Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA SPOSTO AVACA

A proteína quinase dependente de ciclina NcPHO85 de Neurospora crassa. Estudos de caracterização molecular e bioquímica

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 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Avaca, Juliana Sposto

A945p

A proteína quinase dependente de ciclina NcPHO85 de *Neurospora crassa*. Estudos de caracterização molecular e bioquímica / Juliana Sposto Avaca. -- Araraquara : [s.n], 2007

108 f.: il.

Dissertação (mestrado) — Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química

Orientador: Maria Célia Bertolini

1. Bioquímica. 2. Neurospora crassa. 3. Inativação gênica. 4. Expressão gênica. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

Dados curriculares

Juliana Sposto Avaca

1. Dados pessoais

Filiação: Luis Alberto Avaca e Maria Regina Sposto

Nascimento: 23 de março de 1981, São Carolos - SP, Brasil

Documento de Identidade: 33.407.350-9 / SSP-SP / 01/06/1995

Cadastro de Pessoa Física: 218.250.448-64

Endereço pessoal: Rua Padre Teixeira, 1337 – apto 202 - Jd. Bethânia

CEP: 13561-050 - São Carlos, SP

Endereço profissional: Instituto de Química de Araraquara - UNESP

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química

Rua Prof. Francisco Degni s/n - 14800-900 - Araraquara, SP

Profissão: Farmacêutica-Bioquímica

2. Formação acadêmica/titulação

2004 – 2007: Mestrado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em

Biotecnologia, Título: A proteína quinase dependente

In: XXXV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2006, Águas de Lindóia - SP. 2006.

AVACA, Juliana Sposto; PAULA, Renato Magalhães de; FREITAS, Fernanda Zanolli; TERENZI, Heitor Francisco; BERTOLINI, Maria Célia. Molecular cloning of the Pho85p-like protein kinase in *Neurospora crassa*. In: XXXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 2005, Águas de Lindóia – SP.

3.2. Resumo simples em anais de eventos

AVACA, Juliana Sposto; SILVA, Juliana L Monteiro da; ANDREOTTI, Patrícia F; GIANNINI, Maria José Soares Mendes. Interação de *Paracoccidioides brasiliensis* com células endoteliais. In: XIII CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA - UNESP, 2001, Bauru-SP.

3.3. Participação em eventos

XXXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. 2006.

XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2005.

XXXIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular-SBBg. 2004.

50a. Jornada Farmacêutica da UNESP. 2003.

49a. Jornada Farmacêutica da UNESP. 2002.

Conselho Nacional as Entidades Estudantis de Farmácia. 2001.

47a. Jornada Farmacêutica da UNESP. 2000.

Conselho Nacional de Entidades Estudantis de Farmácia. 2000.

Il Simpósio de Biotecnologia, durante a 47a. Jornada Farmacêutica da UNESP. 2000.

46a, Jornada Farmacêutica da UNESP, 1999.

Simpósio da Lei dos Medicamentos Genéricos. 1999.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria Regina e Luis Alberto, que sempre me conduziram pelo melhor caminho mesmo que, às vezes, por teimosia eu resistisse, sempre permitindo meu aprendizado e crescimento pessoal. Eles são meus exemplos de vida pessoal e profissional.

Ao meu namorado, Edson Crusca Júnior, que muito colaborou para finalizar esta etapa da minha vida, e que estará presente nas etapas que virão. Pelos maravilhosos momentos vividos juntos, pela força, compreensão, carinho, paciência e atenção.

A Deus, pelos desafios, facilidades e pessoas que Ele colocou em meu caminho, que apesar das dificuldades, me trouxeram tantas alegrias e conquistas.

AGRADECIMENTOS

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

Ao Prof. Dr. Héctor Francisco Terenzi, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, SP, pela colaboração no início deste trabalho.

A Prof. Dr. Maria José M. S. Giannini, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, por permitir o uso do biotério para a produção de anticorpos, e pela participação no Exame Geral de Qualificação e sugestões, também à Rosângela e Elaine por ajudar com os cuidados dos coelhos.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, principalmente do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, em especial o Prof. Dr. Reinaldo Marchetto pela excelente coordenação do Programa.

A minha mãe e ao meu pai por toda minha vida, pelo amor, carinho, incentivo, e pelos sábios aconselhamentos desde sempre.

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

Aos amigos Eduardo Hilário, Elaine C. Teixeira, Fernanda Z. Freitas, Patrícia A. Assis, Margareth Batistote, Luiz Carlos Bertucci, Flávia M. Gonçalves, Gisele A. Pedroso, Rodrigo D. Gonçalves, Messias Miranda Junior, pela amizade, pela colaboração, pelas conversas e dúvidas esclarecidas, além dos bons momentos e convivência. Vocês são muito especiais.

Ao pessoal que passou pelo laboratório, Evelyn, Viviane, Marcelo e Denis, em especial ao Renato M. de Paula e à Mônica C. Terrão, pelos conselhos e conversas agradáveis.

Ao Tarcísio, Fátima, Waldenir, Fernando e Zilda por toda ajuda, amizade e convivência.

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

A todos os funcionários do Instituto de Química.

A Capes (Coordenadoria de Aperfeiçoamento Profissional de Ensino Superior) pela bolsa concedida.

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

Resumo

Neste trabalho foi realizado o isolamento do cDNA e do gene que codifica a proteína semelhante à Pho85p de Saccharomyces cerevisiae, em Neurospora crassa. Um fragmento de 1,1 kb correspondendo à seqüência nucleotídica do gene em N. crassa foi amplificado e confirmado por sequenciamento, o qual foi utilizado no rastreamento de uma biblioteca de cDNA de N. crassa, resultando em um plasmídeo contendo a ORF que codifica a Ncpho85 e as seqüências upstream e downstream à ORF. Este inserto foi seqüenciado, a ORF isolada apresentou 1014 bp, a região upstream contém 304 bp e a downstream 561 nucleotídeos. Após sequenciamento do cDNA, a seqüência polipeptídica da proteína foi comparada com outras proteínas semelhantes à Pho85p de fungos miceliares, leveduriformes além de S. cerevisiae. Esta ORF isolada foi utilizada no rastreamento de uma biblioteca genômica de N. crassa, possibilitando o isolamento de um plasmídeo contendo a següência genômica, o qual foi submetido a sequenciamento. No inserto foi possível confirmar a presença do intron (de 89 bp) no nucleotídeo 69, confirmando os dados existentes no banco de dados de N. crassa. A expressão do gene foi analisada ao longo do crescimento do fungo, em diferentes meios de cultivo, através de experimentos de Northern blot. A presença de duas bandas de hibridização, uma de 2,2 kb e uma 2,7 kb foi observada em todos os experimentos realizados. Um pico de expressão dos dois transcritos ocorreu no tempo de 12 horas, sendo mais evidente para o transcrito de menor tamanho, o qual seria o transcrito do cDNA isolado anteriormente. Resultados preliminares da expressão da proteína ao longo do crescimento do fungo foram obtidos por Western blot. Apenas uma banda da proteína foi observada, a qual apresentou o tamanho aproximado de 40 kDa, próximo ao tamanho da proteína NcPHO85, deduzida a partir da següência do cDNA. Com a finalidade de avaliar o papel da proteína codificada pelo gene no metabolismo de glicogênio e em outras funções celulares no fungo N. crassa iniciamos a inativação do gene que codifica para a proteína. Esta inativação foi realizada por meio de duas metodologias: a de RIP (Repeat-Induced Point Mutation), na qual obtivemos um clone que provavelmente produz a proteína truncada; e por recombinação homóloga (gene replacement). O clone phorip foi avaliado quanto ao crescimento e comparado à linhagem selvagem apresentando uma taxa de crescimento bastante reduzida. A proteína NcPHO85 foi expressa em E. coli na forma recombinante, purificada e utilizada na produção de anticorpos em coelhos para serem utilizados nos experimentos de análise da expressão gênica por Western blot e para estudos futuros.

Palavras-chaves: *Neurospora crassa*, proteína quinase dependente de ciclina, metabolismo de glicogênio.

Abstract

In this study we performed the isolation of the cDNA and the gene that codes for the Pho85p-like protein from Saccharomyces cerevisiae in Neurospora crassa. A fragment of 1.1 kb corresponding to the nucleotide sequence of the gene from N. crassa was amplified by PCR and confirmed by DNA sequencing. This fragment was used to screen a N. crassa cDNA library resulting in a plasmid containing the ORF plus and the upstream and downstream regions. The insert from the plasmid was sequenced and the ORF showed to have 1014 bp, whereas the upstream and downstream regions had 304 bp and 561 bp, respectively. After sequencing the cDNA, the polypeptide sequence was compared to the same protein from mycelial fungi and yeasts. The isolated ORF was used to screen a N. crassa genomic library leading to the isolation of a plasmid containing the genomic sequence. After DNA sequencing the insert showed the presence of an intron (89 bp) starting at nucleotide 69. This result was in agreement with the information from the N. crassa database. Gene expression analysis during the vegetative growth in different media was performed by Northern blot. Two hybridization bands were observed in the experiments, one of 2.2 kb and another one of 2.7 kb. The maximum expression of both transcripts happened at 12 h of growth, this was more pronounced for the smaller transcript, which probably is the transcript of the isolated cDNA. Preliminary results of protein expression during vegetative growth were obtained by Western blot analysis. Only one band with approximately 40 kDa was observed, the expected size for the NcPHO85 protein sequence deduced from the cDNA sequence. In order to evaluate the role of this protein in glycogen metabolism and in other cellular functions in N. crassa we started the gene inactivation. The inactivation was performed by two methodologies: 1) RIP (Repeat Induced Point Mutation), which led to a clone producing a truncated protein, and 2) gene replacement. Cells of the pho^{rip} strain were tested for their growth capacity compared to the wild type strain, and the mutant strain had a reduced growth rate. The NcPHO85 recombinant protein was expressed in E. coli, purified and used to raise antibodies in rabbits that were used in the gene expression analysis by Western blot and may be used for further studies.

Keywords: *Neurospora crassa*, cyclin-dependent protein kinase, glycogen metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- **Figura 1 Ciclo de vida de** *Neurospora crassa.* Dependendo das condições ambientais 20 o micélio vegetativo pode entrar em processo de esporulação assexual de macroconidiação e microconidiação. Ou este micélio 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).
- Figura 2 Fosforilação da glicogênio sintase de diferentes organismos. Nove sítios 27 de fosforilação (P) são mostrados na enzima de músculo de coelho e as diferentes proteínas quinases que fosforilam estes sítios *in vitro. CaM-PK*, proteína quinase II dependente de calmodulina; *cGMP-PK*, proteína quinase dependente de GMP; *CK-I*, caseína quinase 1; *CK-II*, caseína quinase II; *GSK-3*, glicogênio sintase quinase 3; *MAPKAP quinase 2*, proteína quinase 2 ativada por mitógeno (ROACH, 1990).
- Figura 3 Interação da Pho85p com suas ciclinas parceiras. As ciclinas parceiras da 29 Cdk Pho85p divididas nas duas subfamílias e agrupadas conforme suas funções propostas incluem a manutenção da progressão do ciclo celular e a regulação do metabolismo de nutrientes como fosfato e fonte de carbono (CAROLL; O´SHEA, 2002).
- **Figura 4 Modelo do controle da síntese de enzimas envolvidas na aquisição de** 35 **fósforo.** As setas indicam a ativação do gene, e a reta cortada indica regulação negativa do gene (KANG; METZENBERG, 1993).
- Figura 5 Mapa físico do plasmídeo pYADE5.

42

42 42 42

- Figura 6 Mapa físico do plasmídeo pBARGEM7-2.
- Figura 7 Mapa físico do vetor pMSN-1.
- Figura 8 Estratégia para a substituição do gene de interesse pelo gene hph. (A) Representação da construção do vetor com o gene. A região upstream do gene de interesse foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos P-1 e P-2, e a região downstream com os oligonucleotídeos P-3 e P-4. O tamanho dos produtos é de 950 bp e 1050 bp, respectivamente. O gene hph foi amplificado a partir do vetor pCSN44 utilizando os oligonucleotídeos P-5 e P-6 e possui tamanho de aproximadamente 2,8 kb. Estes três fragmentos foram utilizados na PCR de fusão com os oligonucleotídeos P-1 e P-4. (B) Representação da integração homóloga do produto de PCR após transformação do fungo, processo que ocorre por um duplo crossing over (NINOMIYA et al. 2004).
- Figura 9 Mapa físico do vetor pET-28a (Novagen).
- Figura 10 Seqüência nucleotídica completa do fragmento de DNA isolado após excisão plasmidial pAD5-Ncpho85. A seqüência mostra a ORF que codifica a proteína semelhante a Pho85p de S. cerevisiae em N. crassa, a seqüência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência nucleotídica e as seqüências das regiões upstream e downstream à ORF. O provável sítio de poliadenilação está mostrado em negrito, os sítios de restrição EcoRI e Xhol utilizados na construção da biblioteca estão mostrados e os codons de iniciação (ATG) e término (TAG) estão mostrados em negrito.
- Figura 11 Alinhamento de seqüências de proteínas semelhantes a Pho85p de S. cerevisiae de diferentes organismos. O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW, e a identidade e similaridade foram determinadas por Boxshade. Os

aminoácidos idênticos estão em negro e as trocas conservativas estão representadas em cinza. As seqüências de aminoácidos correspondentes aos domínios rico em glicina (*), PSTAIRE (**) e T-loop (***) estão indicados.

