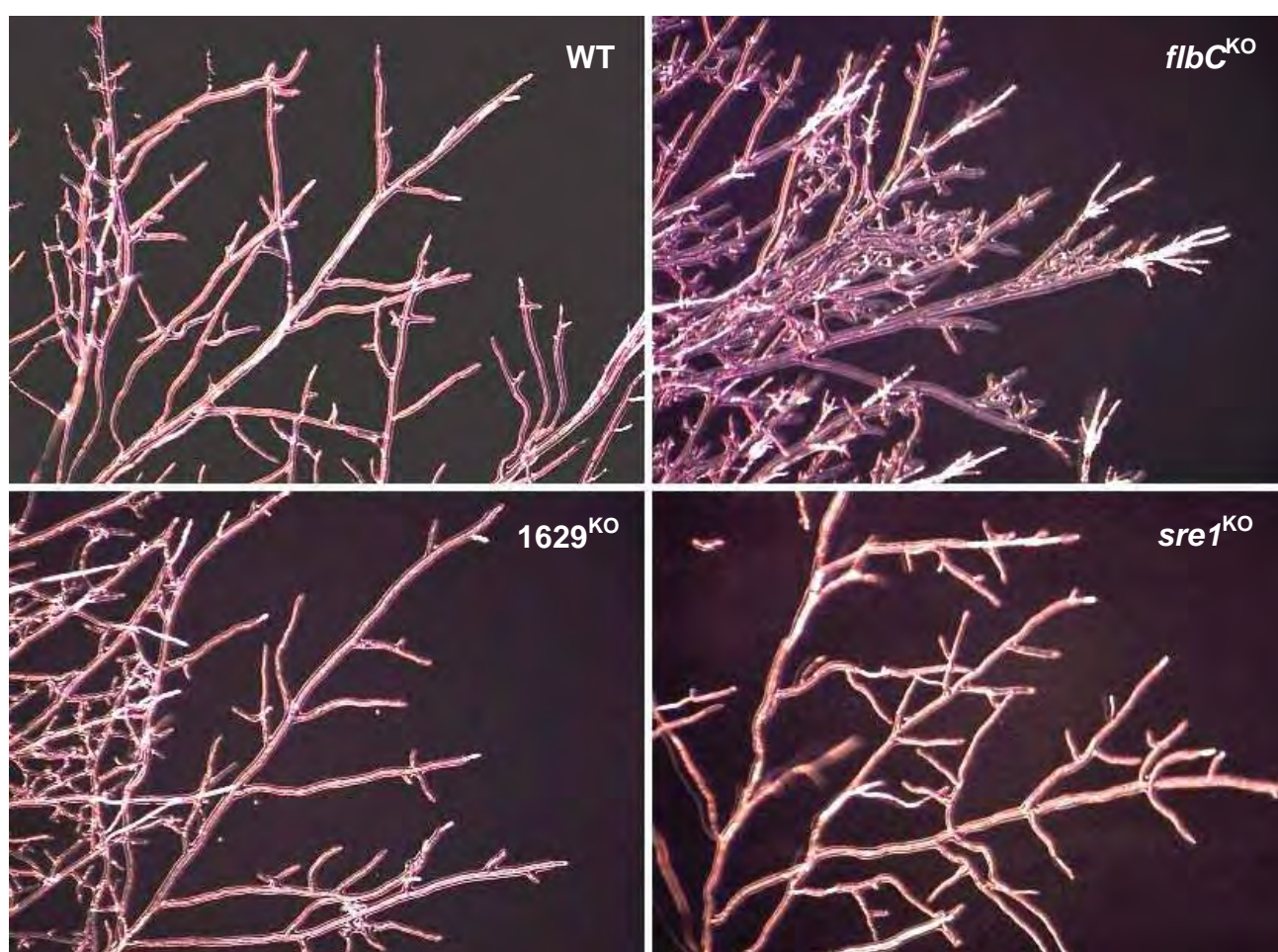


Figura 14- Análise do aspecto da extremidade apical das hifas. As extremidades das hifas das linhagens mutantes e selvagem foram observadas em estereomicroscópio trinocular Zeiss, modelo Discovery V8 e fotografadas em aumento de 80 X.

figura 12 mostra o aparecimento de melanização na linhagem *flbC^{KO}* de *N. crassa*, o qual ocorreu ao redor do quinto dia de crescimento vegetativo após exposição à luz. A presença de pigmentos, como a melanina pode, em maior ou menor extensão, aumentar sob radiação solar ou diversos fatores ambientais geradores de estresse, tanto em leveduras, como em conídios de diversas espécies de fungos filamentosos (BRAGA et al, 2006). A importância evolutiva desse grupo de pigmentos é evidenciada pelo fato de os mesmos serem produzidos por organismos de praticamente todos os grupos taxonômicos, desde procariotos até vertebrados superiores (PLONKA; GRABACKA, 2006). Melaninas são pigmentos hidrofóbicos, de alto peso molecular, negativamente carregados, e formados pela polimerização de compostos fenólicos e/ou indólicos. No caso de fungos fitopatogênicos, a melanina pode desempenhar um papel importante na proteção contra os radicais livres de oxigênio, gerados pela planta, como resposta à infecção pelo fungo (HENSON; BUTLER; DAY, 1999). Um estudo com *Cladosporium carrionii* indicou que a melanina, que pode ser granular ou fibrilar, se forma em vacúolos citoplasmáticos e então é excretada para a parede. Em microrganismos patogênicos, como *C. neoformans*, a melanização é correlacionada ao aumento da virulência e também foi relacionada à proteção de fungos parasitas contra ROS e RNS (espécies reativas de nitrogênio e oxigênio) (PLONKA; GRABACKA, 2006).

5.3. Análise de crescimento em condições de baixas tensões de oxigênio

Como descrito anteriormente, o fator de transcrição Sre1 de *S. pombe*, além de participar na regulação dos níveis de esterol celular, também está envolvido na resposta transcricional à hipóxia e é necessário para o crescimento do microrganismo em condições de baixos níveis de oxigênio (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005). Em função disto, um aspecto interessante a ser investigado é se a proteína de *N. crassa* também é requerida para o crescimento sob condições de hipóxia.

Hughes, Todd e Espenshade (2005) analisaram o crescimento da linhagem mutante Sre1 de *S. pombe* em condições normais e sob condições anaeróbicas em placa e mostraram que ocorre falha no crescimento da levedura na ausência de oxigênio. Estudos preliminares foram realizados com a linhagem *sre1^{KO}* de *N. crassa* usando uma câmara de anaerobiose. Para isto, conídios da linhagem mutante e selvagem foram inoculados em placas contendo meio de cultura acrescentado de sorbose, para indução de crescimento colonial, em uma escala de diluição de 10⁸ a 10 conídios/mL. As placas foram submetidas às mesmas condições de crescimento sendo que uma delas (contendo as suspensões conidiais de ambas as linhagens) foi mantida em condições normais de crescimento a 30 °C e a outra em condições de anaerobiose (30 °C). Os resultados mostraram que ambas as linhagens cresceram

praticamente da mesma forma, tanto em condições normais como na ausência do oxigênio (figura 15).

Os resultados preliminares apresentados indicam que a proteína SRE1 de *N. crassa* pode não estar envolvida em mecanismos regulatórios envolvendo a adaptação à hipóxia. Porém, deve-se levar em consideração que o método utilizado não garante que o crescimento foi realizado em condições de ausência total de oxigênio. Além disso, é importante salientar que em mamíferos não foi descrito que a proteína SREBP é requerida para esse tipo de adaptação.

Segundo Dunlap et al (2007), o fato de *N. crassa* ser um organismo multicelular sugere que pode ser um organismo mais adequado para a compreensão dos aspectos de regulação celular dos eucariotos superiores do que as leveduras. Em mamíferos, a proteína SREBP é essencial na regulação da síntese de esteróides da célula e a proteína de *N. crassa* foi inicialmente selecionada por apresentar alterações que indicam envolvimento da mesma em mecanismos de regulação do metabolismo de glicogênio. Os processos metabólicos envolvendo ambas as moléculas (glicogênio e esteróide) são ordenados por um conjunto de reações químicas que ocorrem na célula. A análise de acúmulo de esterol da linhagem mutante de *N. crassa* não foi ainda realizada e a mesma será importante para verificar se este fator de

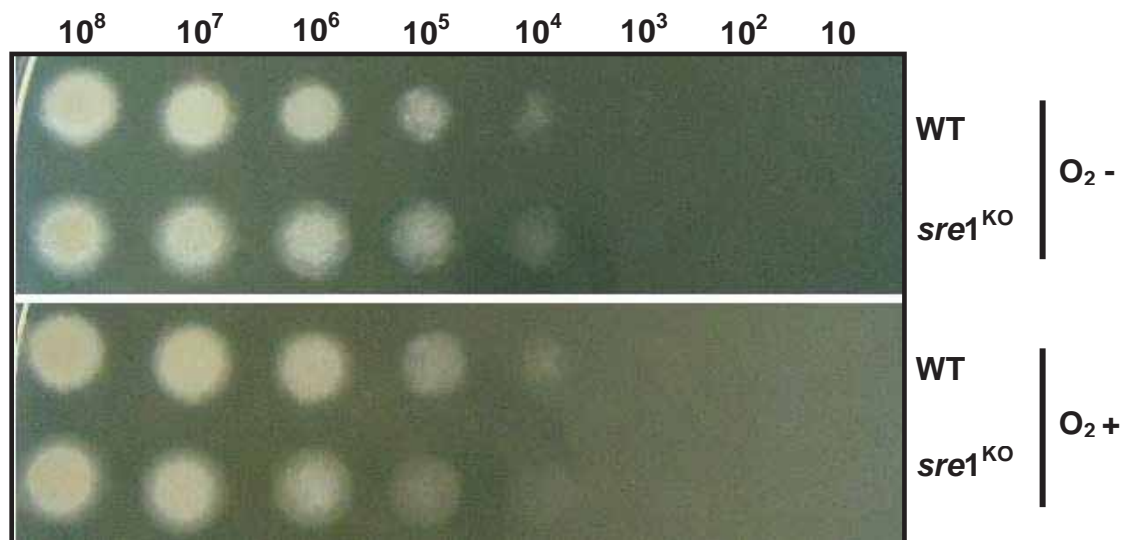


Figura 15- Análise do crescimento sob condições de hipóxia. As linhagens selvagem e *sre1*^{KO} foram analisadas quanto ao crescimento em condições normais e na ausência de oxigênio. Os meios de cultura utilizados foram acrescidos de sorbose para indução de crescimento colonial. Cerca de 200 µL de suspensões de conídios variando de 10⁸ a 10 células/mL foram aplicados na superfície do meio de cultura.

transcrição em *N. crassa*, também participa da regulação da síntese de esteróides. Com relação a sua participação na regulação do metabolismo de glicogênio, foi demonstrado que a expressão do gene *gsn* está alterada na linhagem mutante, assim como acúmulo de glicogênio, e que proteínas presentes no extrato celular bruto da linhagem selvagem do fungo foram capazes de se ligar ao promotor *gsn* (resultados apresentados neste trabalho).

5.4. Análise da capacidade de conidiação e germinação

Conforme foi observado nos ensaios de crescimento e observação da morfologia das linhagens mutantes selecionadas, a linhagem *flbC^{KO}* mostrou alterações durante o crescimento do fungo. Além de alterações fenotípicas da linhagem mutante, como redução de hifas aéreas e pigmentação, as extremidades das hifas apresentaram forma irregular quando comparadas à linhagem selvagem.

Em *A. nidulans* foi descrito por Kwon et al (2010) que a deleção de FlbC causou redução e/ou ausência da conidiação e retardamento na germinação dos conídios, além da alteração na morfologia. A linhagem mutante FLE1 de *P. anserina* apresentou alteração na diferenciação sexual masculina resultante da diminuição na produção microconidial (gameta masculino neste fungo) (COPPIN, 2002). Análises de microscopia foram realizadas com a linhagem mutante na proteína FLBC de *N. crassa* durante o desenvolvimento. Para este experimento, discos de tamanhos iguais contendo uma massa micelial foram depositados na superfície de meios de cultura sólido, e os conídios foram coletados durante o crescimento do primeiro ao sétimo dia. A figura 16 mostra a formação dos discos miceliais em placa e o micélio resultante do crescimento em meio sólido. O objetivo foi analisar a capacidade de conidiação da linhagem mutante comparada à selvagem. Os resultados mostraram que a linhagem mutante apresentou ausência quase que total de conídios em todas as coletas, apenas sendo possível observar a presença de poucos microconídios (figura 17) e raríssimos macroconídios. Também foi visto que a quantidade de conídios se manteve praticamente a mesma durante os sete dias de crescimento para ambas as linhagens (dados não mostrados). A partir dos resultados apresentados pode-se afirmar que a proteína FLBC de *N. crassa*, assim como as proteínas homólogas, é essencial para o processo de conidiação do fungo.

Os discos miceliais utilizados no ensaio acima mencionado foram analisados em microscópio e os resultados estão apresentados na figura 18. Foi observado que as hifas da linhagem selvagem apresentaram septos mais espaçados que a linhagem *flbC^{KO}* como mostrado na primeira coluna da figura 18. Além disso, através da observação das hifas, foi possível registrar o momento da geração dos conídios em ambas as linhagens. A segunda coluna da figura 18 mostra a formação dos macroconídios na linhagem selvagem e os microconídios gerados pela linhagem mutante. Na linhagem selvagem de *N. crassa* a

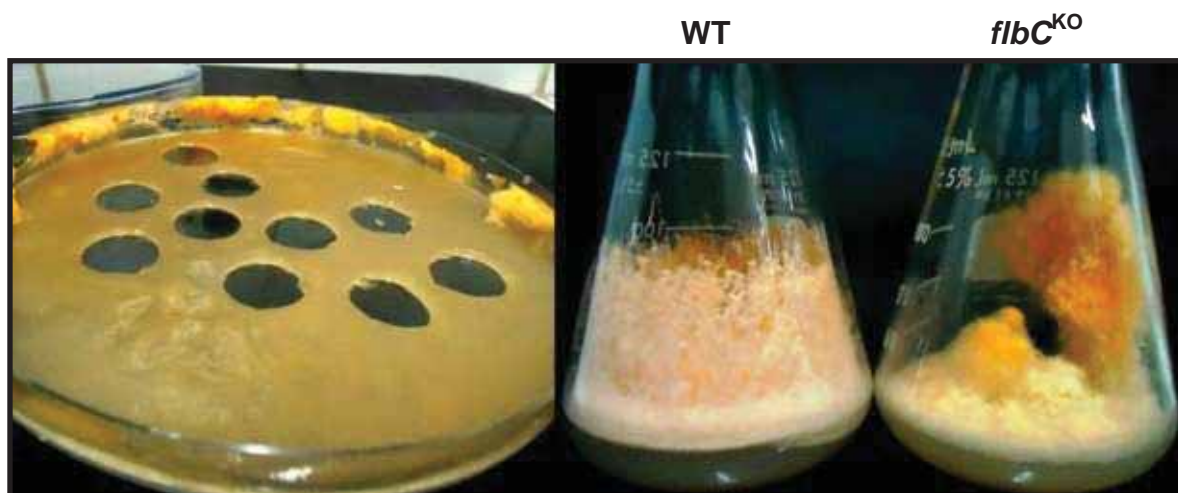


Figura 16- Obtenção do tapete micelial e o micélio obtido após crescimento. Quantidades equivalentes da massa micelial das linhagens selvagem e $flbC^{KO}$ foram inoculadas em meio de cultura VM sólido.



Figura 17- Observação dos conídios das linhagens selvagem e $flbC^{KO}$. Conídios das linhagens foram coletados em água estéril após crescimento e analisados em microscópio (aumento 40 X). As setas apontam os macroconídios e os microconídios.

macroconidiação é controlada pelo ciclo circadiano e ocorre a partir das extremidades das hifas e a microconidiação é menos freqüente e ocorre a partir da parede das hifas (PERKINS; TURNER; BARRY, 1976). As hifas da linhagem mutante de *N. crassa* apresentam formato ondulado quando comparadas com a linhagem selvagem (figura 18, terceira coluna), semelhante ao descrito para o mutante FLE1 de *P. anserina*. A denominação da proteína FLE1 originou do termo *flexuosa* devido a este aspecto diferencial das hifas (COPPIN, 2002). O aumento na septação das hifas não foi descrito para a linhagem mutante do fungo *P. anserina*.

Para analisar a germinação dos conídios na linhagem *flbC*^{KO} e compará-la com a linhagem selvagem, conídios de ambas as linhagens foram inoculados em meio de cultura líquido e amostras foram coletadas após 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 horas e observadas em microscópio. Como é possível observar na figura 19A, a germinação dos conídios na linhagem selvagem foi registrada a partir de macroconídios e mostrou características facilmente distinguíveis ao longo do processo até a formação completa das hifas que ocorreu por volta de 8 horas. A germinação dos conídios na linhagem mutante não foi facilmente observada como na linhagem selvagem, pois além da pequena quantidade de microconídios, a formação e extensão das hifas foram observadas em menor tamanho resultando em hifas de menor espessura. A figura 19B mostra o aspecto da cultura de ambas as linhagens após 8 horas. Apesar das diferenças claramente observadas entre as linhagens, a germinação dos microconídios da linhagem mutante não mostrou retardo em relação à linhagem selvagem como relatado para a germinação dos conídios da linhagem mutante na proteína homóloga FlbC de *A. nidulans* (Kwon et al., 2010). Entretanto, embora raros, os macroconídios da linhagem mutante mostraram retardo na germinação quando comparados aos da linhagem selvagem (resultado não mostrado).

Os resultados relacionados à morfologia, crescimento e desenvolvimento com a linhagem *flbC*^{KO} indicaram o envolvimento da proteína nestes processos. Resultados obtidos no laboratório utilizando a análise por citometria de fluxo mostraram que esta linhagem mutante apresentou alterações na progressão do ciclo celular com alto conteúdo de células entre as fases G1 e G2, mostrando problemas associados à transição G2→M (GONÇALVES et al., 2011).

6. Análise da expressão do gene *flbC*

Os resultados apresentados anteriormente neste trabalho mostraram que a proteína FLBC de *N. crassa* está diretamente envolvida no crescimento e no desenvolvimento do fungo. Em função disto foi realizada a análise da expressão do gene *flbc* por *Northern blot* em micélios da linhagem selvagem coletados em diferentes tempos de germinação dos conídios. Os resultados mostraram (figura 20) que o gene foi altamente expresso nas primeiras horas de

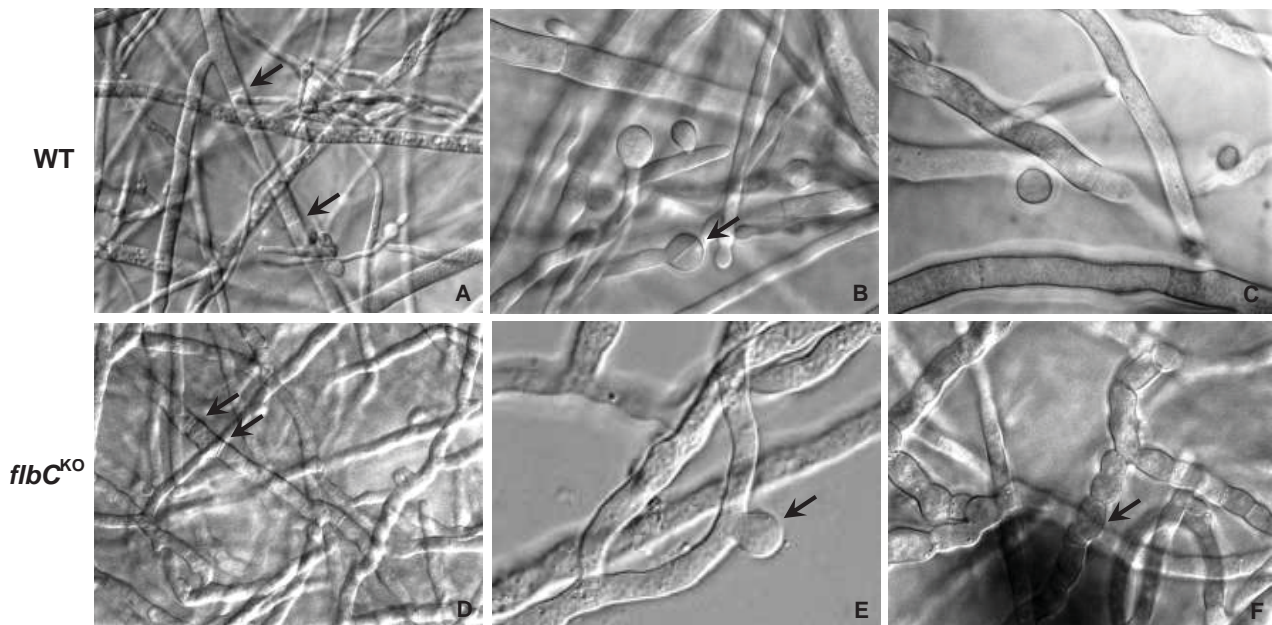


Figura 18- Observação microscópica das hifas e conídios. Os discos miceliais das linhagens selvagem e *flbC*^{KO} foram colocados entre lâmina e lamínula e analisados. As setas apontam os septos e morfologia das hifas e conidiação. Análise em microscópio Zeiss, modelo Axioimager A2 [aumento 40 X (A e D), 63 X (B, C e F), 100 X (E)].

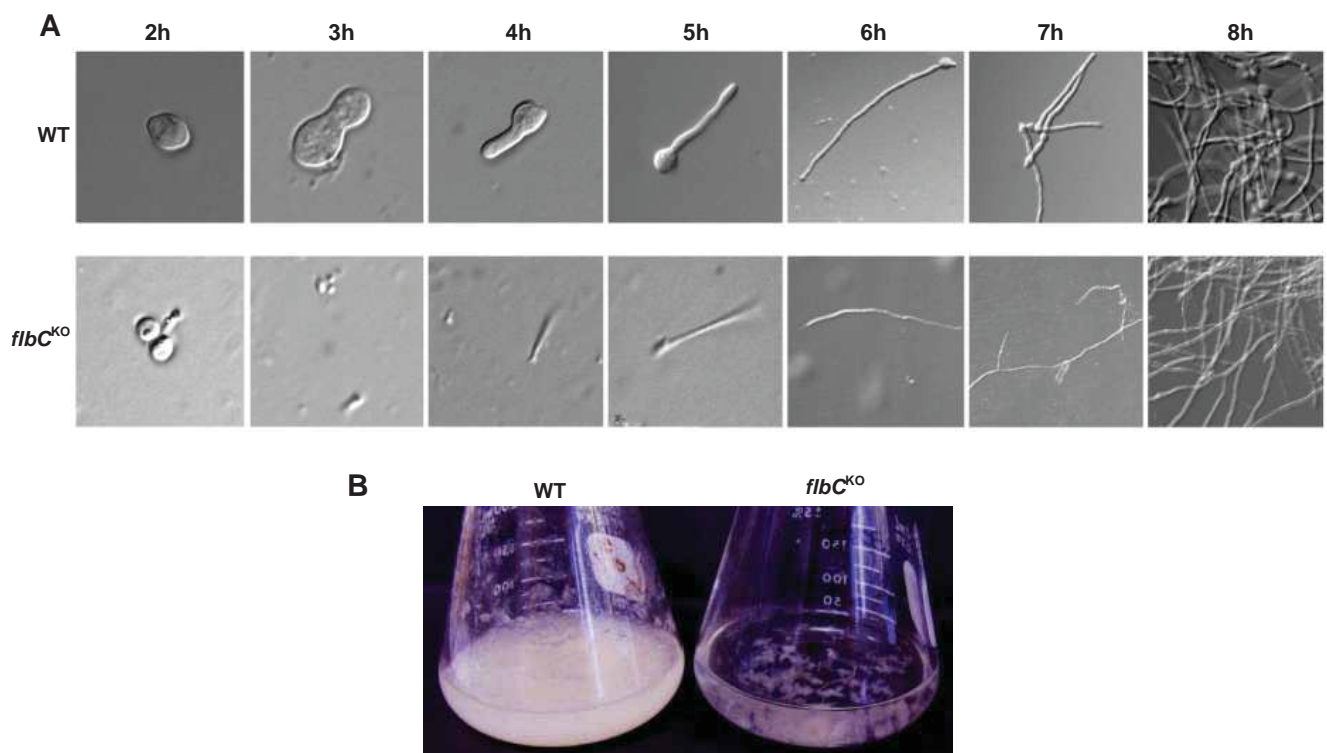


Figura 19- Observação da germinação dos conídios das linhagens selvagem e *flbC*^{KO}. Conídios das linhagens foram inoculados em meio VM líquido. **(A)** Amostras foram coletadas nos tempos de 2 a 8 horas e observadas em microscópio [aumento 63 X (WT) e 100 X (*flbC*^{KO})]. **(B)** Aspecto das culturas após 8 horas de germinação.

germinação, sendo máxima em 12 horas. Os níveis do transcrito foram altamente reduzidos após este tempo (tempo de formação da massa micelial) mostrando que a proteína provavelmente é requerida para o estágio inicial da germinação. Estes resultados são semelhantes aos descritos para esta proteína em *A. nidulans*, os quais mostraram que a expressão do gene *flbC* foi detectável em 6 horas de crescimento vegetativo com máxima expressão entre 12 e 18 horas (KWON et al., 2010).