- Figura 12 Eletroforese dos plasmídeos isolados da biblioteca genômica 72 λBARGEM7-2. A digestão foi realizada com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. Linha 1: marcador de peso molecular de DNA, 1kb *ladder*. Linhas 2 a 6: amostras dos diferentes DNAs plasmidiais. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5% em tampão TAE 1x.
- Figura 13 Seqüência nucleotídica completa do fragmento de DNA isolado após 74 excisão plasmidial pBARGEM-Ncpho85. A seqüência mostra a ORF que codifica a proteína semelhante a Pho85p de *S. cerevisiae* em *N. crassa*, o *intron* e as seqüências das regiões *upstream* e *downstream*. A região 5'-UTR contida na seqüência do cDNA inicia-se no <u>C</u>. Em destaque observamos os prováveis: TATA box (lilás), sítios CAP (azul), seqüência Kozak (verde), sítio de poliadenilação (grifado em amarelo), gene xnc086_110 (vermelho). O nucleotídeo A do códon de iniciação ATG foi considerado como o nucleotídeo +1.
- Figura 14 Análise da expressão do gene *Ncpho85* durante o crescimento em meio 76 VM através de *Northern blot*. Os números indicam os tempos de crescimento de: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h. (A) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 1,0 kb do cDNA; (B) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 350 bp correspondente à extremidade 3´ da ORF. As amostras de RNA foram fracionadas em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2%, transferidas para membrana de nylon neutra e hibridizadas nas condições descritas em Materiais e Métodos.
- Figura 15 Análise da expressão do gene *Ncpho85* durante o crescimento em meio 77 Fries através de *Northern blot*. Os números indicam os tempos de crescimento de: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h. (A) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 1,0 kb do cDNA; (B) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 350 bp correspondente à extremidade 3´ da ORF. As amostras de RNA foram fracionadas em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2%, transferidas para membrana de nylon neutra e hibridizadas nas condições descritas em Materiais e Métodos.
- Figura 16 Análise da expressão da proteína NcPHO85 durante o crescimento em meio VM por Western blot. Quantidades de 40 μg dos extratos protéicos correspondentes aos tempos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, foram aplicadas no gel SDS-PAGE 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e hibridizada com anticorpo anti-NcPHO85 (1:1000) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores de peso molecular (PM) estão indicados em kDa. As condições de hibridização e revelação da proteína estão descritas em Materiais e Métodos.
- **Figura 17 Southern blot dos clones após transformação.** DNA genômico de 13 81 clones foram digeridos e analisados para a apresença de duplas cópias do gene *Ncpho85*. Linha 1: pMSN1-*Ncpho85*, linha 2: linhagem selvagem, linhas 3 a 15: DNA dos clones transformantes. O DNA foi digerido com a enzima *Eco*RI, fracionado em gel de agarose 1% e transferido para membrana de nylon Hybond-N⁺ e hibridizado nas condições descritas em Materiais e Métodos.

- Figura 18 Seqüência nucleotídica e polipeptídica do gene *Ncpho85* do clone *pho^{rip}*. 83 Os nucleotídeos trocados (posições 12, 465, 497, 538) estão em negrito e sublinhados e o *stop codon* introduzido pela mutação está sublinhado e representado por asterisco.
- **Figura 19 Eletroforese dos fragmentos de DNA utilizados para a recombinação** 85 **homóloga.** (**A**) Fragmentos amplificados das regiões 5'- (950 bp) e 3'-UTR (1050 bp) do gene *Ncpho85* linhas 1 e 2, respectivamente. (**B**) Fragmento amplificado do gene *hph* de 2,8 kb. (**C**) Produto da PCR de fusão, contendo o fragmento de aproximadamente 5 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5% em tampão TAE 1x.
- **Figura 20 Avaliação do crescimento das linhagens mutante e selvagem em** *race* 86 *tubes.* Os dois tubos superiores mostram o crescimento da linhagem mutante *pho*^{rip} e os dois tubos inferiores mostram o crescimento da linhagem selvagem, ambos em meio VM a 25°C.
- **Figura 21 Crescimento das linhagens selvagem e mutante.** (A) Crescimento ⁸⁸ dalinhagem selvagem e da mutante em meio VM contendo sacarose 2% na temperatura de 25°C, (B) Crescimento em meio VM contendo sacarose 2% na temperatura de 37°C, (C) Crescimento em meio VM contendo sacarose 2% com adição de extrato de levedo 2% na temperatura de 25°C. O crescimento foi avaliado pela extensão das hifas aéreas em *race tubes.*
- **Figura 22 Análise da solubilidade da proteína His6-NcPHO85 recombinante** 89 **produzida em** *E. coli*. Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas dos sobrenadantes (S) e dos precipitados (P) nas quatro condições: 1- (0,1 mM de IPTG, 30°C); 2- (0,4 mM de IPTG, 30°C); 3- (0,1 mM de IPTG, 37°C) e 4- (0,4 mM de IPTG, 37°C). PM, peso molecular em kDa (Invitrogen). As condições de produção da proteína estão descritas em Materiais e Métodos.
- **Figura 23 Perfil cromatográfico da purificação da proteína recombinante NcPHO85** 91 **produzida em** *E. coli.* A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna cromatográfica de Ni²⁺ *HiTrap Chelating* (Amersham). A eluição foi realizada em gradiente de imidazol (0 a 500 mM). Frações de 4 mL foram coletadas durante a eluição.
- Figura 24 Análise das frações obtidas durante a purificação da proteína His6-92 NcPHO85 recombinante. Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações EB (extrato bruto), S (sobrenadante), P (precipitado), e FT (*flow-throught*), e das frações 1 a 10, após eluição. (A) Gel contendo EB, S, P, FT, e frações 1 a 5. (B) Gel com as frações 6 a 10. A seta indica a proteína recombinante com aproximadamente 38 kDa. PM, peso molecular em kDa (Invitrogen).
- Figura 25 Titulação do anticorpo anti-NcPHO85 produzido em coelho. Quantidades de 20 μg, por canaleta, da proteína recombinante foram fracionadas em gel SDS-PAGE 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e hibridizada com o anticorpo anti-NcPHO85, sendo que, as canelatas de 1 a 5 foram aplicadas amostras do soro pré-imune nas diluições 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000, respectivamente, e nas canaletas de 6 a 10 foi utilizado o soro após imunização, nas mesmas diluições. Posteriormente, a membrana foi hibridizada com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase. A seta indica a proteína recombinante com aproximadamente 38 kDa. As condições de hibridização e revelação da proteína estão descritas em Materiais e Métodos.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fostato

bp: pares de bases

C-terminal: região carboxi-terminal da proteína

Cdk: proteína quinase dependente de ciclina

cpm: cintilações por minuto DEPC: dietil pirocarbonato

DNA: ácido desoxiribonucléico

DTT: ditiotreitol EB: extrato bruto

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético FGSC: Fungal Genetics Stock Center

FT: flow through

GS: glicogênio sintase

IPTG: isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo

kb: kilobase kDa: kilodalton

MOPS: ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico

NBT: nitro blue tetrasolium

N-terminal: região amino terminal da proteína

ORF: Open Reading Frame

Pcls: Pho85 cyclins

PCR: Polimerase Chain Reaction

Pi: fosfato inorgânico PM: peso molecular

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil q.s.p.: quantidade suficiente para

RIP: Repeat Induced Point Mutation

RNA: ácido ribonucléico RNAm: RNA mensageiro

RNAse: ribonuclease pancreática A

rpm: rotações por minuto

SDS: dodecilsulfato de sódio

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

TAE: tampão Tris-acetato-EDTA

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

Tris: hidroximetilaminometano

UTR: Untranslated Region

V: volts

VM: Meio mínimo de Vogel

v/v: volume/volume

WT: wild type ou linhagem selvagem

w/v: weight/volume

μF: micro Faradays

 Ω : ohms

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	17		
I - O fungo Neurospora crassa como modelo de estudo	18		
II - Glicogênio. Enzimas envolvidas na síntese do carboidrato	22		
III - O sistema PHO e a proteína quinase dependente de ciclina Pho85p	28		
OBJETIVOS	37		
MATERIAIS E MÉTODOS	39		
I – Crescimento do fungo e linhagens utilizadas	40		
II – Bibliotecas de <i>Neurospora crassa</i>	40		
III – Isolamento da seqüência nucleotídica que codifica a proteína			
semelhante à Pho85p em <i>N. crassa</i>	41		
III.1. Isolamento do cDNA	41		
III.2. Isolamento da seqüência genômica	43		
1) Infecção de <i>E. coli</i> e isolamento das placas de lise	43		
2) Preparo da sonda radioativa e hibridização das membranas	43		
3) Excisão plasmidial	44		
IV – Análise da expressão do gene	46		
IV.1. Cultivo do fungo	46		
IV.2. Análise da expressão do gene por Northern blot	46		
IV.3. Análise da expressão da proteína por Western blot	48		
V – Inativação do gene que codifica a proteína quinase dependente de ciclina			
V.1. Inativação gênica mediada por RIP	49		
1) Construção do plasmídeo e transformação de N. crassa	50		
2) Cruzamento do fungo e coleta dos ascósporos	52		
3) Análise dos clones	53		
V.2. Inativação gênica por recombinação homóloga	53		
1) Amplificação por PCR	53		
2) Transformação de N. crassa e seleção dos clones	56		
VI – Análise do mutante obtido por RIP	56		
VII – Produção da proteína recombinante em <i>E. coli</i>	57		
VII.1. Subclonagem do cDNA no vetor pET-28a	57		
VII.2. Produção e purificação da proteína recombinante	57		
VIII - Produção de anticorpos contra a proteína de interesse em coelhos	60		

VIII.1. Imunização dos coelhos e titulação do soro	60		
IX – Métodos Moleculares			
IX.1. Mini extração de DNA plasmidial	61		
IX.2. Preparo e transformação de células competentes de E. coli	62		
IX.3. Extração de DNA genômico e análise por Southern blot	63		
IX.4. Sequenciamento de DNA	64		
RESULTADOS E DISCUSSÃO			
I – Isolamento do cDNA e do gene que codificam a proteína semelhante à			
Pho85p em <i>Neurospora crassa</i>			
II– Análise da expressão gênica			
II.1. Análise da expressão do gene por Northern blot	73		
II.2. Análise da expressão do gene por Western blot	78		
III – Inativação do gene <i>Ncpho85</i>			
III.1. Inativação gênica mediada por RIP	80		
III.2. Inativação gênica por recombinação homóloga	82		
IV - Análise do mutante obtido por RIP			
V - Produção da proteína NcPHO85 na forma recombinante em <i>E. coli</i>			
VI – Produção e análise de anticorpos contra a proteína NcPHO85			
CONCLUSÕES			
REFERÊNCIAS			

Introdução

I - O fungo Neurospora crassa como modelo de estudo

Os seres procariotos, como as bactérias *Escherichia coli* e *Salmonella*, e os eucariotos inferiores, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e os fungos filamentosos *Neurospora crassa* e *Aspergillus nidulans* surgiram como importantes modelos utilizados nos estudos em bioquímica e genética molecular (PERKINS; DAVIS, 2000). Dentre estes organismos os fungos permitem muitos estudos biotecnológicos, são utilizados na síntese de muitos compostos economicamente importantes como enzimas, metabólitos secundários, antibióticos e produtos farmacêuticos; também são muito utilizados como sistemas modelo em genética, visando uma melhor compreensão das funções dos genes humanos. Por se tratarem de seres eucariotos simples são facilmente cultivados e reproduzem-se rapidamente permitindo uma fácil manipulação destes organismos. Entre os fungos destaca-se *Neurospora crassa*, inicialmente estudado por ser um contaminante em padarias no século XIX quando era conhecido como o bolor rosa (ou alaranjado) do pão, pigmento este induzido por luz (PAYEN, 1843).

Em 1941 Beadle e Tatum utilizando *N. crassa* criaram mutantes com necessidades nutricionais específicas após irradiação com raios-x, este fungo inicialmente poderia ser cultivado em meios de cultura simples, porém os mutantes necessitavam suplementação vitamínica para crescerem. Estes pesquisadores determinaram a função dos genes nas reações do metabolismo e confirmaram a genética Mendeliana deste organismo. Estes estudos foram pioneiros e revolucionários nas análises genéticas a partir da metade do século XX, e as pesquisas com *Neurospora* continuaram a contribuir nas áreas de recombinação meiótica, organização metabólica, biogênese, função mitocondrial, biologia celular, heterocariose, desenvolvimento sexual fúngico e mecanismos cromossômicos (PERKINS; DAVIS, 2000).

O fungo *Neurospora* pertence à classe dos *Eumicetos*, sub-classe *Ascomicetos* sendo um *Euascomiceto*, à família *Sordariacea* e sub-família *Sphaeriales* (ESSER; KUENEN, 1967). É um fungo saprofítico e aeróbio estrito amplamente distribuído pela natureza sendo não patogênico aos seres humanos, animais e plantas. É facilmente cultivado e manipulado, capaz de crescer em meio de cultura contendo apenas uma fonte de carbono, sais minerais e uma vitamina essencial, a biotina. As fontes de carbono mais disponíveis para uso são os

monossacarídeos como glicose, manose, frutose, xilose, acetato, glicerol e succinato; já os dissacarídeos utilizados são sacarose, maltose, celobiose e trealose. Os sulfatos inorgânicos são boas fontes de enxofre, entretanto outros compostos como tiosulfato, metionina, taurina, ácido cistéico podem ser utilizados. Para a obtenção de fósforo deve-se utilizar sais fosfatados. Como fonte de nitrogênio utilizam-se íons nitrato, nitrito, uréia, amida, bases purinas e aminoácidos que disponibilizam a amônia. Os íons inorgânicos como potássio e magnésio devem ser adicionados, bem como os elementos traços e ferro. O fungo possui crescimento vegetativo ótimo na faixa de pH de 4,0 a 7,5, sendo ideal em 5,4 e em diversas temperaturas, sendo ideal entre 30 e 35°C (DAVIS; DE SERRES, 1970).

É um fungo filamentoso multicelular cujo crescimento vegetativo ocorre na forma de uma rede de hifas aéreas septadas que geram um micélio complexo. Estas hifas multinucleadas possuem septos com poros de 0,5 μm de diâmetro, os quais permitem a passagem de citoplasma e organelas citoplasmáticas, como mitocôndria, núcleo e outros corpos de inclusão, sempre em direção ao crescimento (DAVIS; DE SERRES, 1970). O crescimento das hifas ocorre pela extensão e ramificação da extremidade onde há uma maior divisão nuclear (DAVIS; DE SERRES, 1970), sendo um desenvolvimento polarizado. Quando ocorre a fusão de filamentos de hifas, chamada de anastomose, é originado o heterocário, onde diversos núcleos contribuem para o metabolismo de um único micélio. Portanto, o crescimento do fungo filamentoso consiste basicamente de três processos balanceados: extensão da extremidade da hifa, ramificação e fusão (GLASS; JACOBSON; SHIU, 2000).

N. crassa é heterotálico e apresenta dois diferentes mating types A e a. 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 (METZENBERG, 1979; RAJU, 1992; DAVIS; PERKINS, 2002). Em N. crassa a esporulação pode ocorrer por três vias diferentes levando a produção de três tipos dos esporos, dois assexuais (microconídio e macroconídio) e um sexual (ascósporos) (Figura 1). A produção dos esporos assexuais é realizada nas extremidades das hifas aéreas. Nestas há uma diferenciação celular que resulta em macroconidióforos, nestes há a união da parede celular gerando os artroconídios que posteriormente são liberados como macroconídios alaranjados em grande quantidade. A macroconidiação é controlada pelo ciclo circadiano, o qual é regulado pela exposição à luz. Os microconídios diferenciam-se a partir dos microconidióforos

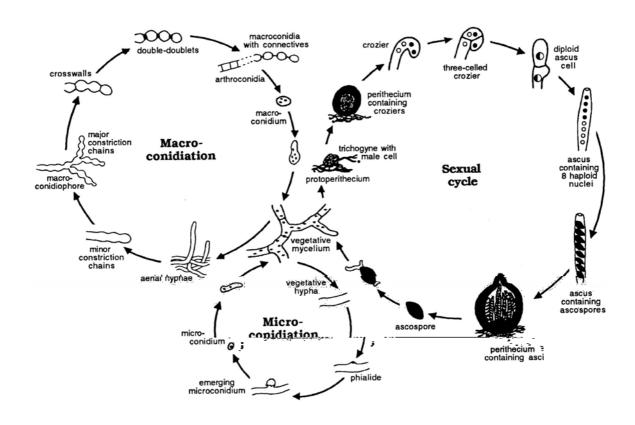


Figura 1 - Ciclo de vida de *Neurospora crassa***.** Dependendo das condições ambientais o micélio vegetativo pode entrar em processo de esporulação assexual de macroconidiação e microconidiação. Ou este micélio pode entrar no ciclo sexual pela formação do protoperitécio, o qual quando fertilizado pode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

ou diretamente a partir da hifa vegetativa, estes esporos são uninucleados, menores e leves (SPRINGER, 1993; BISTIS; PERKINS; READ, 2003).