7. Clonagem das ORFs e subclonagem em vetores de expressão

Para a análise funcional dos fatores de transcrição, é importante a produção das proteínas na forma recombinante. Para isto, os cDNAs codificadores das proteínas foram clonados. Inicialmente tentou-se realizar o isolamento do cDNA correspondente à proteína SRE1 através do rastreamento de uma biblioteca plasmidial de cDNA de *N. crassa* (λ AD5-NC), construída em fago λ , conforme descrito na metodologia. Nenhum clone bacteriano foi identificado utilizando este procedimento e a amplificação dos cDNAs foi realizada por RT-PCR. De uma forma resumida, este produto se baseia na reação de síntese de cDNA utilizando

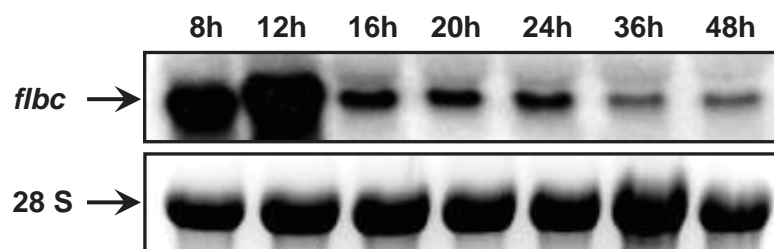


Figura 20- Expressão do gene *flbC* durante o crescimento vegetativo na linhagem selvagem. Amostras de micélio foram coletadas nos tempos de 8 a 48 horas de crescimento, o RNA foi extraído e analisado por *Northern blot* utilizando um fragmento do gene *flbC* como sonda. Autorradiografia do gel (painel superior) e perfil do RNAr 28 S em gel de agarose (painel inferior).

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 e estão apresentados na Tabela 3 de Materiais e Métodos.

Como descrito anteriormente, a ORF referente à proteína FLBC havia sido amplificada por PCR no laboratório por uma aluna de Doutorado e se encontrava clonada no vetor pMOS-Blue. O produto da amplificação da ORF NCU01629 (1.263 pb) (figura 21A) foi confirmado por análise de restrição com a enzima *SacII* que corta o cDNA em apenas um sítio liberando dois fragmentos: 466 pb e 794 pb (resultados não mostrados). O cDNA inteiro correspondente ao gene *sre1* (3.225 pb) foi amplificado (figura 21B) e confirmado por análise de restrição com a enzima *Accl* que cliva a ORF em dois sítios e gera 3 fragmentos de tamanhos diferentes (860 pb, 1566 pb e 799 pb) (resultados não mostrados). Um fragmento menor (648 pb) para a produção da proteína SRE1 truncada foi também amplificado de maneira que o fragmento amplificado conservasse a região do domínio de ligação ao DNA, gerando um fragmento com 648 pb. A amplificação por PCR é mostrada na figura 21C e o produto amplificado foi confirmado por análise de restrição.

Os fragmentos amplificados foram clonados no vetor de clonagem pMOS-Blue gerando as construções plasmidiais: pMOS-1629, pMOS-*flbC* e pMOS- Δ *sre1*, as quais foram confirmados por análises de restrição. A construção contendo a ORF inteira da proteína SRE1 não foi possível de ser obtida. Os cassetes de DNA correspondentes aos insertos Δ *sre1* (648 pb), 1629 (1.263 pb) e *flbC* (1.101 pb) foram transferidos das construções em vetor pMOS para o vetor de expressão pET28a. O fragmento correspondente ao gene *flbC* também foi transferido para o vetor de expressão pGEX-4T1. O inserto correspondente ao gene *flbC* foi transferido para o vetor pET28a através da digestão com as enzimas *NdeI* e *BamHI* em duas etapas descritas na metodologia, e com a enzima *BamHI* na transferência do fragmento para o vetor pGEX-4T1. O inserto correspondente à ORF NCU01629 (1.263 pb) foi transferido para o vetor de expressão pET28a por digestão com as enzimas *NheI* e *EcoRI* e o inserto correspondente ao gene Δ *sre1* (648 pb) foi transferido para o vetor pET28a, através da digestão com as enzimas *NdeI* e *EcoRI*. Os produtos purificados após as digestões com enzimas de restrição são mostrados, cada qual com o vetor de expressão usado para a subclonagem, na figura 22.

Após transformação em *E. coli* DH10B, os plasmídeos recombinantes foram submetidos a análises de restrição para a confirmação da presença e da orientação dos insertos no vetor de expressão. A figura 23 mostra algumas análises com enzimas de restrição (legenda), onde os produtos das reações de digestão foram analisados através de eletroforese em gel de agarose. As construções plasmidiais resultantes foram as seguintes: pET-*flbC*, pET-1629,

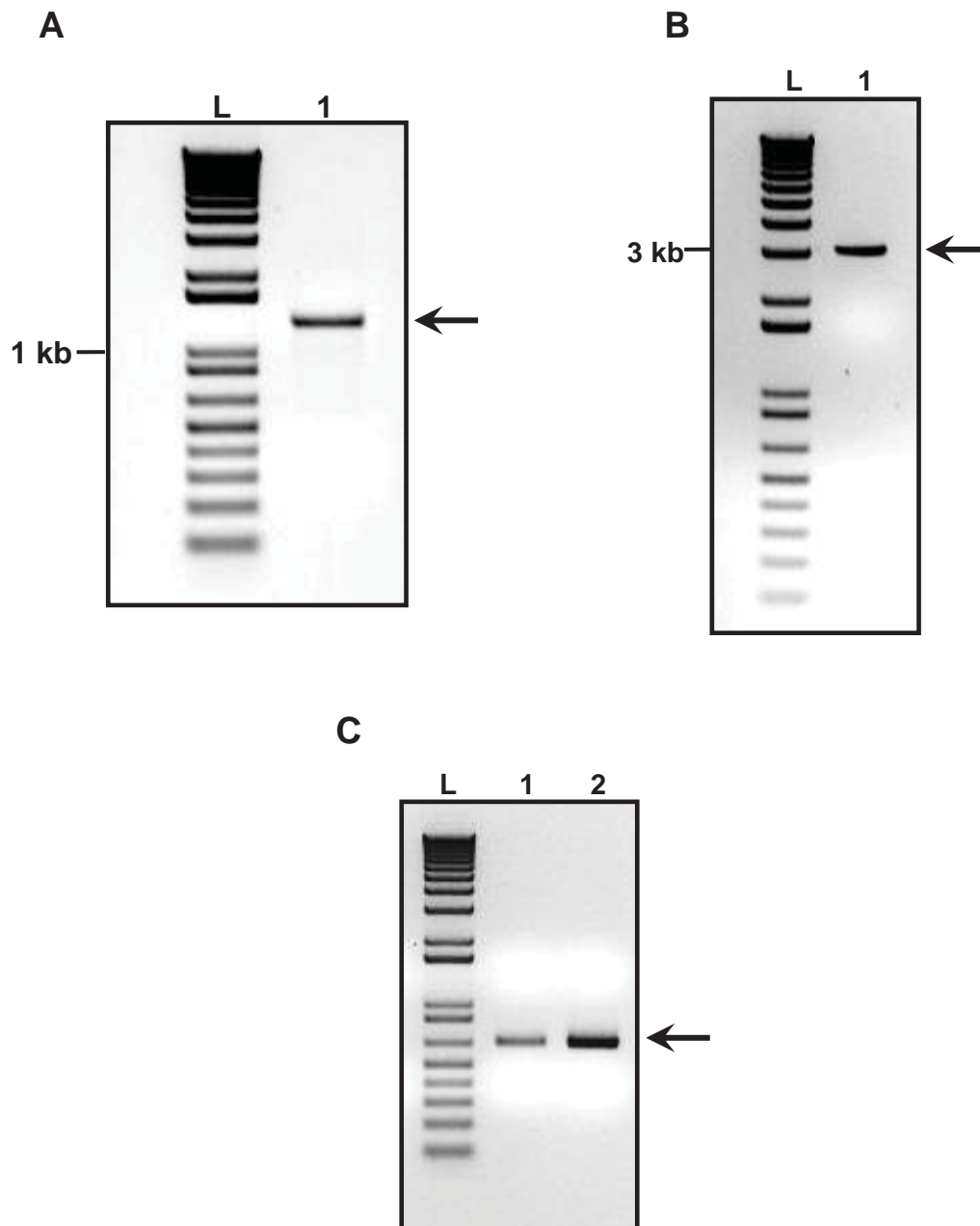


Figura 21 - Produtos purificados a partir da amplificação por PCR dos cDNAs correspondente às ORFs. (A) NCU01629 contendo 1.263 pb. **(B)** *sre1* inteira contendo 3.225 pb **(C)** Δ *sre1* contendo 648 pb. L, ladder de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo.

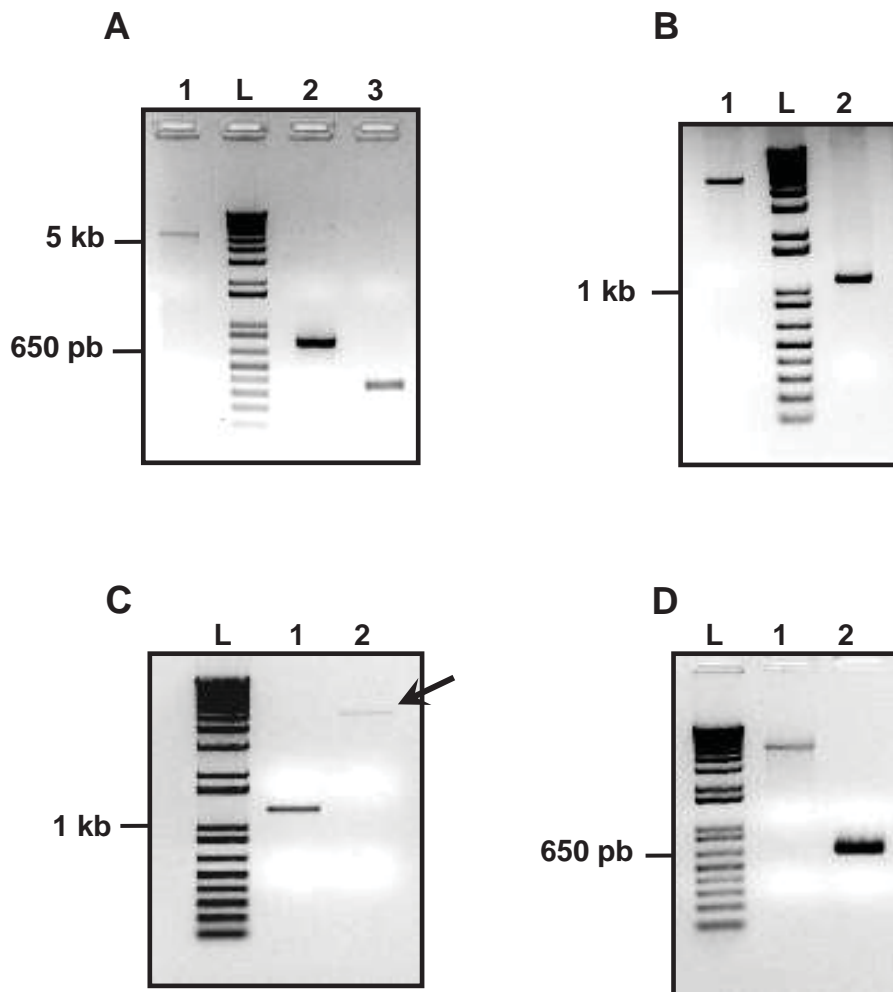


Figura 22 - Análise dos fragmentos purificados juntamente com o vetor de expressão utilizado na subclonagem. (A) 1- vetor pET 28a (5.369 pb); 2 e 3, fragmentos de 744 pb e 357 pb do gene *flbC* após digestão. **(B)** 1- vetor pGEX-4T1 (4.950 pb); 2- fragmento correspondente ao gene *flbC* inteiro com 1.101 pb. **(C)** 1- fragmento correspondente à ORF NCU01629 com 1.263 pb; 2- vetor pET 28a (5.369 pb) apontado pela seta. **(D)** 1- vetor pET 28a (5.369 pb); 2- fragmento correspondente ao gene Δ *sre1* com 648 pb. L, ladder de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo.

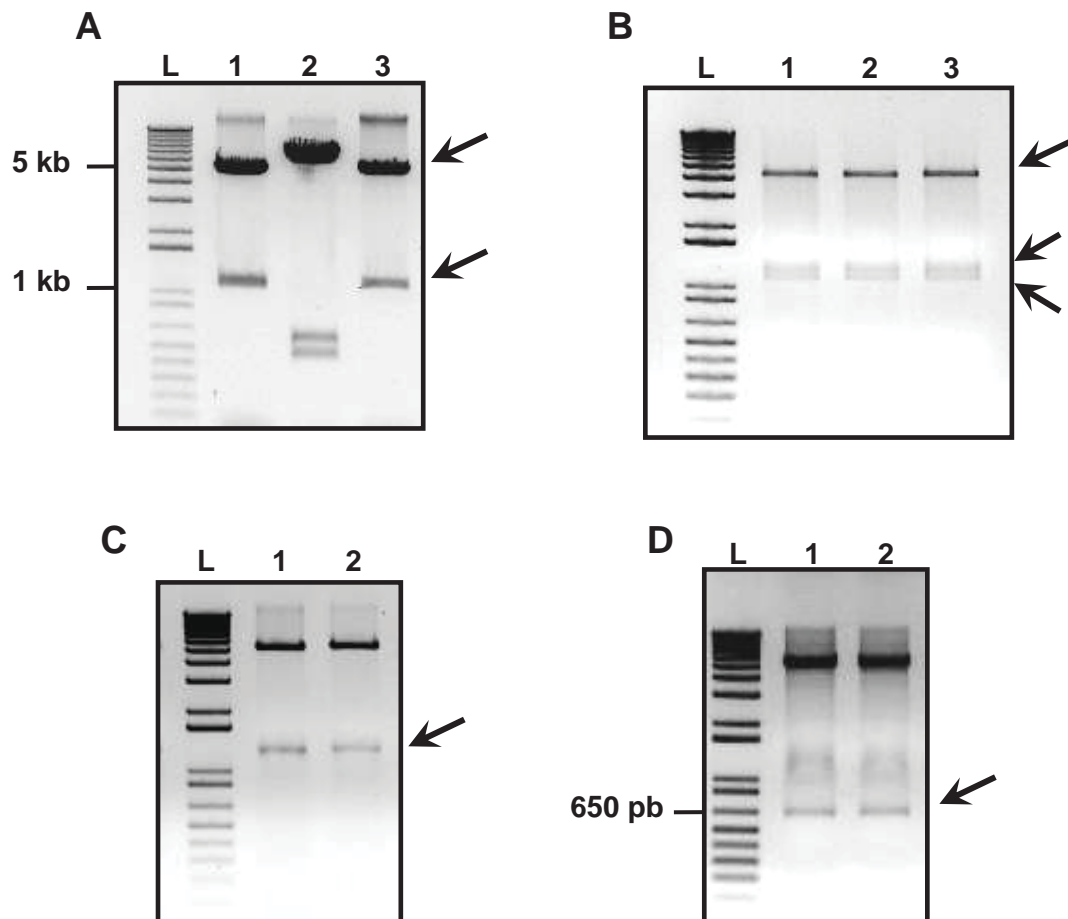


Figura 23 - Confirmação da subclonagem nos vetores de expressão por análise de restrição. (A) 1, 3- clones positivos do plasmídeo pGEX- *flbC* digerido com a enzima *Bam*HI e liberação do fragmento de 1.101 pb. (B) pET- *flbC* digerido com a enzima *Ava*I e liberação de 3 fragmentos: 4.111 pb, 1.130 pb e 1.071 pb. (C) pET-1629 digerido com as enzimas *Nhe*I e *Eco*RI e a liberação do fragmento de 1.263 pb. (D) pET- Δ *sre1* digerido com as enzimas *Nde*I e *Eco*RI e liberação do fragmento de 648 pb. L, *ladder* de 1 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídeo.

pET- Δ sre1 e pGEX-*flbC*. Amostras das construções plasmidiais de clones considerados positivos foram confirmadas através de seqüenciamento de DNA e armazenados a -80°C para a continuidade do trabalho. Os fragmentos foram inseridos no vetor de expressão pET28a para a produção de proteínas recombinantes fusionadas a uma cauda de poli-His e o inserto subclonado no vetor de expressão pGEX-4T1 para a produção da proteína fusionada a GST (glutathiona-S-transferase).

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

Para a produção das proteínas recombinantes, os plasmídeos pET-*flbC*, pET-1629, pET- Δ sre1 e pGEX-*flbC* foram utilizados para transformar linhagens de *E. coli*. As culturas celulares foram induzidas com uma concentração final de 0,4 mM de IPTG e amostras foram coletadas antes e depois de serem induzidas. Células foram coletadas e lisadas em tampão de lise e centrifugadas para a separação do sobrenadante (S) e do precipitado (P) para verificar a solubilidade das proteínas.

Primeiramente, o ensaio de indução da proteína FLBC fusionada à GST (pGEX-*flbC*) transformada em *E. coli* BL21 foi realizada juntamente com o controle (pGEX-4T1), o qual produz somente a proteína GST (tamanho teórico de 26 kDa). Após 4 horas de indução a 37°C, as células foram lisadas em tampão Tris e amostras das porções sobrenadante e precipitado foram analisadas por SDS-PAGE, em gel 12%. Na figura 24A, bandas apontadas pelas setas correspondem à proteína recombinante GST-FLBC contendo aproximadamente 66 kDa (sendo 40,3 kDa o peso molecular teórico da proteína somado a 26 kDa referente à proteína GST). A presença da proteína foi confirmada por *Western blot* (figura 24B) utilizando anticorpo anti-GST conjugado à enzima peroxidase. O ensaio mostra que a proteína se encontra tanto na forma solúvel (S) como insolúvel (P). A mesma proteína fusionada à cauda poli-His (His-FLBC) foi induzida nas mesmas condições, sendo realizada juntamente com os controles negativo (pET28a vazio) e positivo (pET-XAC2369). Este último produz a proteína recombinante de *Xanthomonas citri* subsp. *citri* de 24 kDa. A análise por SDS-PAGE mostrou que a banda correspondente à proteína His-FLBC (indicada pela seta na figura 25A) não se destacou muito quando comparada às demais. Entretanto, o resultado da detecção protéica por *Western blot* através de anticorpo conjugado com fosfatase alcalina, revelou claramente a presença da banda referente à proteína com aproximadamente 41 kDa, sem qualquer contaminação, tanto no sobrenadante (S) como no precipitado (P), como mostrado na figura 25B.

As primeiras análises da expressão da proteína His-1629 foram realizadas em linhagens *E. coli* BL21 e Rosetta nas mesmas condições anteriores e mostraram que a proteína não se apresentou na forma solúvel, aparecendo a banda expressa somente no precipitado (dados

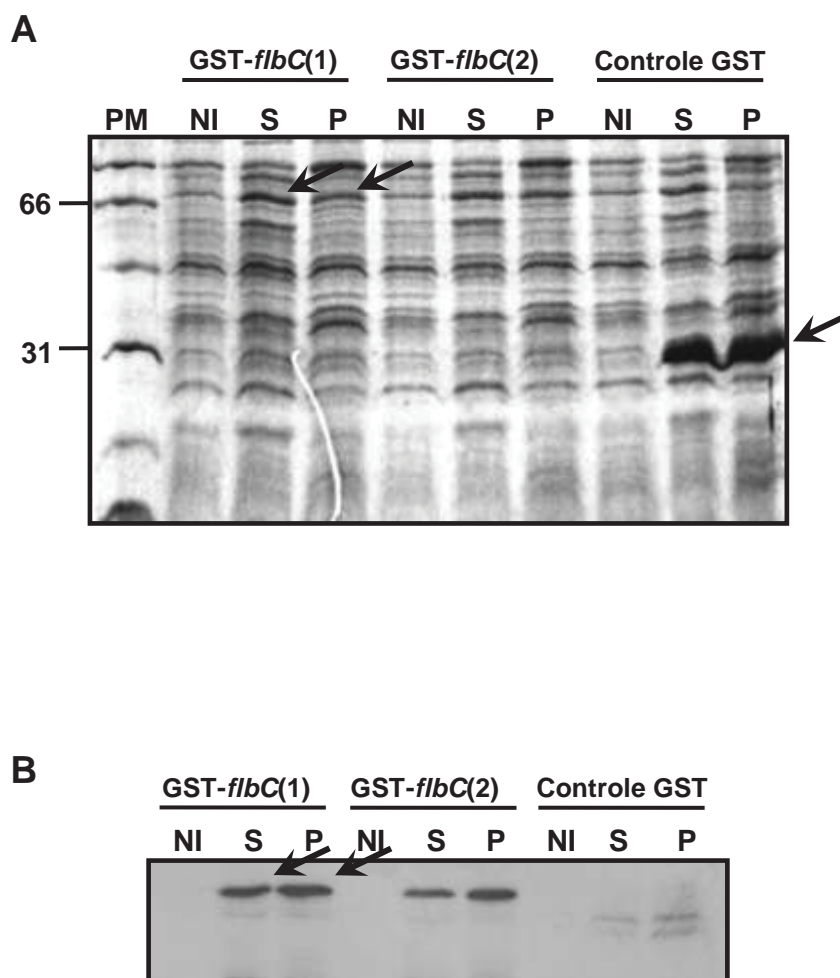


Figura 24 - Análise da expressão em *E. coli* BL21 da proteína GST-FLBC. NI- amostra não-induzida; S- sobrenadante, P- precipitado. **(A)** Extratos de células transformadas com o plasmídeo pGEX-FLBC (GST-FLBC), e pGEX (controle). As setas indicam bandas correspondentes à proteína recombinante com aproximadamente 66 kDa e indicam a expressão do controle positivo GST. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Comassie Brilliant Blue R-250. **(B)** *Western blot*. Filme de raios-X mostrando a revelação com anticorpo anti-GST conjugado à enzima peroxidase. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares das proteínas em kDa.

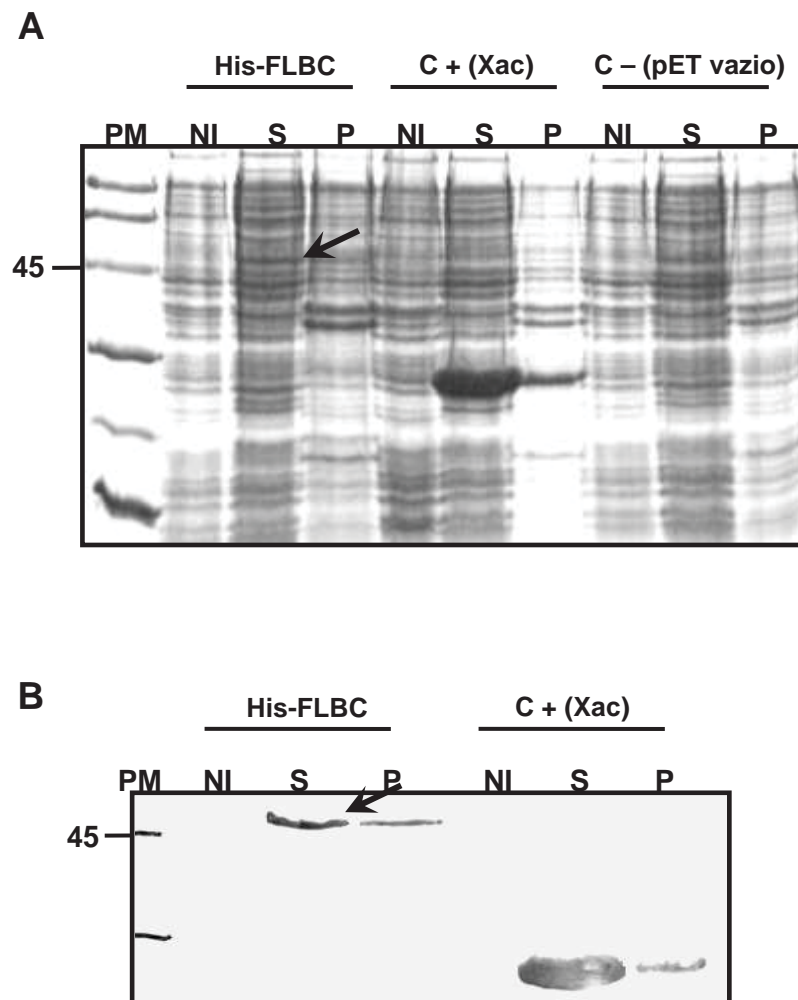


Figura 25- Análise da expressão em *E. coli* BL21 da proteína His-FLBC. PM, peso molecular (kDa). NI- amostra não-induzida; S- sobrenadante, P- precipitado. **(A)** Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-*flbC* (His-FLBC), pET-Xac (controle positivo) e pET vazio (controle negativo). As setas indicam bandas correspondentes à proteína recombinante (aproximadamente 41 kDa). Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. **(B)** Membrana do *Western blot* revelada pela presença de anticorpos conjugados à fosfatase alcalina. Os números à esquerda do gel expressam os pesos moleculares das proteínas em kDa.

não mostrados). Novas análises de expressão alterando as condições de indução, linhagem de *E. coli* e tampão de lise foram realizados com o objetivo de aumentar a solubilidade da proteína. Apesar de continuar fortemente expressa no precipitado, somente nos ensaios de indução da proteína (His-1629) na linhagem *ArcticExpress* e usando o tampão Hepes na lise celular, foi possível observar que parte da proteína se tornou solúvel após indução durante 24 horas a 12°C. A solubilidade da proteína His-1629 revelado pela presença da banda correspondente ao peso molecular esperado (47 kDa) é mostrada na figura 26A. A banda espessa acima da proteína alvo é referente à expressão de chaperoninas, encontradas na linhagem *E. coli ArcticExpress*. A confirmação da solubilidade detectada pelo anticorpo anti-His conjugado com fosfatase alcalina por *Western blot* é mostrada na figura 26B.