A outra via de produção de esporos pelo N. crassa é sexual, a qual resulta na formação dos ascósporos pretos visíveis (DAVIS; DE SERRES, 1970, SPRINGER, 1993). Todas as linhagens podem atuar como fêmea ou como o parental fertilizador macho (PERKINS; DAVIS, 2000). Caso Neurospora seja inoculada em um meio sólido deficiente em certos componentes ou que contenha nitrato como única fonte de nitrogênio, uma hifa irá enrolar-se em uma forma especializada, o ascogônio, o qual é envolto em tecido de hifas estéreis. Esta estrutura feminina visível 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, o qual é um corpo de frutificação, que pode conter até 200 ascos e cada asco contém os quatro produtos de uma meiose. Em seguida ocorre uma mitose resultando em quatro pares de ascósporos haplóides e homocarióticos, sendo 2 pares de cada *mating type* (Figura 1).

O genoma do *N. crassa* foi recentemente sequenciado, o que vem contribuindo para as pesquisas na área de genética molecular deste fungo modelo. Seu genoma é de aproximadamente 40 Mb, sendo muito maior que os de *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* (GALAGAN *et al.*, 2003), e está dividido em 7 cromossomos com tamanhos de 4 a 10,3 Mb (SCHULTE *et al.*, 2002). Foram anotados 10.082 genes que codificam proteínas, quase duas vezes mais que os fungos citados anteriormente. Cerca de 41% das proteínas de *N. crassa* não possuem semelhança com proteínas conhecidas de bancos de dados, sendo que 57% das proteínas de *N. crassa* não são semelhantes às proteínas das leveduras sequenciadas (GALAGAN *et al.*, 2003). Em *N. crassa* há uma maior proporção de genes "órfãos" do que em *S. cerevisiae*, pois sua complexidade morfológica é um reflexo da aquisição ou manutenção de novos genes, resultando em um genoma maior que o da levedura (BRAUN *et al.*, 2000).

No genoma de *N. crassa* há poucos genes parálogos, poucos elementos repetitivos, e uma pequena quantidade de segmentos duplicados (MANNHAUPT *et*

al., 2003). Portanto há praticamente apenas uma cópia para a grande maioria dos genes (GALAGAN et al., 2003). Para manter a integridade e organização deste genoma existem mecanismos de silenciamento gênico que atuam nas fases sexual e vegetativa do ciclo de vida (SELKER, 1990). Um destes sistemas de defesa é um processo chamado de RIP (Repeat Induced Point Mutation) onde seqüências homólogas, ou duplicadas, de DNA são detectadas e inativadas na fase prémeiótica. O processo de RIP acontece quando os núcleos haplóides de mating type opostos dividem o mesmo citoplasma, antes da formação do zigoto diplóide (WATTERS et al., 1999). Nesta fase pré-meiótica são introduzidas severas mutações, por trocas G-C para A-T podendo haver metilação dos resíduos de citosina restantes, em ambas cópias da següência duplicada; portanto há mutação e silenciamento epigenético de DNA repetitivo. As sequências homólogas inativadas no RIP devem possuir identidade maior que 80% (CAMBARERI; SINGER; SELKER, 1991) e no mínimo 400 bp, o mesmo tamanho necessário para que ocorra a recombinação homóloga em mamíferos e leveduras, evidência que sugere que o pareamento de DNA seja substrato neste processo de RIP (SELKER, 1990; WATTERS et al., 1999). Este importante processo de defesa genômica suprime a criação de novos genes ou partes de genes por duplicação, exercendo grande impacto na evolução de novas funções gênicas (GALAGAN et al., 2003).

II - Glicogênio. Enzimas envolvidas na síntese do carboidrato

O glicogênio é um homopolissacarídeo constituído de apenas um tipo de unidade monomérica, a glicose, arranjado em cadeias altamente ramificadas, gerando uma molécula compacta. É acumulado nas células quando há nutrientes suficientes, sendo utilizado depois durante a carência nutricional, portanto sua função é de reserva energética para as células. É um carboidrato amplamente distribuído entre os organismos, desde bactérias até os seres humanos, e é armazenado na forma de grânulos de glicogênio. Este polímero é formado por unidades de glicose que são unidas por ligações glicosídicas do tipo ($\alpha 1 \rightarrow 4$) e com ligações ($\alpha 1 \rightarrow 6$) nas ramificações (LEHNINGER, 2000). O metabolismo de glicogênio foi extensivamente estudado na levedura *S. cerevisiae*, e neste organismo o glicogênio é acumulado durante a fase de diauxia do crescimento ou

em resposta à limitação de carbono, nitrogênio, enxofre ou fósforo, sendo este carboidrato de reserva hidrolisado na falta nutricional de carbono (JOHNSTON; CARLSON, 1992).

A biossíntese de glicogênio envolve as etapas de iniciação, elongamento e ramificação, e é dependente de três enzimas: a glicogênio sintase (EC 2.4.1.11), a enzima ramificadora (EC 2.4.1.18) e a glicogenina (EC 2.4.1.186). O início da síntese ocorre pela ação da enzima glicogenina que é capaz de se auto-glicosilar, via ligações 1-O-tirosil, inserindo uma molécula de glicose a partir do doador UDPglicose (SMYTHE et al., 1988), uma reação aumentada na presença de íons Mn²⁺ (WHELAN, 1986; LOMAKO; LOMAKO; WHELAN, 1988). Portanto, a produção de glicogenina na célula tem o potencial de ser o fator limitante na formação de glicogênio. Uma vez auto-glicosilada, com a glicogenina carregando uma cadeia α-1,4-glicosil de até 10 resíduos de glicose ligados covalentemente, tem início a ação da enzima glicogênio sintase responsável pela elongação da cadeia. A glicogênio sintase catalisa a transferência de unidades de glicose a partir do doador UDPglicose nos eucariotos e ADP-glicose em bactérias para a extremidade não redutora do polímero em crescimento, elongando a cadeia polissacarídica (LEHNINGER, 2000). Ambas enzimas, a glicogenina e a glicogênio sintase requerem UDP-glicose como nucleotídeo doador de glicose (LOMAKO; LOMAKO; WHELAN, 1988). Para completar a síntese é necessária a enzima ramificadora que produz ligações do tipo α-1,6-glicosídicas gerando pontos de ramificação a cada quatro resíduos de glicose em média. A partir da extremidade da cadeia linear ligada por ligações α -1,4glicosídicas, a enzima ramificadora remove segmentos oligossacarídicos de seis a sete resíduos de glicose, transferindo para uma glicose interna por uma ligação do tipo α-1,6-glicosídica. As moléculas de glicogênio maduras são extensivamente ramificadas e, portanto, podem ser armazenadas de forma compacta, em grande quantidade, sem ocorrer aumento na osmolaridade celular.

A enzima glicogenina foi inicialmente identificada em músculo de coelho, um estudo que envolveu a clonagem do cDNA, dedução da seqüência de aminoácidos da proteína e expressão desta em *E. coli*. Esta enzima mostrou ser capaz de se auto-glicosilar em um resíduo específico de tirosina (Tyr194) (CAO *et al.*, 1993), e recentemente esta preparação da enzima teve sua estrutura cristalográfica tri-

dimensional resolvida, confirmando a forma de dímero em solução (GIBBONS; ROACH; HURLEY, 2002).

Mais tarde, a mesma enzima foi identificada em *S. cerevisiae*, onde dois genes (*GLG1* e *GLG2*) foram descritos codificar duas proteínas (Glg1p e Glg2p), as quais estão associadas com o início da síntese de glicogênio (CHENG *et al.*, 1995). Deleções nestes genes, separadamente, aparentemente não interferem na capacidade celular de acumular glicogênio, porém uma deleção dupla torna a célula incapaz de sintetizar glicogênio apesar de níveis normais de glicogênio sintase (CHENG *et al.*, 1995). As proteínas Glg1p e Glg2p possuem 258 resíduos na região N-terminal conservados entre as espécies, os quais apresentam o domínio de transferência de glicose, além de uma região na extremidade C-terminal conservada entre elas (CHENG *et al.*, 1995). Estas possuem mais de um resíduo de tirosina os quais são sítios de glicosilação essenciais, na Glg2p são os resíduos Tyr230 e Tyr232, e na Glg1p os sítios de glicosilação são Tyr232 e Tyr600. A Glg2p glicosilada requer o resíduo Tyr367 para elongar a cadeia através da glicogênio sintase (MU; CHENG; ROACH, 1996).

O cDNA que codifica a enzima glicogenina de *N. crassa* foi isolado (*gnn*), caracterizado, e a proteína recombinante (GNN) foi expressa em *E. coli*. Esta proteína mostrou possuir atividade de auto e trans-glicosilação além da capacidade de ser substrato para a enzima glicogênio sintase (DE PAULA *et al.*, 2005a). A glicogenina recombinante mostrou ser sensível à proteólise na extremidade C-terminal, e uma isoforma estável de aproximadamente 300 aminoácidos foi responsável pela manutenção das atividades catalíticas da enzima. A proteína GNN foi capaz de recuperar o fenótipo de acúmulo de glicogênio em uma linhagem mutante de *S. cerevisiae* contendo os genes *GLG1* e *GLG2* deletados (DE PAULA *et al.*, 2005a). Em outro trabalho, de Paula *et al.* (2005b) identificaram, por espectroscopia de massa, a presença de cadeias oligossacarídicas ligadas aos resíduos Tyr196 e Tyr198 da glicogenina recombinante, confirmando a participação destes resíduos de aminoácidos na auto-glicosilação (DE PAULA *et al.*, 2005b).

Um estudo recente (TORIJA *et al.*, 2005) mudou o conceito sobre o início da síntese de glicogênio, pois foram obtidas células mutantes *glg1glg2* da levedura *S. cerevisiae*, as quais foram capazes de produzir glicogênio apesar de não produzirem glicogenina. Este fenótipo foi aumentado na presença da glicogênio sintase

hiperativa ou após a deleção do gene *TPS1* (trealose-6-fosfato sintase), porém em ambos os casos o fenótipo foi reversível.

A enzima glicogênio sintase é regulada através de alosterismo pelo ativador ou modulador alostérico glicose-6-fosfato, e por modificação covalente através de reações de fosforilação reversíveis (FRIEDMAN; LARNER, 1963). Esta enzima existe sob duas formas: a desfosforilada e ativa (forma a) e a fosforilada e pouco ativa (forma b). A forma pouca ativa é dependente de glicose-6-fosfato, o ativador alostérico desta enzima, sendo que esta forma fosforilada somente possui atividade completa na presença deste modulador. A forma desfosforilada apresenta-se completamente ativa e pouco dependente de glicose-6-fosfato, podendo ser estimulada pela presença de Mg²⁺ (ROSELL-PEREZ; VILLAR-PALASI; LARNER, 1962). A razão entre a atividade da enzima na ausência de glicose-6-fosfato e aquela na presença do modulador (-/+ glicose-6-fosfato) são utilizadas como índice cinético do grau de fosforilação da enzima (FRANÇOIS; HERS, 1988). Portanto, os eventos de fosforilação exercem grande impacto nas propriedades cinéticas da glicogênio sintase. Ao analisar as enzimas glicogênio sintase de diversos organismos concluiu-se que estas possuem uma alta similaridade nas suas següências polipeptídicas, além da presença dos múltiplos sítios de fosforilação, os quais são substratos para diversas proteínas quinases (ROACH, 1991).

Do ponto de vista regulatório, as enzimas glicogênio sintase melhor estudadas são as de mamíferos e uma das isoformas da levedura *S. cerevisiae*. Em mamíferos vários cDNAs foram isolados incluindo de músculo e fígado humanos, músculos de coelho e rato, etc., e em microrganismos, os cDNAs de *Dictiostelium discoideum* (WILLIAMSON et al., 1996), de *Neurospora crassa* (DE PAULA et al., 2002) assim como os genes *GSY1* e *GSY2* de *S. cerevisiae* (FARKAS et al., 1990, 1991) foram isolados nas últimas décadas. Com o advento da era genômica, vários genes que codificam a enzima em bactérias e eucariotos inferiores estão disponíveis nos bancos de dados. O alinhamento dessas proteínas demonstrou que, de um modo geral, existe uma região central conservada. As regiões amino- e carboxiterminais são as regiões mais variáveis e as que estão envolvidas no controle por fosforilação (PEDERSON et al., 2000).

Em *N. crassa* existe apenas um gene (*gsn*) codificando a enzima glicogênio sintase (GSN), o qual possui 66% e 67% de identidade com as proteínas Gsy1p e

Gsy2p de *S. cerevisiae*, respectivamente, e 56% e 58% de identidade com a sintases de músculo de coelho e de músculo humano, respectivamente.

A enzima glicogênio sintase, de uma maneira geral, possui múltiplos sítios de fosforilação, os quais são substratos para diversas proteínas quinases. A Figura 2 mostra um esquema dos sítios de fosforilação das enzimas de músculo, fígado e da isoforma Gsy2p de S. cerevisiae, assim como as proteínas quinases envolvidas no controle por fosforilação da enzima de músculo. A glicogênio sintase de músculo de coelho foi muito bem caracterizada e mostrou possuir pelo menos nove resíduos de serina que são sítios de fosforilação, localizados nas regiões N- e C-terminais da cadeia polipeptídica (ROACH, 1990). Através de mutagênese sítio dirigida, substituindo Ser→Ala, foi identificado que os sítios 2 (Ser7), 2a (Ser10), 3a (Ser640) e 3b (Ser644) são os mais importantes na regulação da atividade da enzima neste tecido (SKURAT; WANG; ROACH, 1994). Existe um mecanismo regulatório interessante nesta enzima, conhecido como fosforilação hierárquica, na qual a fosforilação de um determinado sítio depende da fosforilação de um sítio anterior (ROACH, 1991), portanto a fosforilação de um resíduo de aminoácido é importante para o reconhecimento por outra proteína quinase (ROACH, 1990). Por exemplo, na região N-terminal o sítio 2 pode ser fosforilado in vitro pelas proteínas quinases: dependente de AMP-cíclico, fosforilase quinase e ativada por AMP; já o sítio 2a é fosforilado pela caseína quinase I após fosforilação do sítio 2 conforme mecanismo de fosforilação hierárquica (FLOTOW; ROACH, 1989). Os outros dois sítios de maior importância, os sítios 3a e 3b, também podem ser fosforilados por mecanismo de hierarquia envolvendo caseína quinase II e GSK-3, pois a GSK-3 só consegue modificar o sítio 3b após a caseína quinase II modificar o sítio 5 (ROACH; DEPAOLI-ROACH; LARNER, 1978; PICTON et al., 1982; FIOL et al., 1987).