Ensaio de indução foram exaustivamente realizados com a proteína His- Δ SRE1 em diferentes condições, porém, não foi possível observar expressão da proteína em nenhuma das linhagens *E. coli*. Como a ORF desta proteína foi clonada de maneira a produzir a proteína na forma truncada, talvez a região excluída seja essencial na produção da proteína na forma recombinante. Um fragmento maior desta ORF foi clonado e deverá ser utilizado em outros ensaios de produção da proteína recombinante. A partir desses resultados, optou-se por seguir os ensaios de purificação com as proteínas que apresentaram solubilidade, ou seja, com as proteínas recombinantes His-FLBC, GST-FLBC e His-1629.

9. Purificação de proteína recombinante

Com o objetivo de obter proteínas recombinantes com alto grau de pureza para posteriormente dar início aos ensaios de ligação ao DNA (EMSA, *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), a purificação das proteínas His-FLBC e His-1629 foram inicialmente realizadas por cromatografia de afinidade utilizando-se uma resina de NiNTA agarose, a qual nos permite purificar uma proteína rapidamente e de maneira simplificada utilizando centrifuga de bancada. Para isso, as proteínas foram produzidas em pequena escala (200 mL de cultura partindo do pré-inóculo) através da indução a 37 °C (para a produção da proteína recombinante His-FLBC) e da indução a 12 °C (para a produção da proteína recombinante His-1629). Após indução, as células foram coletadas e ressuspensas em tampão de lise contendo uma baixa concentração de imidazol conforme descrito em Materiais e Métodos. A figura 27A mostra um gel de SDS-PAGE da proteína His-FLBC nas diferentes etapas da purificação. Podemos observar que mesmo nas frações de lavagem (FT, *flow through*) ocorreu a perda da proteína recombinante. A fração eluída com 300 mM de imidazol (E2) apresentou maior pureza em relação à fração E1 (eluição com 100 mM de imidazol). Pode-se afirmar que é um método simples de purificação, entretanto para esta proteína não foi possível de ser utilizado devido à presença de contaminação. A figura 27B mostra o gel SDS-PAGE da proteína His-1629 nas etapas de

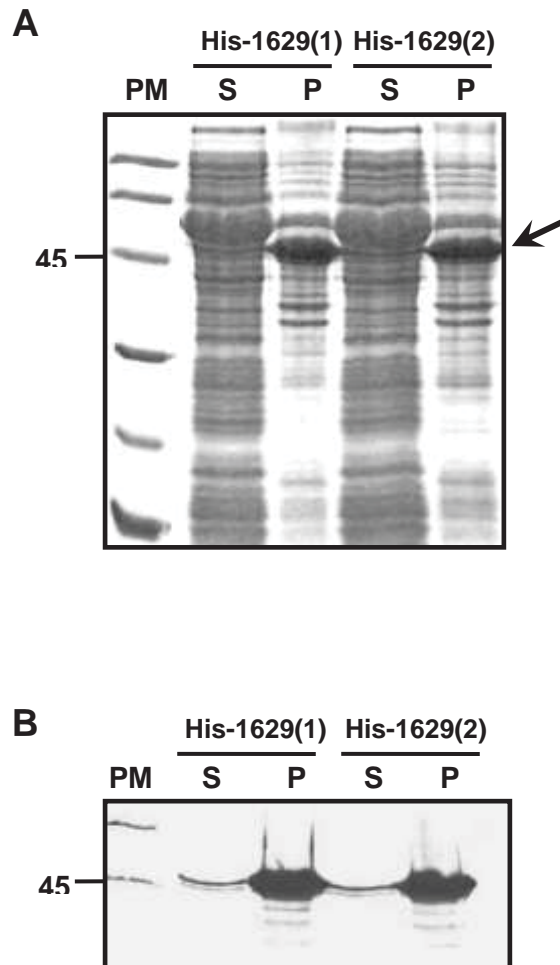


Figura 26- Análise da expressão em *E. coli* Arctic Express da proteína His-1629. S-sobrenadante, **P-**precipitado. **(A)** Extratos de células transformadas com o plasmídeo pET-1629 (His-1629). As setas indicam bandas correspondentes à proteína recombinante com aproximadamente 47 kDa. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, corado com Coomassie Brilliant Blue R-250. **(B)** Membrana do *Western blot* revelada pela presença de anticorpos conjugados à fosfatase alcalina. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares das proteínas em kDa.

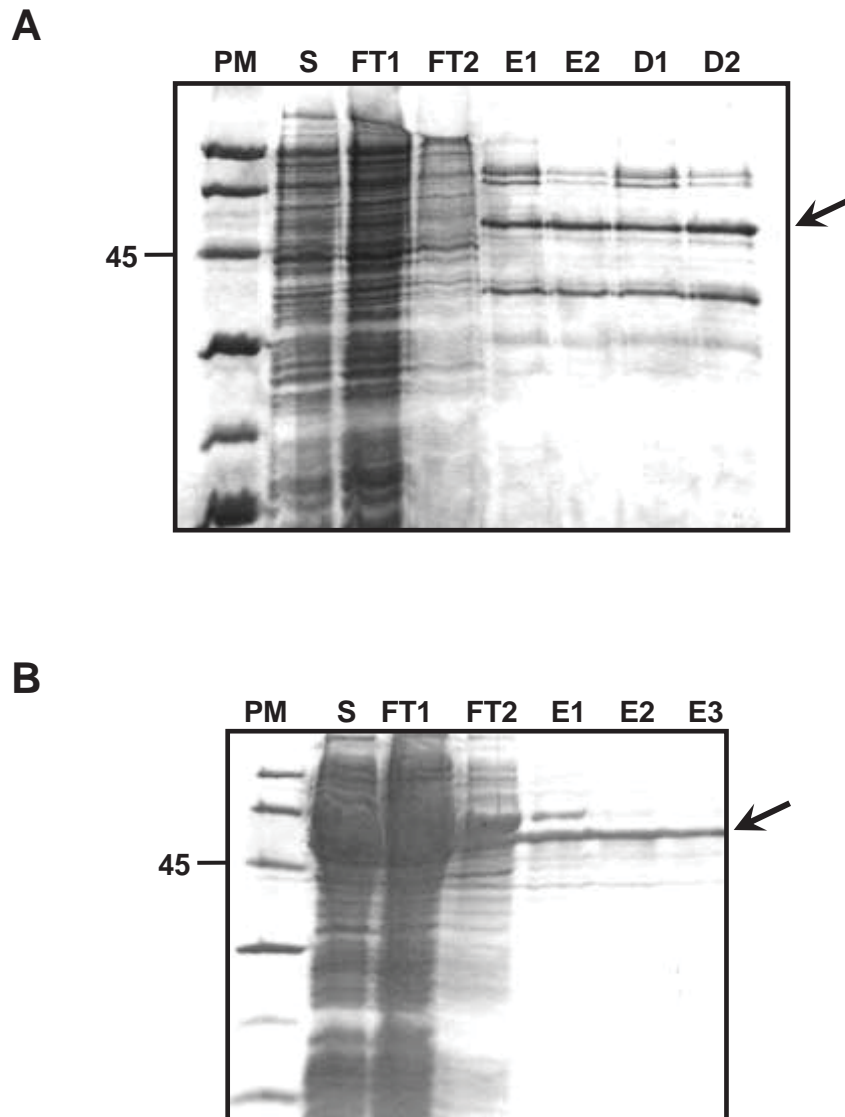


Figura 27- Purificação das proteínas His-FLBC e His-1629 produzidas em *E. coli* utilizando resina de NiNTA. (A) His-FLBC. (B) His-1629. PM- peso molecular, **S-** sobrenadante, **FT1 e FT2-** *flow through*, **E1-** eluição com 100 mM de imidazol, **E2-** eluição com 300 mM de imidazol, **E3-** eluição com 500 mM de imidazol. **D1 e D2-** amostras após diálise das frações E1 e E2, respectivamente realizado somente com a proteína His-FLBC. SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. A seta aponta as bandas correspondentes às proteínas recombinantes. O número à esquerda do gel expressa o Peso Molecular das proteínas em kDa.

purificação. Foi possível notar que também houve perda da proteína nas frações de lavagem (FT). Como pode ser observado, a chaperonina, a qual é altamente expressa nesta linhagem de *E. coli* (*ArcticExpress*), não foi purificada junto com a proteína de interesse. A partir da eluição com 300 mM e 500 mM de imidazol (E2 e E3) foi possível a obtenção da proteína com alto grau de pureza e livre da contaminação da banda referente à chaperonina.

Após o procedimento de purificação das proteínas em pequena escala, o próximo passo foi utilizar o procedimento de purificação por cromatografia de afinidade utilizando o sistema de purificação AKTA Prime e cultura de 1L (grande escala). 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 His-FLBC é mostrado na figura 28A. A figura 28B mostra as frações da cromatografia obtidas após eluição, na qual foi possível observar que a proteína foi purificada com bom grau de pureza a partir da fração 18 e a proteína purificada foi mantida até as frações eluídas finais. Por outro lado, a purificação da mesma proteína fusionada a GST (GST-FLBC) não foi satisfatória e apresentou contaminação com outras proteínas, como pode ser visto na figura 29B. O perfil cromatográfico de eluição da proteína GST-FLBC é representado pela figura 29A. A purificação por cromatografia de afinidade em grande escala também foi realizada com a proteína His-1629 e o perfil de eluição é representado na figura 31A. A análise das frações eluídas em gel, após a purificação, mostrou a presença de poucas bandas contaminantes e ausência da contaminação referente à chaperonina (figura 30B).

10. Análise da ligação DNA-proteína SRE1 por EMSA

A análise da capacidade de ligação das proteínas a seqüências específicas de DNA foi realizada através do ensaio de retardamento em gel ou EMSA. Este ensaio baseia-se na detecção de uma proteína ligadora de DNA que reconhece especificamente uma seqüência que pode ser importante no controle da expressão de um gene em uma condição particular. A detecção das proteínas que se ligam ao DNA é baseada no efeito que essas proteínas causam na migração do DNA em um campo elétrico quando ligada a ele. O fragmento de DNA é marcado radiativamente e misturado ao extrato celular. As proteínas ligadoras de DNA irão retardar a migração do fragmento de DNA no gel quando submetido a um campo elétrico e o complexo DNA-proteína será detectado pela auto-radiografia. Neste ensaio, a proteína recombinante purificada também pode ser usada para a detecção de complexos DNA-proteína.