As duas isoformas Gsy1p e Gsy2p de *S. cerevisiae* possuem três sítios de fosforilação na região C-terminal (FARKAS *et al.*, 1990; FARKAS *et al.*, 1991). A fosforilação *in vivo* destes sítios foi confirmada para a proteína Gsy2p, a isoforma predominante na levedura, sendo estes sítios os resíduos Ser650, Ser654 e Thr667 (HARDY; ROACH, 1993). Dois destes resíduos Ser654 e Thr667 são fosforilados pelo complexo quinase PCL10-PHO85 que fosforila e, portanto inativa, a enzima Gsy2p (HUANG *et al.*, 1998). Este complexo é formado pela proteína quinase dependente de ciclina Pho85p associada a ciclina Pcl10p. Na enzima de *N. crassa* os resíduos de aminoácidos correspondentes aos sítios 3a, 3b, 4 e 5 da

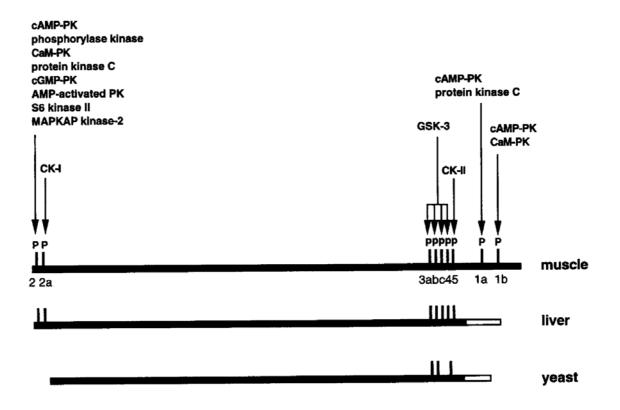


Figura 2 - Fosforilação da glicogênio sintase de diferentes organismos. Nove sítios de fosforilação (P) são mostrados na enzima de músculo de coelho e as diferentes proteínas quinases que fosforilam estes sítios *in vitro. CaM-PK*, proteína quinase II dependente de calmodulina; *cGMP-PK*, proteína quinase dependente de GMP; *CK-I*, caseína quinase 1; *CK-II*, caseína quinase II; *GSK-3*, glicogênio sintase quinase 3; *MAPKAP quinase* 2, proteína quinase 2 ativada por mitógeno (ROACH, 1990).

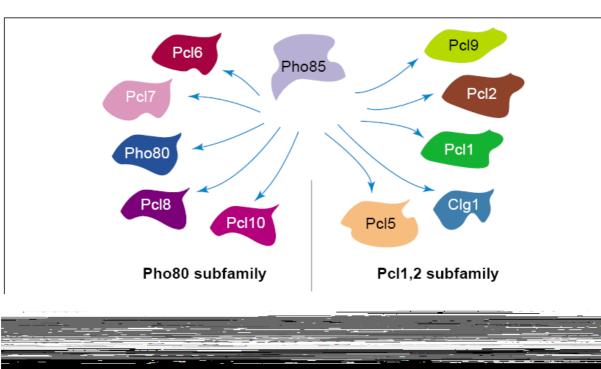
enzima de músculo de coelho são conservados, embora os resíduos nas posições 4 e 5 da proteína do fungo correspondam a resíduos de treonina, ao invés de serina. Assim como a enzima de *S. cerevisiae*, os resíduos correspondentes aos sítios 1, 1a, 2, 2a e 3c, estão ausentes na enzima de *N. crassa* (DE PAULA *et al.*, 2002). Os sítios de fosforilação na enzima de *N. crassa* ainda não foram identificados e são, atualmente, objeto de investigação. Resultados preliminares indicaram que o mecanismo de fosforilação envolve a ação, direta ou indireta, da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (DE PAULA, 2004).

III - O sistema *PHO* e a proteína quinase dependente de ciclina Pho85p

Em *S. cerevisiae* a expressão de genes *PHO* por fosfato inorgânico (Pi) é regulada por proteínas atuando em um mecanismo regulatório global, em cascata, constituído por eventos positivos e negativos. O sistema *PHO* é utilizado como modelo da regulação da expressão gênica (OSHIMA, 1982). Neste sistema de regulação atuam as proteínas quinases dependentes de ciclinas (Cdks), as quais são enzimas hetero-diméricas que contém uma subunidade catalítica com propriedade quinase associada a uma ciclina parceira regulatória (MORGAN, 1997).

Uma Cdk importante é a Pho85p uma proteína versátil que possui múltiplas funções conforme sua interação com as diversas ciclinas parceiras, chamadas de *Pho85 cyclins* (*Pcls*). As ciclinas parceiras foram inicialmente identificadas por homologia de seqüência e ensaios de duplo-híbrido, sendo agrupadas em duas subfamílias com cinco membros cada: a subfamília Pcl1,2 composta pelas ciclinas Pcl1p, Pcl2p, Pcl5p, Pcl9p, Clg1p; e a subfamília Pho80 composta pelas ciclinas Pho80p, Pcl6p, Pcl7p, Pcl8p, Pcl10p (MEASDAY *et al.*, 1997). As respostas celulares mediadas pela Pho85p incluem a manutenção da progressão do ciclo celular e a regulação do metabolismo de nutrientes como fosfato, fonte de carbono e nitrogênio. Na Figura 3 estão representadas as *Pcls* divididas nas duas subfamílias conforme suas funções conhecidas até o momento (CARROLL; O´SHEA, 2002).

A proteína quinase Pho85 de *S. cerevisiae*, a proteína melhor estudada até o momento, possui 302 resíduos de aminoácidos e é não essencial para o crescimento celular (UESONO; TANAKA; TOH-E, 1987). Esta proteína foi inicialmente caracterizada por possuir homologia à Cdk CDC28 (TOH-E *et al.*, 1988),



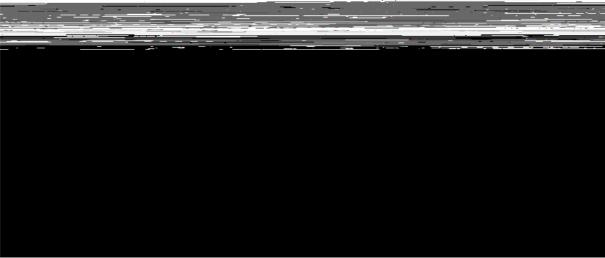


Figura 3 - Interação da Pho85p com suas ciclinas parceiras. As ciclinas parceiras da Cdk Pho85p divididas nas duas subfamílias e agrupadas conforme suas funções propostas incluem a manutenção da progressão do ciclo celular e a regulação do metabolismo de nutrientes como fosfato e fonte de carbono (CARROLL; O´SHEA, 2002).

a qual é uma Cdk de uma família altamente conservada cujos membros estão envolvidos na progressão do ciclo celular em todos os eucariotos (NASMYTH, 1993).

A homologia entre as Cdks Cdc28 e Pho85p deve-se principalmente ao fato de ambas possuírem o *motif* PSTAIRE (aminoácidos EGTPSTAIREISLMKE) que é altamente conservado entre as Cdks (MORGAN, 1997) e é localizado próximo à região N-terminal (ESPINOZA *et al.*, 1994). A seqüência é importante na função da proteína, especialmente o aminoácido Glu (em negrito) envolvido na ligação das ciclinas (pelo menos Pho80p e Pcl1p). Outros dois domínios estão presentes na Pho85p, são eles um domínio rico em glicina (aminoácidos 14-GNGTYATVY-22 na proteína de *S. cerevisiae*) e o T-*loop* (aminoácidos 163-NTFSSE-168 na proteína de *S. cerevisiae*). Foi observado também que a fosforilação da Tyr18 na proteína de *S. cerevisiae* é importante para a atividade da mesma, funcionando como um sinal na discrimição entre as ciclinas. Os resíduos de aminoácidos do domínio T-*loop*, importantes na função de outras Cdks não são importantes na Pho85p (NISHIZAWA *et al.*, 1999).

Algumas informações contrárias são encontradas na literatura. Santos *et al.* (1995) descreveram que na Pho85p a fosforilação da Ser166 do domínio T-*loop* era necessária para a atividade quinase. Entretanto, o complexo das proteínas Pho85p e Pcl10p recombinantes produzidas em *E. coli* foi capaz de fosforilar *in vitro* a enzima Gsy2p de *S. cerevisiae*, indicando que a Pho85p apresentou atividade no estado não fosforilado. A ausência de fosforilação no resíduo Ser166 foi confirmada por espectrometria de massas dos fragmentos trípticos da proteína (WILSON; MAHRENHOLZ; ROACH, 1999).

Santos et al. (1995) realizaram um extensivo estudo sobre a relação da estrutura com a função na Pho85p, através da produção de proteínas híbridas entre as proteínas Pho85p e a Cdc28 e análises funcionais das proteínas recombinantes em *S. cerevisiae*. Foi possível identificar uma região de aproximadamente 100 aminoácidos na extremidade C-terminal, essencial para a função e especificidade da proteína de *S. cerevisiae*. Dentro desta região duas subregiões foram importantes para a função, a subregião 1, dos resíduos de 155 a 177 (incluindo a Ser166, citada acima), e a subregião 2, os resíduos de 239 a 254. Os resíduos que provavelmente estariam envolvidos nas ligações às ciclinas compreendem os aminoácidos de 36 a 41 e de 124 a 132, sendo estas regiões importantes para a transferência de fosfato e ligação do ATP, respectivamente (SANTOS et al., 1995).

Devido às interações com as diversas ciclinas parceiras a Pho85p pode estar envolvida tanto no controle do ciclo celular quanto no metabolismo, e sua especificidade pelo substrato é determinada pela sua associação com uma determinada ciclina. É uma proteína com múltiplas funções, uma vez que a sua deleção leva a efeitos celulares de natureza múltipla (CARROL; O´SHEA, 2002).

O complexo formado pela proteína Pho85 e a ciclina Pho80p é conhecido por atuar no mecanismo regulatório das respostas da levedura S. cerevisiae a necessidade de fosfato (TOH-E et al., 1988; KAFFMAN et al., 1994). Dependendo dos níveis de fosfato, o inibidor de ciclina Pho81 regula a atividade guinase do complexo PHO80-PHO85 (HIRST et al., 1994; SCHNEIDER; SMITH; O'SHEA, 1994). Quando há altos níveis de fosfato o complexo quinase PHO80-PHO85 está ativo e atua inibindo por fosforilação a função do fator de transcrição Pho4p (KAFFMAN et al., 1994). A fosforilação de Pho4p impede sua associação com o fator de transcrição Pho2p e regula negativamente o gene PHO5, com isso não há ativação dos genes responsivos à diminuição de fosfato (HIRST et al., 1994). O gene PHO5 codifica uma fosfatase ácida cuja transcrição é regulada em resposta aos níveis de fosfato extracelular e requer os fatores de transcrição Pho4p e Pho2p (OSHIMA, 1982). Entretanto, quando há uma limitação de fosfato, o complexo PHO80-PHO85 dissocia-se de Pho4p por ação do inibidor Pho81, com isso Pho4p torna-se ativo e promove a transcrição dos genes responsivos a fosfato mantendo o balanço nutricional da célula (HIRST et al., 1994; SCHNEIDER; SMITH; O'SHEA, 1994). Conforme o estado nutricional da célula, a Pho4p tem sua localização celular alterada, concentrando-se no núcleo quando Pho4p está desfoforilada e há carência de fosfato, ou localizando-se no citoplasma quando a célula está em meio rico em fosfato (O'NEIL et al., 1996).

Recentemente foi descoberto que Pho85p fosforila a ciclina Pho80 em dois resíduos de serina, Ser234 e Ser267, e provavelmente a fosforilação do primeiro é pré-requisito para a do segundo e, este evento é necessário para manter a expressão de *PHO5* reprimida (WATERS *et al.*, 2004).

As ciclinas Pcl8p e Pcl10p foram inicialmente mostradas interagir com a Pho85p e torná-la específica para agir no metabolismo do glicogênio em *S. cerevisiae*, caracterizando o envolvimento da proteína quinase no metabolismo deste carboidrato de reserva. Foi observado que quando havia a deleção do gene *PHO85* nesta levedura havia também um hiperacúmulo de glicogênio (TIMBLIN; TATCHELL;

BERGMAN, 1996). Mais tarde foi demonstrado que o complexo quinase PCL10-PHO85 interage e fosforila a enzima glicogênio sintase 2 (Gsy2p), como descrito anteriormente (HUANG et al., 1998). A deleção destas duas ciclinas bem como do gene *PHO85*, levaram ao mesmo fenótipo de hiperacúmulo de glicogênio, assim como, a uma hiperativação da enzima Gsy2p (HUANG et al., 1998; WILSON; MAHRENHLOZ; ROACH, 1999). Um trabalho recente mostrou que as ciclinas Pcl6p e Pcl7p também estão envolvidas no metabolismo de glicogênio (WILSON; WANG; ROACH, 2005).

Linhagens da levedura *S. cerevisiae* deletadas para o gene *PHO85* (*pho85*△) são viáveis, mas crescem lentamente em relação à selvagem, porém são capazes de completar o ciclo celular (UESONO; TANAKA; TOH-E, 1987; TOH-E et al., 1988). Estas células apresentam alterações, tais como: 1) lento crescimento em meios ricos contendo glicose como fonte de carbono; 2) não crescem em meios com fontes de carbono como galactose, glicerol e lactato, o que é indicativo de defeito mitocondrial; (TIMBLIN; TATCHELL; BERGMAN, 1996); 3) inabilidade dos diplóides homozigotos para a deleção em esporular; 4) morfologia alterada (células maiores) (MEASDAY et al., 1997); 5) hiperacúmulo de glicogênio em meio rico em fosfato; 6) expressão constitutiva da glicogênio sintase GSY2 (TIMBLIN; TATCHELL; BERGMAN, 1996; TIMBLIN; BERGMAN, 1997); 7) expressão constitutiva da fosfatase ácida PHO5 (UEDA; TOH-E; OSHIMA, 1975; TOH-E et al., 1988); 8) sensibilidade a estresses ambientais (HUANG; MOFFAT; ANDREWS, 2002); 9) expressão constitutiva da UDP-glicose fosforilase (NISHIZAWA et al., 2001); 10) ativação dos genes ESR (Environmental Stress Response genes) (CARROLL et al., 2001); 11) repressão de genes envolvidos na biogênese de ribossomos; 12) indução de genes envolvidos na gliconeogênese e no ciclo do glioxilato (NISHIZAWA et al., 2004).