A análise da região promotora do gene *gsn*, realizada no laboratório, mostrou a existência de dois possíveis *motifs* de ligação de DNA (5'-TCAC-3') reconhecidos pela proteína SRE1 de *S. pombe* (HUGHES; TODD; ESPENSHADE, 2005) nas posições -1758 e -2024

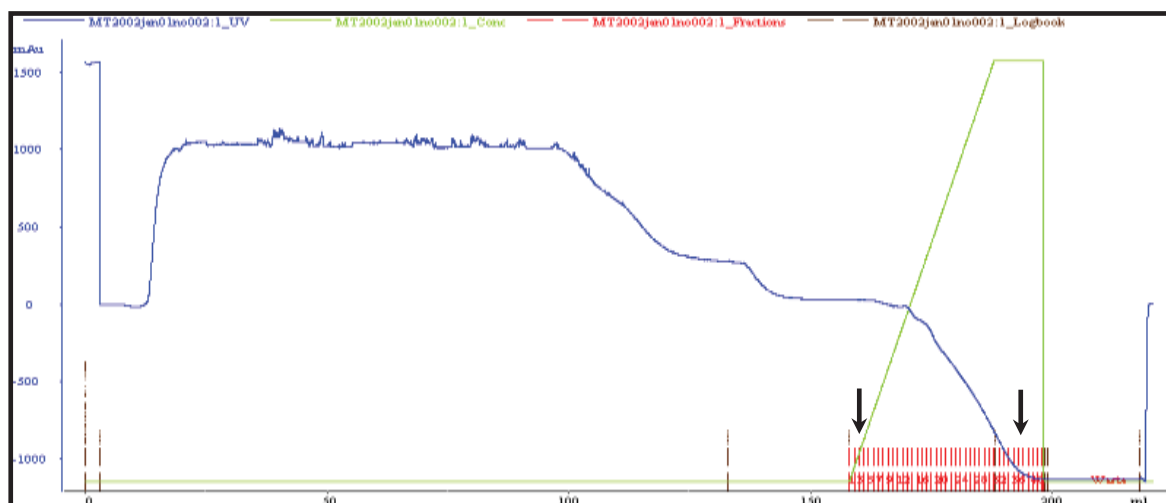
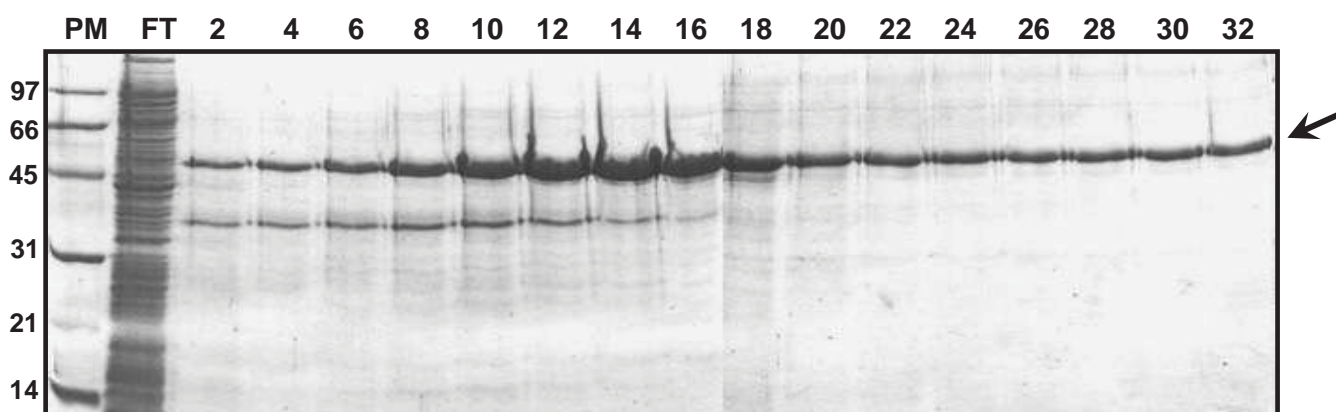
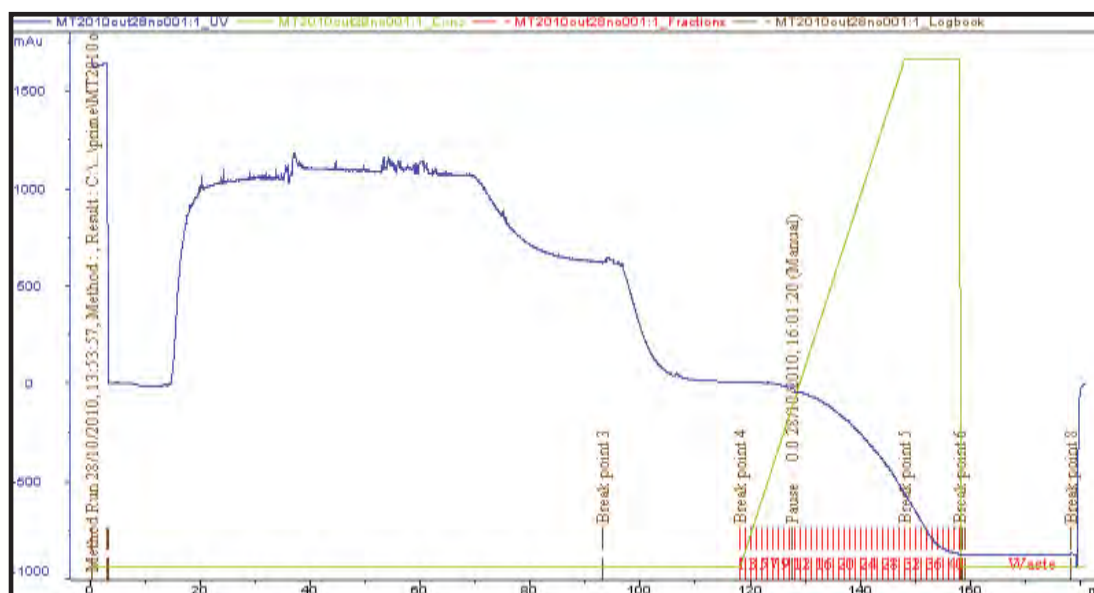
A**B**

Figura 28 - Purificação da proteína His-FLBC produzida em *E. coli* em grande escala. (A) Perfil de eluição da proteína recombinante. As setas apontam as frações pares analisadas em gel (de 2 a 32). **(B)** Análise das frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%. A seta indica as bandas correspondentes à proteína recombinante com aproximadamente 41 kDa. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares aproximados das proteínas em kDa.

A



B

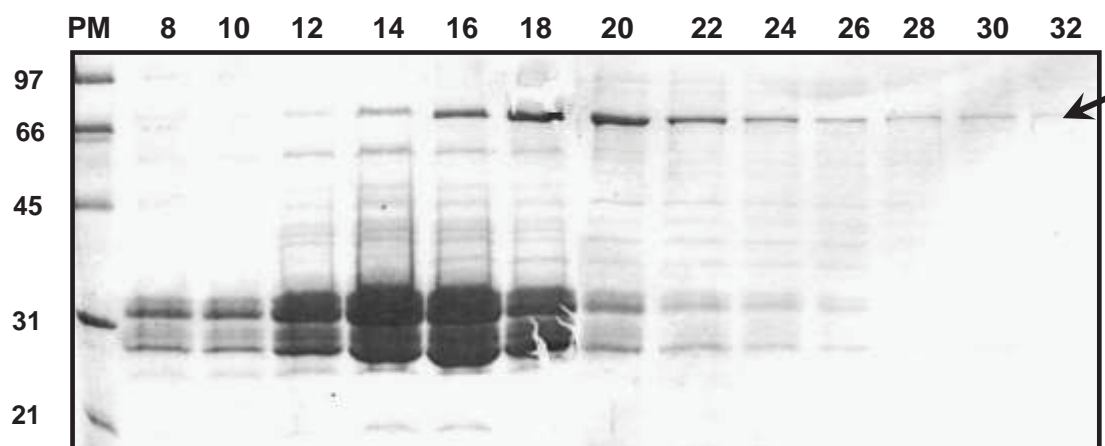
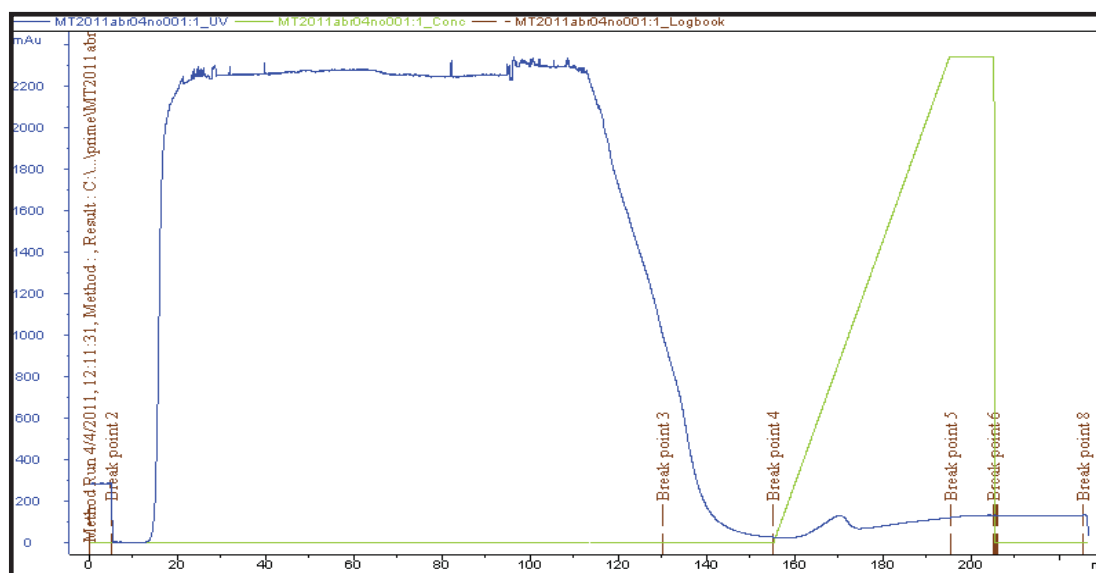


Figura 29 - Purificação da proteína GST-FLBC produzida em *E. coli* em grande escala. (A) Perfil de eluição da proteína recombinante. **(B)** Análise das frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%. A seta indica as bandas correspondentes à proteína recombinante com aproximadamente 66 kDa. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares aproximados das proteínas em kDa.

A



B

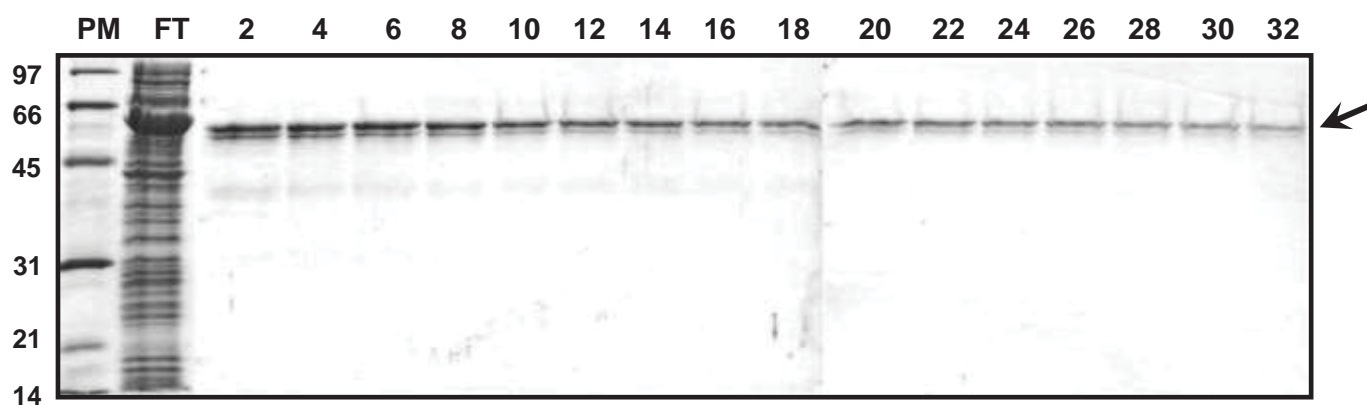


Figura 30- Purificação da proteína His-1629 produzida em *E. coli* em grande escala. (A) Perfil de eluição da proteína recombinante. **(B)** Análise das frações da cromatografia em SDS-PAGE 12%. A seta indica as bandas correspondentes à proteína recombinante com aproximadamente 47 kDa. Os números à esquerda do gel expressam os Pesos Moleculares aproximados das proteínas em kDa.

(GONÇALVES et al., 2011), como mostra a figura 31 e vários foram identificados no promotor *gpn*.

Para investigar a capacidade de ligação dessa proteína a seqüências de DNA no promotor do gene *gsn*, ensaios de EMSA foram realizados utilizando frações cromatográficas obtidas após fracionamento do extrato celular total em coluna de Heparina-Sepharose. O perfil de eluição está apresentado na figura 32A. A interação DNA-proteína foi analisada na presença de frações cromatográficas (50 µg) com uma sonda de DNA de 164 pb contendo *motif* SRE1, como mostrado no esquema da figura 32B. Os oligonucleotídeos utilizados para a amplificação do fragmento de DNA (tabela 4) foram desenhados de maneira a conservar um dos possíveis *motifs* de ligação SRE1 no promotor *gsn*. Foram analisadas as frações de 12 a 19 e os resultados do ensaio realizado mostraram que ocorreu a formação de complexos DNA-proteína, indicados pelas setas na figura 32B, a partir da fração 14, sugerindo a ligação de proteínas do extrato ao *motif* SRE1.

Com o objetivo de validar os resultados apresentados, a especificidade dos complexos formados foi verificada pela incubação dos extratos na presença do competidor específico *sre1*. Para o ensaio de competição, o mesmo fragmento de DNA usado como sonda foi adicionado sem marcação radiativa na reação e usado como competidor específico. As ligações das proteínas ao sítio *sre1*, após adição do competidor específico, mostraram a liberação parcial da sonda, em comparação ao perfil mostrado anteriormente. Embora a formação dos complexos DNA-proteína, observados nas frações de 16 a 17, não foi impedida pela adição prévia do competidor específico (10 X) (figura 33A, linhas 4 a 9) podemos observar uma redução na formação dos complexos quando o competidor estava presente. A figura 33B mostra o ensaio de EMSA realizado com a fração protéica 17 na presença de uma concentração maior de competidor específico em relação à sonda (20 X). Os resultados mostraram que, assim como ocorreu anteriormente no ensaio de competição, o aumento da concentração do competidor específico não impediu a formação do complexo, apesar de aumentar a capacidade de migração da sonda livre no gel. A observação dos resultados dos ensaios de EMSA do extrato total protéico com o fragmento de DNA contendo o *motif* SRE1 indicou que proteínas presentes no extrato se ligaram ao *motif* SRE1 do promotor *gsn*.

Estes ensaios são preliminares e outros ensaios deverão se repetidos para a confirmação da ligação, inclusive utilizando a proteína recombinante quando conseguirmos a mesma. Da mesma maneira, ensaios de competição tais como, uso de oligonucleotídeo dupla-fita como competidor, deverá ser realizado para a confirmação da especificidade da ligação.

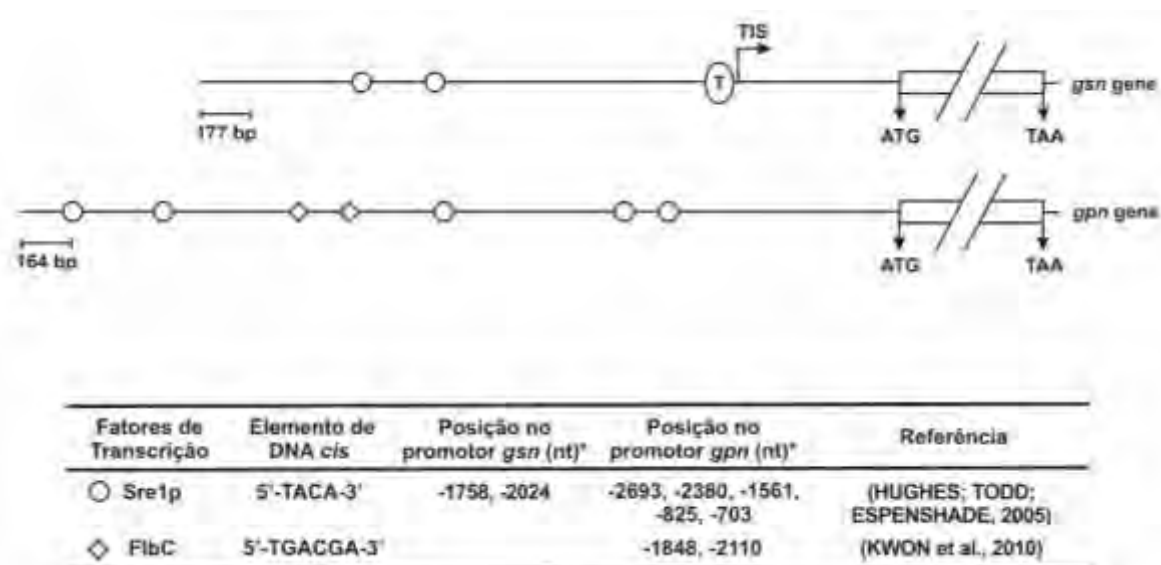


Figura 31- Representação esquemática da região 5'-flanqueadora dos genes *gsn* e *gpn*. Posições relativas dos *motifs* de DNA reconhecidos pelos fatores de transcrição SRE1 e FLBC. A seqüência TATA-box no promotor *gsn* é indicada por T. A ORFs estão delimitadas pelo *start* e *stop* códon ATG e TAA. O Sitio de iniciação da transcrição (TIS) no promotor *gsn* é representado por uma seta. A posição dos elementos de DNA considera o codon ATG de iniciação da tradução.

11. Análise da ligação DNA-proteína FLBC por EMSA

O ensaio de retardamento em gel também foi realizado com a proteína FLBC purificada (figura 29) a seqüências de DNA no promotor *gpn* (que codifica a enzima glicogênio fosforilase no fungo). Assim como a enzima glicogênio sintase atua na síntese de glicogênio, a enzima glicogênio fosforilase participa no metabolismo atuando na degradação do carboidrato. Uma análise da região promotora do gene *gpn* mostrou a existência de dois possíveis *motifs* de ligação de DNA (5'-TGACGAT/A-3') reconhecidos pela proteína FlbC de *A. nidulans* (KWON et al., 2010) nas posições -1848 e -2110, como mostra a figura 31. Em *A. nidulans*, o *motif* reconhecido por essa proteína foi encontrado na região promotora de genes envolvidos na regulação da conidiação como *brlA*, *vosA* e *abaA*. O sítio de ligação identificado no promotor *gpn* difere no último nucleotídeo (5'-TGACGAC/G-3') em relação ao sítio de *A. nidulans*.

Para analisar a capacidade de ligação da proteína FLBC de *N. crassa* ao promotor do gene *gpn*, fragmentos de DNA contendo os dois *motifs* foram utilizados como sondas no ensaio de EMSA. Os oligonucleotídeos desenhados para a obtenção do fragmento usado são apresentados na tabela 4 (Materiais e Métodos) e o fragmento amplificado foi clivado por enzimas de restrição que geraram duas sondas contendo os *motifs* desejados. Os resultados do ensaio de ligação da proteína FLBC recombinante com os fragmentos de DNA da região

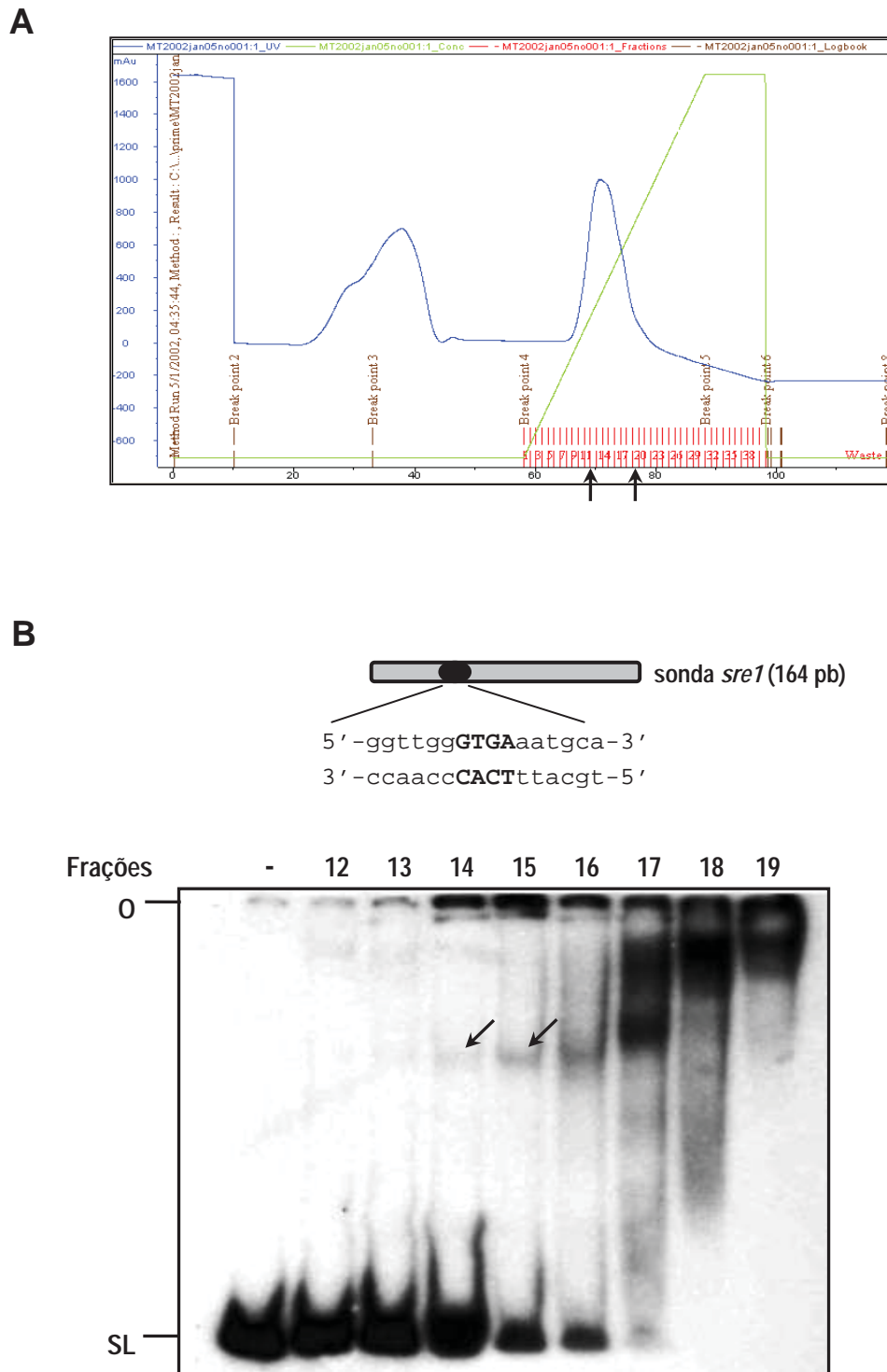


Figura 32- Fracionamento do extrato celular bruto de micélio seguido do ensaio de EMSA (A) Cromatograma das etapas de fracionamento do extrato protéico em coluna de Heparina-Sepharose, utilizando um gradiente linear de 0,1 a 1,5 M de KCl. **(B)** Auto-radiografia das frações 12 a 19 coletadas (50 µg), as quais foram testadas na presença da sonda *sre1* (esquemático acima). O, origem do gel; SL, sonda livre. Os complexos DNA–proteína estão indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 5% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5 X.