A linhagem *pho85*∆ apresenta hiperacúmulo de glicogênio como resultado do aumento na expressão de *GSY2* e diminuição na fosforilação de Gsy2p, conseqüentemente, há uma alta atividade Gsy2p, resultando neste fenótipo (HUANG; FARKAS; ROACH, 1996; TIMBLIN; TATCHELL; BERGMAN, 1996). Entretanto, este fenótipo foi mais evidente quando as células foram crescidas em meio rico do que em meio sintético (WANG *et al.*, 2001a). Células haplóides deste mesmo mutante são maiores que as selvagens, com vacúolo proeminente, porém as

anormalidades são mais evidentes no mutante diplóide *pho85∆/pho85∆* (MEASDAY *et al.*, 1997).

Além de estar presente na levedura, a Pho85p também apresenta homólogos em outros fungos extensivamente estudados na genética molecular moderna. Exemplos destes fungos incluem *Aspergillus nidulans*, *Sporothrix schenkii*, e finalmente em *Neurospora crassa*, o qual foi utilizado em nossos estudos.

No fungo filamentoso Aspergillus nidulans foram identificadas duas proteínas quinases dependentes de ciclina que continham o motif PSTAIRE, mas apenas um gene, o phoA foi inicialmente identificado. Este gene mostrou ser homólogo ao gene PHO85 de S. cerevisiae, e as proteínas codificadas por estes possuem 66,3% de identidade entre elas. As duas proteínas codificadas foram nomeadas PHOA^{M47} e PHOA^{M1}, esta segunda seria a mesma proteína, codificada pelo mesmo gene, mas com outro sítio de início de transcrição (BUSSINK; OSMANI, 1998). Entretanto, neste organismo, phoA não é necessário para a regulação da expressão dos genes de resposta a deprivação de fosfato, e sim para integrar as condições ambientais com o desenvolvimento sexual permitindo a diferenciação de tipos celulares sexuais ou assexuais sob diversas condições de crescimento (BUSSINK; OSMANI, 1998). Então PHOA modula a diferenciação celular e pigmentação especificamente em resposta ao ambiente, incluindo limitação de fosfato. Portanto, ambos phoA e PHO85 mediam respostas conforme a concentração de fosfato, porém PHO85 funciona em altos níveis e phoA em baixos níveis de fosfato, além de controlarem processos celulares diferentes (BUSSINK; OSMANI, 1998).

Anos depois, outra Cdk, a PHOB foi identificada neste mesmo fungo, a qual possui 77% de identidade com a PHOA e 68% com Pho85p de *S. cerevisiae* (DOU *et al.*, 2003). Mutantes duplos phoA/phoB foram construídos, seus ascósporos foram capazes de germinar, mas sua capacidade de divisão nuclear era limitada, indicando defeito no ciclo celular, além da germinação muito longa que mostrou os defeitos morfológicos (DOU *et al.*, 2003). Portanto estas duas Cdks estão envolvidas no controle do ciclo celular, na divisão nuclear, crescimento celular, morfogênese e respondem às condições ambientais extracelulares, mas estas quinases possuem funções redundantes (DOU *et al.*, 2003). A análise deste mutante indicou que as proteínas PHOA e PHOB são essenciais para o fungo *A. nidulans*, ao contrário da proteína Pho85 que não é essencial para *S. cerevisiae*.

Outro gene homólogo ao gene *PHO85* foi identificado no fungo *Sporothrix schenkii*, um fungo dimórfico. Neste organismo foram identificadas três proteínas que contêm o *motif* PSTAIRE, as quais estão presentes em ambas fases leveduriforme e miceliar, portanto há mais de uma Cdk presente. Uma destas foi identificada como uma proteína semelhante à Pho85p de *S. cerevisiae*, a qual é codificada pelo gene *phoSs* que codifica uma proteína de 36 kDa. Os domínios rico em glicina, PSTAIRE e T-*loop* foram identificados na seqüência da proteína (JESÚS-BERRÍOS; RODRÍGUEZ-DEL VALLE, 2002).

No fungo N. crassa quando há carência de fosfato ocorre a síntese de diversas enzimas envolvidas na aquisição de fosfato (HASUNNUMA, 1973; LOWENDORF; SLAYMAN, 1975). O sistema regulatório para a síntese destas enzimas inclui quatro genes: nuc-2⁺, preg⁺, pgov⁺, nuc-1⁺. O gene nuc-1⁺ codifica o ativador transcricional NUC-1, o qual controla a transcrição dos genes que codificam enzimas envolvidas na aquisição de fosfato, e a atividade de NUC-1 é regulada negativamente por PREG e PGOV (KANG; METZENBERG, 1990). Estas proteínas são ortólogas às proteínas Pho de S. cerevisiae. Os produtos de preg⁺ e pgov⁺ antagonizam a ação de NUC-1, e mutações nestes genes levou a uma expressão constitutiva das enzimas envolvidas na aquisição de fosfato. O produto de nuc-2⁺ inibe a função de preg⁺ e pgov⁺, e fosfato também se opõe a ação de nuc-2⁺. Na Figura 4 verificamos a integração das ações destes genes envolvidos na aquisição de fosfato (KANG; METZENBERG, 1990). O domínio regulatório de NUC-1 apresenta homologia ao fator de transcrição Pho4p de S. cerevisiae (KANG; METZENBERG, 1990; PELEG; METZENBERG, 1994). O gene preg⁺ mostrou não ser regulado por fosfato, e a proteína PREG é homóloga à ciclina Pho80p de S. cerevisiae. PREG interage com o domínio regulatório de NUC-1 e as funções de PREG e de Pho80p são análogas (KANG; METZENBERG, 1993). Possivelmente o ortólogo da proteína Pho85p seja PGOV em N. crassa (PELEG et al., 1996).

No banco de dados de *N. crassa* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html) uma proteína hipotética semelhante a Pho85p foi anotada (NCU01747.3), a qual possui 1246 resíduos de aminoácidos. Esta proteína apresenta um *motif* anquirina, o qual está presente na proteína Pho81 de *S. cerevisiae*, um inibidor do complexo PHO80-PHO85. Como a proteína Pho81 apresenta um alto peso molecular (134 kDa),

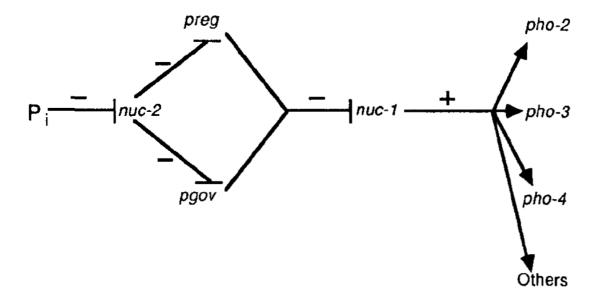


Figura 4 - Modelo do controle da síntese de enzimas envolvidas na aquisição de fósforo. As setas indicam a ativação do gene, e a reta cortada indica regulação negativa do gene (KANG; METZENBERG, 1993).

é possível que a proteína anotada seja homóloga a Pho81. Além disso, ao compararmos a seqüência polipeptídica da proteína anotada com a seqüência da proteína Pho85p de *S. cerevisiae* não há homologia entre elas. Portanto, provavelmente a proteína anotada no genoma de *N. crassa* não corresponde à proteína semelhante a Pho85p.

A disponibilidade do genoma de *N. crassa* (GALAGAN *et al.*, 2003) torna possível o isolamento da proteína semelhante à Pho85p em *N. crassa* e uma investigação mais detalhada do envolvimento da mesma no metabolismo de glicogênio. A partir das informações obtidas no banco de dados disponível no endereço http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html, e a seqüência nucleotídica do gene que codifica a proteína de levedura, oligonucleotídeos foram desenhados e utilizados para amplificar a seqüência nucleotídica que codifica esta proteína no fungo *N. crassa*. Um fragmento de DNA (aproximadamente 1,1 kb) foi isolado a partir de DNA genômico, e após sequenciamento confirmou codificar uma seqüência polipeptídica semelhante à Pho85p. Este fragmento de DNA foi utilizado como uma ferramenta para o presente trabalho.

Objetivos

De uma maneira geral, o principal objetivo do trabalho foi isolar, de *N. crassa*, o cDNA que codifica a proteína semelhante à Pho85p de *S. cerevisiae* e estudar o papel da proteína no metabolismo de glicogênio e nas funções celulares deste fungo.

Especificamente, os objetivos desde trabalho foram:

- Clonagem do cDNA que codifica a proteína quinase semelhante à Pho85p em *N. crassa*;
- Análise da proteína codificada pelo gene, através da seqüência polipeptídica deduzida e pela proteína recombinante produzida;
- Construção de uma linhagem contendo o gene inativo, para posteriormente avaliar o papel da proteína codificada pelo gene no metabolismo de glicogênio e em outras funções celulares no fungo *N. crassa*.

Materiais e Métodos

I – Crescimento do fungo e linhagens utilizadas

O fungo *Neurospora crassa* foi cultivado em meio mínimo de Vogel (Vogel, 1956). O meio sólido foi preparado contendo ágar 2% e o cultivo realizado em garrafas de vidro com 50 mL de meio a 30°C, no escuro, por 2 a 3 dias, e em seguida exposto à luz por 7 a 10 dias. Conídios foram coletados com água ultra-pura estéril e filtrados em gaze estéril e cultivados em meio mínimo de Vogel e em meio Fries (FRIES, 1938) líquidos, um meio pobre em fosfato.

As linhagens do fungo utilizadas durante os experimentos foram adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, MO, USA): FGSC 424 (A), FGSC 2226 (a), FGSC 3957 (A, *aro-9, qa-2*) e FGSC 9781 (a, Δ*mus-51::bar*). Meio mínimo de Vogel (VM): sais de Vogel 1 x, sacarose 2%.

Sais de Vogel 50 x: citrato de sódio 0,5 M; KH_2PO_4 1,85 M; NH_4NO_3 1,25 M; $MgSO_4.7H_2O$ 0,08 M; $CaCl_2.2H_2O$ 0,03 M; 5 mL de solução de biotina 0,05 mg/mL em etanol 50%; 5 mL de solução de elementos traços; água ultra-pura q.s.p. 1 L. Adicionar 300 μ L de clorofórmio como agente conservante. Armazenar a 4 $^{\circ}$ C.

Meio Fries 2x: tartarato de amônio 10 g, $(NH_4)H_2PO_4$ 2 g, KNO_3 2 g, KH_2PO_4 2 g, $MgSO_4.7H_2O$ 1 g, NaCl 0,2 g, $CaCl_2.2H_2O$ 0,2 g, 200 μL solução de elementos traços, 100 μL de solução de biotina a 0,1 mg/mL, água ultra-pura q.s.p. 1 L. Adicionar 2 mL de clorofórmio como agente conservante. Armazenar a 4 $^{\circ}C$.

Solução de elementos traços: MgSO₄.7H₂O 0,8 M; ácido cítrico.H₂O 0,5 M; ZnSO₄.7H₂O 0,4 M; Fe(NH₄)₂(SO₄)₆.6.H₂O 0,05 M; CuSO₄.5H₂O 0,02 M; MnSO₄.H₂O 0,006 M; H₃BO₃ 0,02 M; NaMoO₄.2H₂O 0,004 M.

II - Bibliotecas de Neurospora crassa

Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas bibliotecas de *Neurospora crassa*, uma de cDNA e uma genômica ambas adquiridas junto ao FGSC. A biblioteca de cDNA (λAD5-NC) foi construída em bacteriófago λ e permite a excisão dos insertos na forma de plasmídeo, através do sistema de recombinação *cre/lox* (BRUNELLI; PALL, 1993). O plasmídeo resultante da excisão possui a origem de replicação do plasmídeo 2μ de levedura, uma origem de replicação de

Escherichia coli (plasmídeo shuttle), a marca de resistência a ampicilina e uma seqüência polylinker, semelhante àquela existente no sistema λZAP KS/SK (Stratagene). O vetor pAD5-NC possui TRP1 como marca de seleção em leveduras e o promotor ADH2. A biblioteca plasmidial resultante da excisão foi obtida através da infecção de linhagem de E. coli BNN132 e plaqueamento em meio seletivo. O mapa físico do vetor está representado na Figura 5.

A biblioteca genômica de *N. crassa*, construída no vetor λBARGEM7-2 também permite a excisão do plasmídeo pBARGEM7-2, através do sistema de excisão plasmidial *cre/lox* (PALL; BRUNELLI, 1994). O plasmídeo carrega o gene *bar* como marca de seleção (glufosinato de amônia), uma região de clonagem múltipla, os promotores T7 e SP6 da RNA polimerase, o gene de resistência a ampicilina e a origem de replicação *ori*, para seleção e crescimento em *E. coli*, respectivamente. O mapa físico está representado na Figura 6.

III – Isolamento da seqüência nucleotídica que codifica a proteína semelhante à Pho85p em *N. crassa*

III.1. Isolamento do cDNA

Quando este trabalho foi iniciado um plasmídeo carregando o cDNA que codifica a proteína semelhante à Pho85p de *Saccharomyces cerevisiae* havia sido isolado no laboratório a partir da biblioteca de cDNA λAD5-NC. Para o sequenciamento completo do cDNA oligonucleotídeos específicos foram desenhados a partir da seqüência gênica disponível no banco de dados http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html. Os oligonucleotídeos utilizados foram:

Pho1-F: 5´- gCACCACTAACgAggATCAg – 3´

Pho1-R: 5'- qTqCTCqqTqTCCCCTCTTC - 3'

Pho2-F: 5'- gTCATCAAgTCCTTCATgC - 3'

Pho2-R: 5'- CgATACCAAAgAgTgACg – 3'

Pho3-F: 5'- CAACAACCgCCgATgATg – 3'

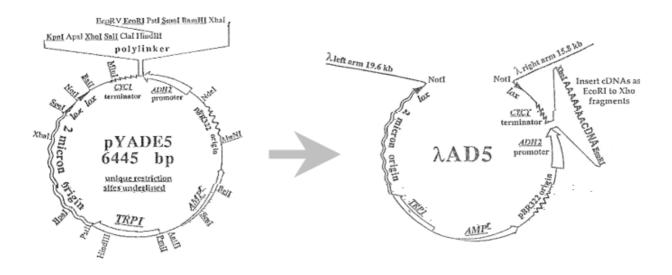


Figura 5 - Mapa físico do plasmídeo pYADE5.

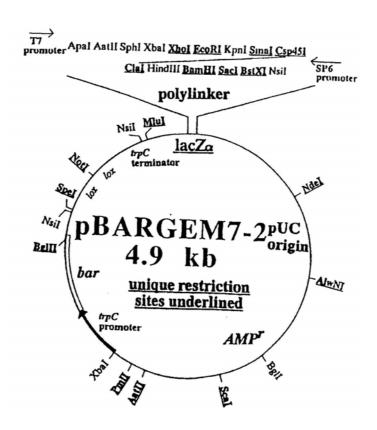


Figura 6 - Mapa físico do plasmídeo pBARGEM7-2.

AD5-F: 5'- ggggCCTgTTACTCACAggC - 3'

AD5-R: 5'- CTCTTACTACTGCTCTCTTg - 3'

III.2. Isolamento da seqüência genômica

1) Infecção de E. coli e isolamento das placas de lise

O rastreamento da biblioteca \(\lambda BARGEM7-2 \) foi realizado de acordo com os protocolos de Sambrook & 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 (12,5 μg/mL concentração final) até uma densidade ótica a 600nm 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 10⁻⁵ (melhor diluição obtida através da titulação). A mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, adicionada de 3 mL de top ágar 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 por 5 minutos, em seguida com solução de neutralização 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).

Meio LB: Bacto-triptona 1%, NaCl 1%, extrato de levedo 0,5%, pH 7,0.

Top ágar LB: meio LB contendo agarose 0,8%.

Solução de desnaturação: NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M.

Solução de neutralização: Tris-HCl 0,5 M, pH 8,0; NaCl 1,5 M.

Tampão SSC 20 x: NaCl 3 M, citrato de sódio 0,3 mM.

2) Preparo da sonda radiativa e hibridização das membranas

Para o rastreamento da biblioteca utilizamos como sonda um fragmento de aproximadamente 1,1 kb isolado a partir da biblioteca de cDNA e que corresponde a ORF inteira do gene. A sonda (50 ng) foi marcada por *random priming*, utilizando o

*NEBlot*TM kit (Biolabs) segundo as especificações do kit e utilizando α[³²P-dATP]. Após marcação foram adicionados 2,5 μL de EDTA 0,2 M, 5 μL de uma solução *stop solution*, 22,5 μL de água ultra-pura e 45 μL de tampão NT. A sonda marcada foi purificada por filtração em uma coluna contendo 1 mL de resina Sephadex-G50 (Sigma) equilibrada em tampão NT e coletada em um volume final de 200 μL. Esta foi desnaturada a 100°C durante 10 min e rapidamente adicionada à solução de préhibridização.

As membranas foram colocadas em frascos de hibridização contendo 10 mL de uma solução de hibridização contendo formamida deionizada 50%, SSPE 6 x, Blotto 0,05 x e 100 μg/mL de DNA esperma de salmão desnaturado sob aquecimento a 100°C 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 com as seguintes soluções:

- 1 2 x SSPE 30 minutos a 42°C
- 2 1 x SSPE + 0,1% SDS 30 minutos a 42°C
- 3 0,1 x SSPE + 0,1% SDS 30 minutos a 42°C
- 4 0,1 x SSPE + 0,1% SDS 30 minutos a 50°C.

Ao final das lavagens, as membranas foram expostas ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA). Foram realizados três ciclos de rastreamento para a obtenção dos fagos contendo o fragmento de DNA de interesse.

Blotto 1 x: leite em pó desnatado 5%, azida sódica 0,02%.

Tampão TAE 10 x: Tris 0,4 M, ácido acético glacial 0,2 M, EDTA 0,01 M, pH 8,0.

Stop solution: sacarose 40%, azul de bromofenol 0,1% em tampão TAE.

Tampão NT: Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; NaCl 10 mM; EDTA 20 mM, pH 8,0.

Tampão SSPE 20 x: NaCl 3,6 M, Na₂PO₄ 0,2 M, EDTA 0,02 M, pH7,4.

3) Excisão plasmidial

As placas de lise isoladas após o rastreamento da biblioteca foram utilizadas para a obtenção de plasmídeos, através da infecção da linhagem de *E. coli* BNN 132 (BRUNELLI; PALL, 1993).

Partículas virais foram retiradas das placas de LB-ágar com o auxílio de palitos de dente estéreis, colocadas em tubos Eppendorf contendo 1 mL de tampão SM e 4 a 5 gotas de clorofórmio e incubadas à temperatura ambiente por 2 horas. Células de uma colônia de E. coli BNN 132 foram incubadas em 10 mL de meio LB contendo maltose 0,2% a 37°C, 250 rpm, 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 1 mL dessa suspensão bacteriana foi transferido para um tubo estéril, juntamente com 5 μL da solução contendo partículas virais isoladas anteriormente. A mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C durante 30 minutos sem agitação. Decorrido este período, adicionou-se 1 mL de meio LB, a mistura foi novamente homogeneizada e incubada por 1 h a 30°C, 250 rpm. Um volume de 200 μL dessa suspensão foi semeado em 10 placas de meio LB contendo ampicilina (100 μg/mL de concentração final) e as placas incubadas a 37°C durante uma noite. Dentre as colônias bacterianas que cresceram, algumas foram selecionadas para serem submetidas à mini-extração de DNA plasmidial como descrito no item IX.1. O DNA plasmidial obtido foi analisado através de uma digestão dupla com as enzimas BamHI e XhoI e por sequenciamento de DNA.

Para o sequenciamento de DNA foram utilizados os oligonucleotídeos Pho1-F, Pho1-R, Pho2-F, Pho2-R e Pho3-F, citados no item III.1 e os relacionados abaixo.

Pho-F: 5´- gTA<u>CATATgg</u>ACggCAggAAACACCC – 3' (*Nde*I)

Pho-R: 5´- CgggATCCCTAgTAgCCCTCgTAgTTg – 3' (*Bam*HI)

Pho4-F: 5´- TAAACAAgAggAAgggTAAAT - 3´

Pho4-R: 5'- TACCCTgTTCCCgTCATCTTC - 3'

Pho5-F: 5´- CgAgAgAAAATgggTTgg - 3´

 $\textbf{PhoEP1-R:}\ 5'\text{-}\ gTCgCCCgTgAgAAgCCg}-3'$

PhoEP2-R: 5'- TgggTTCAgTTgggTCAggC - 3'

BARGEM-F: 5´- gTAATACgACTCACTATAggg - 3´

BARGEM-R: 5'- CTATTTAggTgACACTATAg - 3'

<u>Tampão SM:</u> 5,8 g de NaCl; 2,0 g de MgSO₄.7H₂O; 50 mL de Tris-HCl 1 M, pH7,5; 5 mL de gelatina 2%, água ultra-pura q.s.p. 1 litro.

IV - Análise da expressão do gene

Para avaliarmos a expressão do gene que codifica a proteína homóloga à Pho85p de *S. cerevisiae* e da proteína codificada por este, realizamos os experimentos de *Northern* e *Western blot*.

IV.1. Cultivo do fungo

Conídios da linhagem selvagem FGSC 424 (A) foram coletados como descrito no item I e uma quantidade de 1x10⁹ células/mL foi transferida para 500 mL de meio VM ou meio Fries (pobre em fosfato). Um volume 3 mL da suspensão conidial foi removido para a amostra de zero hora. A cultura foi incubada a 30°C sob agitação (250 rpm) e amostras do micélio foram coletadas a diferentes tempos de incubação: 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 h. O micélio foi filtrado em papel de filtro Whatmann 3MM e imediatamente congelado em nitrogênio líquido.

IV.2. Análise da expressão do gene por Northern blot

Para esta análise o RNA total foi extraído segundo o protocolo descrito por Sokolovsky *et al.* (1995). Todas as soluções foram preparadas com água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) segundo protocolo descrito por Sambrook & Russell (2001).

Para a extração do RNA total o micélio coletado nos diferentes tempos de cultivo, do fungo crescido em meio VM ou meio Fries, foi macerado em gral de porcelana com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Este foi transferido para tubos Eppendorfs de 2 mL contendo 750 μ L de tampão de lise NTES e 750 μ L de uma mistura de fenol saturado em tampão TE:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e mantidos no gelo. A suspensão foi agitada em Vortex e centrifugada a 16.000 x g, 4°C, 10 min. A fase aquosa foi recolhida em tubo Eppendorf novo de 1,5 mL contendo 600 μ L de clorofórmio, a mistura foi homogeneizada e centrifugada a 16.000 x g, 4°C, 10 min. A fase aquosa foi recolhida novamente em Eppendorfs de 1,5 mL e 0,75 vol. de uma solução de LiCl 8 M foi adicionado. A mistura foi incubada a 4°C durante uma noite, o RNA foi recolhido a 16.000 x g, 4°C, 10 minutos,

dissolvido em 300 μ L de água ultra-pura e precipitado com 30 μ L de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 750 μ L de etanol absoluto gelado. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e incubada a -80 $^{\circ}$ C durante 30 min. A seguir, o RNA foi coletado a 16.000 x g, 4° C, 10 minutos, lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 70 $^{\circ}$ 6 e posteriormente dissolvido em 30 a 50 μ L de água. As concentrações das amostras de RNA foram determinadas por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640 e suas purezas foram analisadas através da relação de absorbâncias 260/280 nm.

Amostras de 20 μ g de RNA foram dissolvidas em 16 μ L de tampão de corrida para RNA e 1 μ L de brometo de etídeo 10 mg/mL, desnaturadas a 65°C por 10 min e aplicadas em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2% e tampão MOPS 1 x. As amostras foram submetidas à eletroforese a aproximadamente 3,5 V/cm em tampão MOPS 1 x. Os RNAs foram transferidos para membrana de nylon neutra (Hybond N, Amersham) por capilaridade, com uma solução de SSC 2x e as amostras de RNA fixadas à membrana através de *crosslinking* (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP).

Para a hibridização foram utilizados, como sonda, dois fragmentos de DNA de *N. crassa*: o fragmento inteiro do cDNA (de aproximadamente 1,1 kb) e um fragmento de aproximadamente 380 bp, o qual foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos Pho1-F e Pho-R (citados nos itens III.1 e III.2.3, respectivamente) e corresponde à extremidade 3' da seqüência polinucleotídica. As sondas foram marcadas por *random priming*, utilizando o *NEBlot*TM (Biolabs) conforme descrito no item III.2.2. Após marcação, as sondas foram desnaturadas a 100°C durante 10 min e rapidamente adicionadas à solução de pré-hibridização *ULTRAhyb*TM (Ambion). A pré-hibridização foi realizada a 42°C por 4 horas, em seguida foram adicionados 100 μL da sonda desnaturada (aproximadamente 10⁸ cpm/μg de DNA) e a hibridização foi realizada a 50°C por uma noite. Após hibridização, a membrana foi lavada da seguinte maneira:

- 1 SSPE 1 x; SDS 0,1% 42°C, 30 min
- 2 SSPE 0,5 x; SDS 0,1% 42°C, 30 min
- 3 SSPE 0,1 x; SDS 0,1% 42°C, 30 min.

Após as lavagens a membrana foi exposta ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA) por dois dias a -80°C.

<u>Tampão NTES:</u> NaCl 0,6 M; EDTA 10 mM, pH 8,0; Tris-HCl 100 mM, pH 8,0; SDS 0,4%.

Tampão de corrida para amostras de RNA (para 10 reações): 40 μ L de *loading* de RNA, 20 μ L de formaldeído deionizado, 100 μ L de formamida deionizada.

- *loading* de RNA: 100 μL água ultra-pura tratada com DEPC, 100 μL de glicerol, 80 μL de azul de bromofenol 10% (w/v).

<u>Tampão MOPS 10 x concentrado:</u> ácido 3-(Nmorfolino) propanosulfonico 0,2 M, acetato de sódio 20 mM e EDTA 10 mM, pH 8,0.

IV.3. Análise da expressão da proteína por Western blot

Para os experimentos de *Western* blot foi necessário produzir a proteína NcPHO85 recombinante em *E. coli* (descrito no item a VII), a qual foi utilizada na produção de anticorpos anti-NcPHO85 em coelhos (item VIII). Para a análise da expressão da proteína, realizamos a extração de proteínas totais do fungo nas amostras coletadas nos diferentes tempos do fungo crescido apenas em meio VM. Aproximadamente 500 mg de micélio foi macerado com nitrogênio líquido em gral de porcelana até a completa pulverização. Em seguida, o pó resultante foi transferido para um Eppendorf de 1,5 mL e homogeneizado em Vortex com 500 μL de tampão de lise. Após a lise das células, o extrato celular foi mantido em gelo e centrifugado a 16.000 x *g* por 10 minutos a 4°C, em centrífuga refrigerada de mesa e o sobrenadante transferido para um tubo Eppendorf limpo. A proteína total do extrato foi quantificada utilizando o kit *Bradford Reagent* (Amresco). Aproximadamente 40 μg de proteína/canaleta foram utilizadas para análise.

Os extratos protéicos foram fracionados por SDS-PAGE em gel 12% a 100 V no sistema de eletroforese Mini-Protean II (Bio-Rad). Após eletroforese, o gel foi colocado em contato com uma membrana de nitrocelulose e as proteínas foram transferidas utilizando o sistema de transferência TransBlot da Bio-Rad a 100 V por 90 minutos, em tampão de transferência. A seguir, a membrana foi bloqueada com TBST 1 x contendo leite desnatado 5%, sob lenta agitação, durante uma noite. Após incubação, anticorpos contra a proteína na diluição de 1:1000 foram adicionados, e a membrana deixada sob lenta agitação durante 2 horas. Após esse período, a membrana foi lavada com tampão TBST 1 x (três lavagens de 10 minutos) e

colocada em 30 mL de TBST 1 x, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma) foi adicionado (1:5000) e a incubação foi realizada, sob agitação, durante 1 hora. A membrana foi lavada três vezes com tampão TBST 1 x por 10 minutos cada e revelada pela adição de 5 mL da solução reveladora contendo 1,5 μ L de H_2O_2 30% (v/v) e exposição ao filme radiográfico Kodak T-Mat G/RA por 15 segundos.

<u>Tampão de lise:</u> Tris-HCl 50 mM, pH 7,5; NaF 100 mM; EDTA 1 mM; DTT 3 mM; benzamidina 2 mM; 0,5 μ g/mL de leupeptina; 1 μ g/mL de pepstatina; TLCK 0,1 mM; PMSF 1 mM.

<u>Tampão de transferência:</u> Tris-HCl 20 mM, pH 8,0, glicina 150 mM e metanol 20%. <u>Tampão TBS 5 x:</u> Tris-HCl 100 mM, pH 7,5; NaCl 2,5 M.