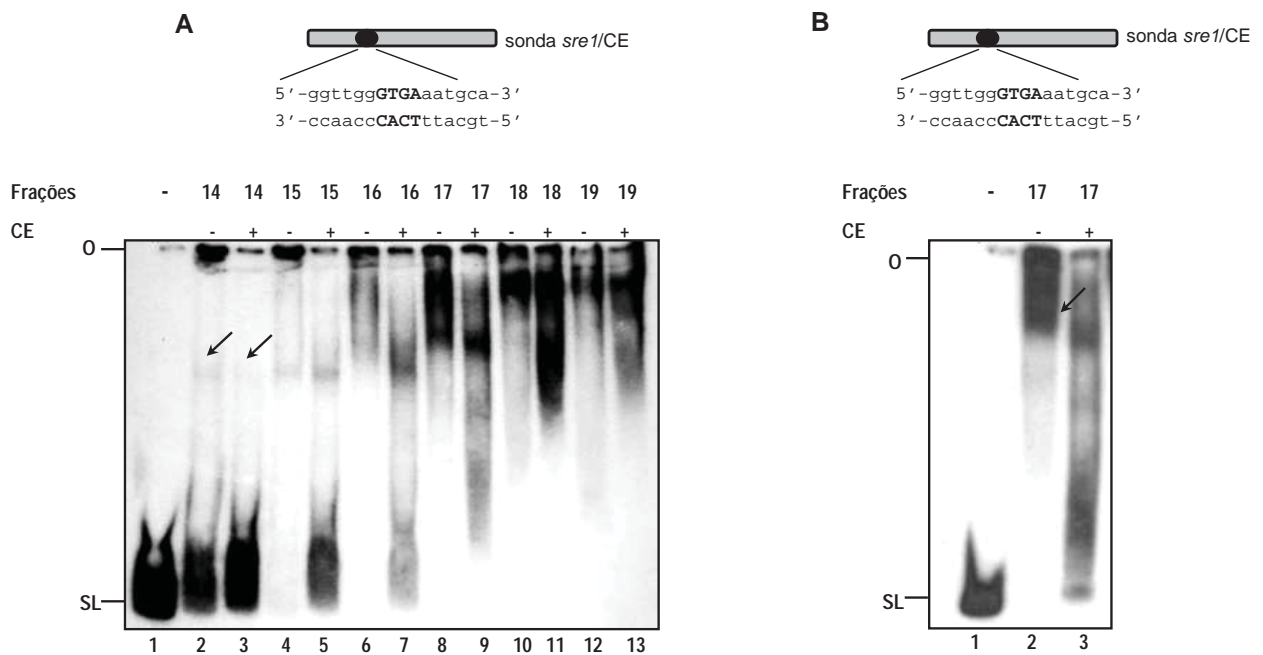


Figura 33- Ensaio de EMSA na presença do competidor específico. (A) Ensaio de EMSA mostrando a ligação de proteínas das frações 14 a 19 (50 µg) do extrato celular bruto de micélio à sonda *sre1*. O competidor específico (CE) na concentração de 10 X de excesso molar à sonda. **(B)** O competidor específico (CE) na concentração de 20 X de excesso molar à sonda. Linha 1, sonda sem adição de proteína; O, origem do gel; SL, sonda livre. Os complexos DNA-proteína são indicados pelas setas. Eletroforese em gel de poliacrilamida 4% não-desnaturante, em tampão TBE 0,5X.

promotora do gene *gpn* foram negativos, indicando que a proteína FLBC de *N. crassa* não se ligou ao *motif* de DNA reconhecido. Da mesma maneira, os resultados são preliminares e outras análises serão realizadas.

Principais Conclusões

As principais conclusões deste trabalho foram:

- A proteína FLBC de *N. crassa*, assim como em outros fungos filamentosos foi mostrada estar envolvida com os processos de extensão e morfologia de hifas e conidiação do fungo, portanto é requerida para o crescimento normal e desenvolvimento do fungo. Além disso, está também envolvida na regulação do processo de melanização no fungo.
- O gene que codifica a proteína FLBC foi altamente expresso no início do processo de germinação dos conídios, comprovando a participação da proteína no crescimento vegetativo do fungo.
- A proteína FLBC recombinante produzida em *E. coli* e purificada não foi capaz de se ligar a um fragmento de DNA do promotor do gene *gpn* contendo um sítio de ligação para a proteína e descrito em *A. nidulans*. Os resultados são preliminares e deverão ser confirmados.
- A proteína SRE1 de *N. crassa* parece não estar envolvida com o crescimento do fungo em baixo teor de oxigênio, como descrito para *C. albicans* e *S. pombe*. Se realmente a proteína de *N. crassa* não é requerida para o crescimento do fungo nesta condição, podemos concluir que o fungo *N. crassa* mais se aproxima de eucariotos superiores do que de eucariotos inferiores, nesta situação ambiental.
- Proteínas do extrato total do fungo se ligaram ao *motif* de DNA *sre1* do promotor *gsn*. Este resultado permite concluir que a proteína SRE1, presente em tal extrato, pode se ligar ao promotor *gsn* e, desta maneira, regular o metabolismo do carboidrato controlando a expressão do gene *gsn*.
- A proteína SRE1 truncada não foi produzida na forma recombinante em *E. coli*. Isto pode ser devido à ausência de alguma região importante para a proteína e, por isto, uma nova forma truncada será produzida em *E. coli*.
- O produto da ORF NCU01629 foi produzido em *E. coli* e a proteína foi purificada. Homólogos funcionais da proteína não foram identificados através de análise por Blast. Experimentos de ChIP-seq estão sendo realizados com esta proteína o que deverá resultar em informações importantes em relação aos sítios de ligação a DNA para este fator de transcrição.

Referências

- ABRAMOFF, M. D.; MAGALHÃES, P. J.; RAM, S. J. Image processing with IMAGEJ. **Biophotonics International**, v. 11, n. 7, p. 36-42, July 2004.
- ADAMS, T. H.; HIDE, W. A.; YAGER, L. N.; LEE, B. N. Isolation of gene required for programmed initiation of development by *Aspergillus nidulans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 12, n. 9, p. 3827-3833, Sept. 1992.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2004.
- ALMER, A.; RUDOLPH, H.; HINNEN, A.; HORZ, W. Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. **EMBO Journal**, v. 5, n. 10, p. 2689-2696, Oct. 1986.
- BIEN, C. M.; ESPENSHADE, P. J. Sterol regulatory element binding proteins in fungi: hypoxic transcription factors linked to pathogenesis. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 4, p. 352-359, Mar. 2010.
- BIENZ, M.; PELHAM, H. R. Heat shock regulatory elements function as an inducible enhancer in the *Xenopus hsp70* gene and when linked to a heterologous promoter. **Cell**, v. 5, n. 45, p. 753-760, June 1986.
- BORKOVICH, K. A.; ALEX, L. A.; YARDEN, O.; FREITAG, M.; TURNER, G. E.; READ, N. D.; SEILER, S.; BELL-PEDERSEN, D.; PAIETTA, J.; PLESOFSKY, N.; PLAMANN, M.; GOODRICH-TANRIKULU, M.; SCHULTE, U.; MANNHAUPT, G.; NARGANG, F. E.; RADFORD, A.; SELITRENNIKOFF, C.; GALAGAN, J. E.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; CATCHESIDE, D.; INOUE, H.; ARAMAYO, R.; POLYMENIS, M.; SELKER, E. U.; SACHS, M. S.; MARZLUF, G. A.; PAULSEN, I.; DAVIS, R.; EBBOLE, D. J.; ZELTER, A.; KALKMAN, E. R.; O'ROURKE, R.; BOWRING, F.; YEADON, J.; ISHII, C.; SUZUKI, K.; SAKAI, W.; PRATT, R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 1, n. 68, p. 1-108, Mar. 2004.
- BRADEN, C.; TOOZE, J. **Introduction to protein structure**. 2nd ed. New York: Garland Publishing, 1999.
- BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Conidial pigmentation is important to tolerance against solar-simulated radiation in the entomopathogenic fungus *Metaehizium anisopliae*. **Photochemistry and Photobiology**, v. 82, p. 418-422, Abr. 2006.
- BRUNELLI, J. P.; PALL, M. L. A series of yeast/*Escherichia coli* lambda expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and cre/lox-mediated plasmid excision. **Yeast**, v. 9, p. 1309-1318, Dec. 1993.
- CHANG, Y. C.; BIEN, C. M.; LEE, H.; ESPENSHADE, P. J.; KWON-CHUNG, K. J. Sre1p, a regulator of oxygen sensing and sterol homeostasis, is required for virulence in *Cryptococcus neoformans*. **Molecular Microbiology**, v. 64, p. 614-629, May 2007.
- COPPIN, E. The *fle1* gene encoding a C2H2 zinc finger protein co-ordinates male and female sexual differentiation in *Podospora anserina*. **Molecular Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 1255-1268, Mar. 2002.
- 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. **Molecular Genetics and 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.; LAMBREGHTS, R.; COLOT, H. V.; PARK, G.; COLLOPY, P.; RINGELBERG, C.; CREW, C.; LITVINKOVA, L.; DECAPRIO, D.; HOOD, H. M.; CURILLA, S.; SHI, M.; CRAWFORD, M.; KOERHSEN, M.; MONTGOMERY, P.; LARSON, L.; PEARSON, M.; KASUGA, T.; TIAN, C.; BASTURKMEN, M.; ALTAMIRANO, L.; XU, J. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project.. **Advances in Genetics**, v. 57, p. 49-96, Mar. 2007.

ESPENSHADE, P. J. SREBPs: sterol-regulated transcription factors. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 973-976, Mar. 2006.

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

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

FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Genomic organization of the *Neurospora crassa* *gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. **Molecular Genetics and Genomic**, v. 5, n. 272, p. 550-561, Dec. 2004.

FREITAS, F. Z.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J.; BERTOLINI, M. C. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. **Proteomics**, v. 10, n. 8, p. 2052-2061, May 2008.

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.; KRYSSTOFOVA, 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**, London, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GONÇALVES, R. D. **Identificação de fatores de transcrição de *Neurospora crassa* envolvidas na regulação do metabolismo de glicogênio**. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

GONÇALVES, R. D.; CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; LUCHESSI, A. D.; BERTOLINI, M. C. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Molecular and Cellular Proteomics**. July 2011. In press. DOI 10.1074/mcp.M111.007963.

- HARDY, T. A.; ROACH, P. J. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 23799-23805, Nov. 1993.
- HARRIS, R. A. **Carbohydrate metabolism I: major metabolic pathways and their control**. In: DEVLIN, T. M. **Textbook of biochemistry with clinical correlations**. 4th ed. New York: Wiley-Liss, 1997.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, Aug. 1972.
- HENSON, J. M.; BUTLER, M. J.; DAY, A. W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual Review Phytopatology**, v. 37, p. 447-471, Sept. 1999.
- HICKEY, P. C.; JACOBSON, D. J.; READ, N. D.; GLASS, L. N. Live-cell imaging of vegetative hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 37, n. 1, p. 109-119, Oct. 2002.
- HOLMES, D. D.; QUIGLEY, M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Analytical Biochemistry**, v. 114, n. 1, p. 193-197, June 1981.
- HUGHES, A. L.; TODD, B. L.; ESPENSHADE, P. J. SREBP Pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast. **Cell**, v. 120, p. 831-842, Mar. 2005.
- KWON, N. J.; GARZIA, A.; ESPESO, E. A.; UGALDE, U.; YU, J. H. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 5, p. 1203-1219, July 2010.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970.
- LANE, S.; ZHOU, S.; PAN, T.; DAI, Q.; LIU, H. The basic helix-loop-helix transcription factor Cph2 regulates hyphal development in *Candida albicans* partly via TEC1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, n. 19, p. 6418-6428, Oct. 2001.
- LEVINE, M.; TJIAN, R. Transcription regulation and animal diversity. **Nature**, v. 6945, n. 424, p. 147-151, July 2003.
- LI, B.; CAREY, M.; WORKMAN, J. L. The role of chromatin during transcription. **Cell**, v. 128, p. 707-719, Feb. 2007.
- LUGER, K.; MÄDER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 6648, n. 389, p. 251-260, Sept. 1997.
- METZENBERG, R. L. Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 3, p. 361-383, Sept. 1979.
- NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 4th ed. New York: W. H. Freeman, 2005.
- NI, H. T.; LAPORTE, D. C. Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. **Molecular Microbiology**, v. 16, p. 1197-1205, June 1995.

- NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 33, p. 12248-12253, Aug. 2004.
- NUTTALL, F. Q.; GANNON, M. C.; BAI, G.; LEE, E. Y. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 311, p. 443-449, June 1994.
- 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.
- PLONKA, P. M.; GRABACKA, M. Melanin synthesis in microorganisms – biotechnological and medical aspects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 53, p. 429-443, Sept. 2006.
- 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*. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 3-13, Mar. 2002.
- SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 37, p. 41-43, 1990.
- SPRINGER, M. L. Genetic control of fungal differentiation: the three sporulation pathways of *Neurospora crassa*. **Bioessays**, v. 15, n. 6, p. 365-374, June 1993.
- TODD, B. L.; STEWART, E. V.; BURG, J. S.; HUGHES, A. L.; ESPENSHADE, J. P. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission Yeast. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, n. 7, p. 2817-2831, Apr. 2006.
- VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa* (medium N). **Microbiol Genetic Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.
- WEILAND, J. J. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 44, p. 60-63, 1997.
- WILLGER, S. D.; PUTTIKAMONKUL, S.; KIM, K. H.; BURRITT, J. B.; GRAHL, N.; METZLER, L. J.; BARBUCH, R.; BARD, M.; LAWRENCE, C. B.; CRAMER, R. A. Jr. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, Nov. 2008.