<u>Tampão TBST 1 x:</u> diluir o tampão TBS para 1 x e adicionar 0,05% de Tween 20. <u>Solução reveladora:</u> Tris-HCl 100 mM, pH 8,5; ácido p-cumárico 0,2 mM, luminol 1,25 mM.

V – Inativação do gene que codifica a proteína quinase dependente de ciclina

Com a finalidade de analisarmos a participação da proteína quinase dependente de ciclina na regulação do metabolismo de glicogênio no fungo *N. crassa* realizamos a inativação do gene por meio de duas metodologias: a inativação mediada por RIP (*Repeat Induced Point Mutation*) e a inativação por recombinação homóloga.

V.1. Inativação gênica mediada por RIP

Este procedimento baseia-se na introdução de mutações pontuais ao longo de seqüências gênicas duplicadas, durante o período pré-meiótico em *N. crassa*. Resumidamente, uma cópia adicional do gene foi introduzida por transformação de uma linhagem do fungo com um plasmídeo contendo a cópia genômica do gene contendo *intron*. A seguir a linhagem contendo a dupla cópia foi cruzada com outra de *mating type* oposto e a progênie analisada em relação à presença de mutações

ao longo da sequência polinucleotídica das sequências duplicadas (GALAGAN; SELKER, 2004).

1) Construção do plasmídeo e transformação de N. crassa

O vetor utilizado foi o pMSN-1, o qual foi adquirido junto ao FGSC. Este plasmídeo é derivado do pGEM-3Zf, onde o gene *qa-2* (quinato-2) foi inserido. O gene *qa-2* de *N. crassa* codifica a enzima desidroquinase catabólica. Linhagens de *N. crassa* carecendo dessa enzima são incapazes de usarem quinato ou chiquimato como única fonte de carbono na presença do gene *aro-9*. Por sua vez, linhagens deficientes no gene *aro-9* requerem uma mistura de três aminoácidos aromáticos e de ácido p-aminobenzóico para o crescimento. Dessa forma, uma linhagem *aro-9*, *qa-2*⁻ é incapaz de crescer em meio mínimo. Portanto, o vetor pMSN-1 pode ser usado em processos de transformação de linhagens de *N. crassa aro-9*, *qa-2*⁻. O mapa físico do vetor pMSN-1 está representado na Figura 7.

A ORF inteira do gene contendo o íntron foi amplificada por PCR, a partir de DNA genômico, utilizando os oligonucleotídeos Pho-F e Pho-R (citados no item III.2.3) e subclonada no vetor pMOSBlue (Amersham Biosciences). Um cassete de DNA correspondendo à ORF inteira (BamHI e Xbal) foi removida do vetor pMOSBlue e subclonada no vetor pMSN-1. Clones positivos foram selecionados após transformação de células de E. coli DH10B com o produto da reação de ligação e submetidos à mini-extração de DNA plasmidial conforme descrito no item IX.1. Plasmídeos pMSN-1 contendo o gene foram selecionados por digestão enzimática com as enzimas BamHI e Xbal e um plasmídeo foi utilizado para a transformção de conídios, através de eletroporação. Para isto, conídios da linhagem FGSC 3957 (A, aro-9, qa-2⁻) foram coletados a partir de cultura em meio sólido com água ultra-pura estéril, lavados duas vezes com 30 mL de água ultra-pura gelada estéril, e depois lavados com 30 mL de sorbitol 1 M gelado estéril. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado e contadas em câmara de Neubauer. A densidade das células foi ajustada a 1x10⁹ células/mL. Uma mistura contendo 1 mg de DNA plasmidial e 100 μL de células foi transferida para cubetas de eletroporação estéreis mantidas em banho de gelo. A transformação foi realizada através de eletroporação dos conídios utilizando um eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad), nas seguintes condições: 2000 Volts, 25 μF, 300 Ω. Após o pulso elétrico,

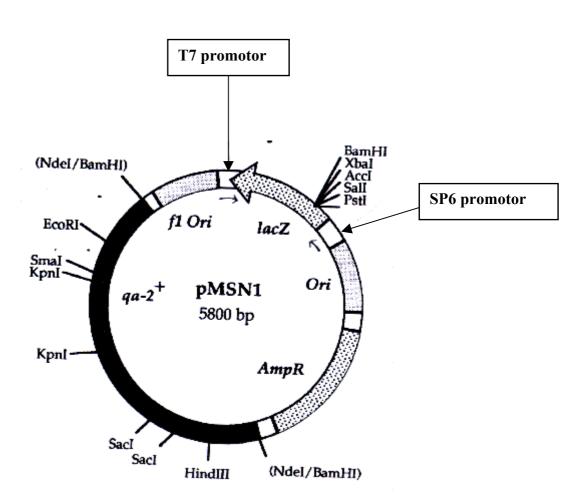


Figura 7 - Mapa físico do vetor pMSN-1.

1 mL de sorbitol 1 M gelado estéril foi adicionado e a suspensão foi adicionada de 10 mL de *top ágar* VM (mantido a 48°C) e a mistura final foi colocada na superfície de placas contendo 50 mL de meio VM suplementado com sorbose 2%, frutose e glicose 0,05% (para induzir o crescimento colonial) (MISHRA; TATUM, 1972). As placas foram incubadas a 30°C e as colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio com VM sólido contendo sacarose 2%. Posteriormente, os clones transformantes foram crescidos em meio VM líquido contendo sacarose 2%, os micélios foram coletados, os DNA genômicos extraídos e analisados por *Southern blot* (descrito no item IX.3) para a verificação da presença de uma cópia adicional do gene de interesse.

<u>Top agar VM:</u> sais de Vogel 1 x, sorbitol 1 M, sorbose 2%, frutose 0,05%, glicose 0,05%, ágar 1%.

2) Cruzamento do fungo e coleta dos ascósporos

Células de um transformante (A) contendo dupla cópia do gene foram utilizadas no cruzamento com uma linhagem do fungo de mating type oposto. O cruzamento foi realizado em tubos com 15 mL de meio sólido segundo o procedimento descrito por Westergaard & Mitchell (1947), usando a linhagem FGSC 2226 (a) como receptora, sendo esta cultivada em meio sintético de cruzamento por 5 dias a 25°C. Uma suspensão contendo conídios do transformante (2 mL) carregando a dupla cópia do gene foi espalhada sobre a cultura da linhagem receptora. Este cruzamento foi incubado a 25°C no escuro até o aparecimento dos peritécios. Os esporos foram recolhidos com auxílio de água ultra-pura estéril, tratados com solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 min para a inativação dos conídios ou pedaços de hifas, lavados com água ultra-pura estéril, ressuspensos em solução de ágar 0,1% estéril e ativados por 45 min a 60°C (HOROWITZ, 1991). A concentração dos esporos foi determinada por contagem em câmara de Neubauer e aproximadamente 500 células foram inoculadas em placas de Petri contendo meio VM contendo sorbose 1,5%, frutose 0,1% e glicose 0,1%. Após dois dias a 30°C houve o aparecimento de colônias, as quais foram transferidas, isoladamente, para tubos com meio VM sólido contendo sacarose 2% e os tubos incubados a 37°C.

Meio sintético de cruzamento: sacarose 1,5%, KNO₃ 0,1%, K₂HPO₄ 0,07%, KH₂PO₄ 0,05%, MgSO₄.7H₂0 0,05%, CaCl₂ 0,01%, NaCl 0,01%, 0,1 μL/mL de solução de

biotina 0,05 mg/mL em etanol 50%; 0,1 μ L/mL de solução de elementos traços; pH 6,5.

3) Análise dos clones

Os segregantes com maiores alterações morfológicas macroscópicas foram selecionados para realização da extração do DNA genômico (conforme descrito no item IX. 3) para a verificação da introdução de mutações pontuais no gene. Seis clones foram selecionados. A partir do DNA genômico, a região codificadora do gene foi amplificada por PCR, subclonada no vetor pMOSBlue, o DNA plasmidial foi extraído (conforme descrito no item IX.1) e utilizado para as reações de sequenciamento utilizando oligonucleotídeos específicos. Com a finalidade de aumentar o número de mutações introduzidas realizamos um segundo cruzamento utilizando um clone obtido no primeiro cruzamento e a linhagem contendo a dupla cópia do gene. Os novos segregantes resultantes (clones RIPb) foram submetidos ao mesmo procedimento descrito acima. Após o RIPb um segregante foi selecionado e o homocário foi isolado após purificação dos microconídios através da filtração de uma suspensão conidial por filtro Millex (Millipore).

V.2. Inativação gênica por recombinação homóloga

A outra técnica utilizada para a inativação gênica baseia-se no processo de recombinação homóloga, na qual ocorre a troca entre duas sequências de DNA, uma inserida por transformação e outra presente no genoma, desde que estas possuam regiões flanqueadoras iguais. O procedimento que utilizamos está esquematizado na Figura 8. Resumidamente, esta técnica baseia-se na substituição da ORF inteira do gene a ser inativado pela seqüência de um gene de resistência. Em nosso experimento utilizamos o gene *hph*, o qual confere resistência ao antibiótico higromicina para substituir a ORF do gene *a* ser inativado.

1) Amplificação por PCR

Para as reações de amplificação das regiões *upstream* e *downstream* ao gene de interesse e amplificação do gene *hph* foram sintetizados oligonucleotídeos contendo seqüências híbridas do gene *hph* e parte da seqüência genômica do gene

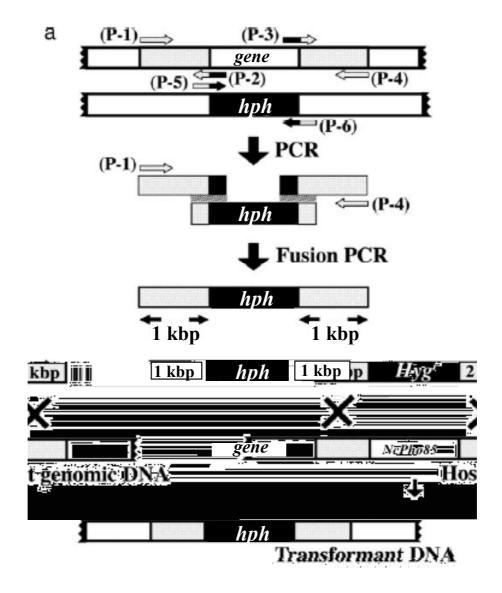


Figura 8 - Estratégia para a substituição do gene de interesse pelo gene *hph*. (A) Representação da construção do vetor com o gene. A região *upstream* do gene de interesse foi amplificada utilizando os oligonucleotídeos P-1 e P-2, e a região *downstream* com os oligonucleotídeos P-3 e P-4. O tamanho dos produtos é de 950 bp e 1050 bp, respectivamente. O gene *hph* foi amplificado a partir do vetor pCSN44 utilizando os oligonucleotídeos P-5 e P-6 e possui tamanho de aproximadamente 2,8 kb. Estes três fragmentos foram utilizados na PCR de fusão com os oligonucleotídeos P-1 e P-4. (B) Representação da integração homóloga do produto de PCR após transformação do fungo, processo que ocorre por um duplo *crossing over* (NINOMIYA *et al.*, 2004).

de interesse. Os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados nas reações de amplificação:

P-1F: 5' - TAAACAAgAggAAgggTAATT - 3'

P-2R: 5' – <u>ggCgTAATAgCgAAgAg**ggCTTCTCTgAgTgCCgAAg**</u> – 3'

P-3F: 5' - AAgCATAAAgTgTAAAgACAgAgTACCTTCCAAAAAC - 3'

P-4R: 5' - TACCCTgTTCCCgTCATCTTC - 3'

P-5F: 5' – **CTTCggCACTCAgAgAAgCC**CTCTTCgCTATTACgCC – 3'

P-6R: 5' - gTTTTTggAAggTACTCTgTCTTTACACTTTATgCTT - 3'

Nos oligonucleotídeos as bases em negrito correspondem ao gene Ncpho85 e as sublinhadas ao gene hph. As regiões upstream e downstream ao gene foram amplificadas a partir do plasmídeo pBARGEM7-2, o qual contém a seqüência genômica inteira do gene mais as regiões flanqueadoras 5' e 3'. Parte da região upstream (950 bp) do gene de interesse foi amplificada utilizando o par de oligonucleotídeos P-1F/P-2R e parte da região downstream (1.050 bp) com o par P-3F/P-4R. O gene hph foi amplificado a partir do vetor pCSN44 utilizando o par de oligonucleotídeos P-5F/P-6R. Os produtos amplificados do gene possuem em uma das extremidades regiões de homologia ao gene hph e o fragmento amplificado do gene hph possui em ambas extremidades regiões de homologia às regiões upstream e downstream ao gene de interesse. Os fragmentos, foram purificados por precipitação com etanol, quantidades aproximadas de 400 ng de cada um foram misturadas e submetidas a uma PCR de fusão para gerar no final um fragmento de aproximadamente 5 kb, correspondendo ao gene hph flanqueado pelas regiões upstream e downstream ao gene. Este fragmento foi subclonado no vetor pMOSBlue e amplificado em células de E. coli DH10B. Estas foram crescidas em meio 2YT líquido contendo glicose 0,2% e ampicilina (100 μg/mL de concentração final) e as células coletadas para a extração de DNA plasmidial. O fragmento híbrido foi confirmado por seguenciamento de DNA usando os oligonucleotídeos citados acima e por digestão com enzimas de restrição.

Após confirmação, o fragmento de 5 kb foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos P1-F e P4-R para gerar uma maior quantidade, purificado e utilizado para transformar células do fungo.

Meio 2YT: Bacto - triptona 1,6%, extrato de levedo 1%, NaCl 0,5%.

2) Transformação de N. crassa e seleção dos clones

A linhagem de N. crassa FGSC 9781 (a, ∆mus-51::bar) foi utilizada para a transformação por eletroporação. Conídios foram coletados a partir de cultura em meio sólido, filtrados, lavados duas vezes com água e depois com sorbitol gelado estéril. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M gelado, contadas em câmara de Neubauer e a densidade foi ajustada para 1x109 células/mL. As transformações foram realizadas utilizando concentrações de DNA de 1,5, 3 e 6 μg e 100 μL de células, as misturas foram transferidas para cubetas de eletroporação estéreis mantidas em banho de gelo. A eletroporação dos conídios foi realizada em um eletroporador Gene Pulser II (Bio-Rad) nas condições descritas no item V.1.1. Após o pulso elétrico, 1 mL de sorbitol 1 M gelado estéril foi adicionado e a suspensão foi adicionada de 5 mL de meio de regeneração (COLOT et al., 2006) estéril sob agitação leve (70 rpm) por 2 horas. Após o período, 5 mL de top ágar VM foi misturado e a mistura colocada e vertida sobre a superfície de placas contendo 50 mL de meio VM suplementado com sorbose 2% (para induzir o crescimento colonial) e higromicina na concentração final de 250 μg/mL. As placas foram incubadas a 30°C até o aparecimento das colônias isoladas, as quais foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio VM sólido. Os clones resultantes foram repicados três vezes em placas contendo meio VM acrescido de sorbose e higromicina para confirmar estabilidade dos transformantes.

Meio de regeneração: 4 mL de sorbitol 1 M gelado, 100 μL sais de Vogel 50 x.

VI – Análise do mutante obtido por RIP

Um clone resultante do processo de RIP foi avaliado pelo crescimento em meio sólido. Micélio das linhagens mutante e selvagem (FGSC 424, A) foram inoculados na superfície do meio de cultura em uma das extremidades do tubo e a frente de crescimento foi medida em milimetros ao longo dos dias. O crescimento foi realizado em *race tubes*, os quais são longos tubos (40 x 1,5 cm) contendo ambas extremidades curvadas em ângulo de 45°C. Os seguintes meios foram utilizados: meio VM contendo sacarose 2% nas temperaturas de 25°C e 37°C, e o mesmo meio

de cultura com adição de extrato de levedo 2% a 25°C (RYAN; BEADLE; TATUM, 1943).

VII – Produção da proteína recombinante em E. coli

A proteína foi produzida na forma recombinante para a produção de anticorpo. Para isto, o cDNA que codifica a proteína foi amplificado por PCR, subclonado no vetor pET-28a e o plasmídeo resultante utilizado para transformar *E. coli*.

VII.1. Subclonagem do cDNA no vetor pET-28a

O mapa físico do pET-28a (Novagen) está mostrado na Figura 9. Este vetor possui a marca de seleção *KAN*, a qual confere resistência ao antibiótico canamicina em bactérias. Neste vetor, a produção de proteínas recombinantes está sob o controle do promotor induzível T7, o qual permite a produção da proteína recombinante em alta concentração em meio contendo IPTG (isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo). O cDNA que codifica a proteína foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos Pho-F e Pho-R (item III.2.3) e o gene foi clonado nos sítios de *Ndel e Bam*HI *in frame* à seqüência que codifica uma cauda de polihistidina (cauda poli-His), portanto a proteína produzida apresentou-se fusionada à cauda poli-His na extremidade N-terminal, a qual será importante durante a purificação da proteína recombinante através de cromatografia de afinidade em resina Ni²⁺ *HiTrap Chelating* de 5 mL (Amersham Biosciences). A construção plasmidial foi confirmada por sequenciamento de DNA e utilizada para transformar células competentes da linhagem de *E. coli* BL21(DE3).

VII.2. Produção e purificação da proteína recombinante

Primeiramente a análise da produção da proteína recombinante foi realizada em pequena escala para avaliar as melhores condições de produção. Para isto células competentes *E. coli* BL21(DE3), transformadas com a construção plasmidial citada acima, foram cultivadas em 50 mL de meio 2YT líquido com glicose 0,2% e

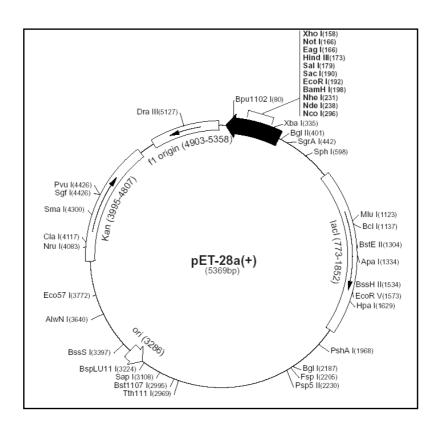


Figura 9 - Mapa físico do vetor pET-28a (Novagen).

canamicina (30 μg/mL de concentração final) nas temperaturas de 30°C e 37°C, e a produção da proteína recombinante foi induzida com adição de 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG durante 5 e 4 horas, respectivamente. Ao final deste período, as células foram coletadas, ressuspensas em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 e a produção da proteína recombinante foi analisada em gel de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) (LAEMMLI *et al.*, 1970).

Posteriormente, a proteína recombinante foi produzida em maior quantidade. Para isto células foram cultivadas em 1 L de meio 2YT líquido com glicose 0,2% e canamicina (30 μg/mL de concentração final) na temperatura de 30°C até a concentração celular atingir uma densidade ótica a 600 nm de 0,8. Após esse período, a produção da proteína recombinante foi induzida com adição de 0,1 mM de IPTG durante 5 horas. As células foram coletadas por centrifugação, o sobrenadante descartado, os concentrados celulares obtidos foram ressuspensos em 35 mL de tampão de lise. A suspensão celular foi lisada por sonicação usando o equipamento Sonics Vibra Cell (Sonics & Materials, Modelo VCX-500). Em gelo, as células foram lisadas através de 30 ciclos de 10 seg. de lise e 10 seg. de espera em gelo, com o aparelho ajustado em sua potência máxima. Após a lise celular foi coletada uma alíquota de 1 mL do extrato bruto (EB). Em seguida, o extrato celular foi centrifugado a 30.000 x g a 4°C por 20 min, e alíquotas de 1 mL do precipitado (P) e do sobrenadante (S) foram coletadas. Proteínas das amostras do precipitado e sobrenadante foram quantificadas pelo Bio-Rad Protein Kit Assay e analisadas através de SDS-PAGE gel 12%.

A purificação da proteína foi realizada por cromatografia de afinidade utilizando uma coluna de 5 mL de Ni²⁺ *HiTrap Chelating* (Amersham Biosciences), seguindo as instruções do fabricante, acoplada ao sistema de purificação de proteínas *Akta Prime* (Amersham). A coluna foi equilibrada com o tampão de lise, lavada com 80 mL do mesmo tampão, e 40 mL do sobrenadante foram aplicados na coluna. Após lavagem da coluna com o mesmo tampão, a proteína foi eluída com 40 mL deste mesmo tampão, exceto que a concentração de imidazol passou para 500 mM.

As frações correspondentes aos picos de absorbância foram coletadas e analisadas por SDS-PAGE 12%. As frações apresentando a proteína pura foram reunidas e a solução final foi dialisada duas vezes a 25°C contra 1 L de tampão glicina-NaOH 100 mM, pH 10,5, e depois dialisada contra 1 L de tampão glicina-

NaOH 20 mM, pH 10,5 por 12 horas cada. A proteína foi quantificada pelo método de Hartree (HARTREE, 1972) e utilizada para posterior produção de anticorpos em coelho (descrito a seguir).

<u>Tampão de lise:</u> Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM; imidazol 20 mM; benzamidina-HCl 1 mM; PMSF 1 mM.

VIII - Produção de anticorpos contra a proteína de interesse em coelhos

Como descrito anteriormente, a proteína foi purificada, dialisada, quantificada e utilizada para inocular coelhos.

VIII.1. Imunização dos coelhos e titulação do soro

Para produzir anticorpos em coelhos foram utilizados dois coelhos machos jovens. Esta parte do trabalho foi realizada nas dependências do Departamento de Análises Clínicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, a qual possui uma infraestrutura adequada para este fim. Para a primeira injeção no coelho, aproximadamente 250 µg da proteína foi emulsificada em adjuvante de Freund completo e aplicado, via intradérmica, em diferentes locais no dorso do animal. Após o período de três semanas, a segunda injeção foi realizada utilizando aproximadamente 200 µg da proteína emulsificada com adjuvante de Freund incompleto. As injeções posteriores foram feitas na mesma concentração da segunda, sendo que a terceira com um intervalo de 15 dias. Uma semana após a terceira injeção um pequeno volume de sangue foi colhido da orelha para verificar a produção de anticorpos (sangria de prova). A sangria total foi realizada através de punção cardíaca após a quarta injeção.

A titulação do soro foi realizada por *Western blot* com o procedimento descrito no item IV.3. Para isso, a proteína recombinante produzida em *E. coli* (aproximadamente 20 µg/canaleta) e extrato total do fungo foram fracionados através de eletroforese SDS-PAGE 12% e, posteriormente, transferidos para membranas de nitrocelulose. Após a transferência e bloqueio, as membranas foram

61

incubadas com várias diluições do anticorpo (1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000), lavadas e incubadas com anticorpo anti-IgG conjugado com fosfatase alcalina (Bio-Rad). Em seguida, a membrana foi novamente lavada com TBST 1 x e procedeu-se a revelação com 10 mL de tampão fosfato, 100 μL NBT e 100 μL BCIP (Bio-Rad).

Tampão fosfato: NaHCO₃ 100 mM, MgCl₂ 1 mM.

NBT: 40 mM em dimetilformamida 70%.

BCIP: 30 mM em dimetilformamida.

IX – Métodos Moleculares

IX.1. Mini extração de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi extraído pelo método descrito por Holmes e Quigley (1981), com algumas modificações.

Amostras de colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de meio líquido 2YT contendo glicose 0,2% e ampicilina (100 μ g/mL de concentração final) a 37°C, 250 rpm, durante uma noite. Um volume de 1,5 mL da suspensão celular obtida foi colocada em tubos Eppendorf e centrifugada por 1 min em microcentrifuga Eppendorf a 16.000 x g. Ao concentrado celular foram adicionados 350 μ L de uma solução de lise, juntamente com 25 μ L de uma solução de lisozima (10 mg/mL), TampãTris-HClom

mistura de fenol saturado em tampão TE:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizadas e centrifugadas a 16.000 x g durante 10 min a 4°C. Cerca de 80 μ L da fase aquosa foram transferidos para um tubo Eppendorf novo, o DNA plasmidial foi precipitado com 40 μ L de acetato de amônio 7,5 M e 300 μ L de etanol 95% gelado, coletado a 16.000 x g durante 10 min a 4°C, lavado duas vezes com uma solução gelada de etanol 70% e dissolvidos em 20 a 40 μ L de tampão TE ou água ultra-pura.

Solução de lise: sacarose 8%; Triton X-100 0,5%; EDTA 50 mM, pH 8,0; Tris 10 mM, pH 8,0.

Tampão TE: Tris-HCI 10 mM, pH 8,0 contendo EDTA 1 mM.

IX.2. Preparo e transformação de células competentes de E. coli

Para o preparo de células competentes da linhagem DH10B de E. coli, células não competentes foram rejuvenescidas em 5 mL de meio 2YT contendo glicose 0,2% 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 contendo glicose 0,2%, e a cultura incubada a 37°C a 250 rpm até uma densidade ótica a 600 nm de aproximadamente 0,7. As células foram coletadas em tubos Falcon de 50 mL estéreis a 700 x g em microcentrífuga de mesa durante 15 min a 4°C. Os concentrados celulares foram lavados com 40 mL de uma solução de CaCl₂ 100 mM gelada e estéril e dissolvidos em 8 mL de CaCl₂ 100 mM estéril. As células competentes foram utilizadas em reações de transformações de acordo com o seguinte protocolo: 100 LL de células competentes foram incubadas em banho de gelo por 30 min juntamente com os produtos das reações de ligação ou com solução de DNA plasmidial. Em seguida, as amostras foram submetidas a choque térmico de 42°C durante 2 min, adicionadas de 400 μL de meio 2YT com glicose 0,2% estéril, e incubadas a 37°C durante 1 hora. As amostras foram plaqueadas em meio 2YT com glicose acrescido de ágar 2% e ampicilina (100 μg/mL de concentração final), nos volumes de 50, 100, 150, 200 μL. As placas foram incubadas a 37°C durante uma noite.

IX.3. Extração de DNA genômico e análise por Southern blot

O DNA genômico foi extraído de acordo com a metodologia descrita por Weiland (1997). O micélio foi macerado em gral de porcelana com nitrogênio líquido, transferido para tubos Eppendorf contendo 500 µL de tampão de extração de DNA genômico e 500 µL de uma solução de fenol saturado em tampão TE:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e mantido no gelo. A mistura foi homogeneizada em Vortex e centrifugada a 16.000 x g, 4°C, 10 min. A fase aquosa foi transferida para tubo Eppendorf limpo e o DNA precipitado com 50 μL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 950 μL de isopropanol a -80°C por 15 min. O precipitado foi recolhido a 16.000 x g, 4°C, 10 min e digerido com uma solução de RNAse A 200 μg/mL a 37°C, 30 min. Nova extração foi realizada com 200 μL de fenol saturado em tampão TE:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a fase aquosa foi transferida para tubo Eppendorf limpo de 1,5 mL e precipitada com 100 μL de acetato de amônio 7,5 M e 750 μL de etanol absoluto gelado a -80°C, 15 min. O precipitado foi recolhido a $16.000 \times g$, 4° C, $10 \text{ min e lavado duas vezes com } 700 <math>\mu\text{L}$ de etanol 70% gelado a 16.000 x g, 4°C, 5 min. O precipitado foi ressuspenso em 50 a 100 μL de água ultrapura. As concentrações das amostras de DNA foram determinadas por absorbância a 260 nm em espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640 e suas purezas foram analisadas através da relação de absorbâncias 260/280 nm.

O DNA genômico foi analisado por *Southern blot* conforme o procedimento descrito por Sambrook & Russell (2001). Cerca de 10 μg de DNA genômico, tratado com RNAse, foi digerido com endonucleases de restrição específicas. Os fragmentos de DNA resultantes das digestões foram separados por eletroforese em gel de agarose 1%, transferidos por capilaridade para uma membrana de nylon carregada positivamente (Hybond-N+, Amersham) e fixados à membrana por *crosslinking* (CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP). A membrana foi pré-hibridizada a 55°C por 2 horas em solução *Alkaphos Direct* (Amersham) seguindo as recomendações do fabricante e hibridizada na mesma solução utilizando como sonda o cDNA do gene marcado radiativamente conforme descrito no item III.2.2. A sonda foi desnaturada a 100°C durante 10 min e um volume correspondente a 10⁸ cpm/μg de DNA foi adicionado à solução e a hibridização foi realizada a 55°C por

uma noite. Após o período de hibridização a membrana foi lavada da seguinte maneira:

- $1 SSPE 1 x; SDS 0,1% 60^{\circ}C, 30 min$
- 2 SSPE 0,5 x; SDS 0,1% 60°C, 30 min
- 3 SSPE 0,1 x; SDS 0,1% 60°C, 30 min.

Após lavagem a membrana foi exposta ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA) por um a três dias a -80°C.

Tampão de extração de DNA: Tris-HCl 200 mM, pH 8,0; NaCl 250 mM; EDTA 25 mM, pH 8,0; SDS 1%.

IX.4. Sequenciamento de DNA

As reações para sequenciamento automático do DNA foram realizadas em termociclador, utilizando-se o kit Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction, da Perkin Elmer Biosystems. A metodologia baseia-se na reação de Sanger et al. (1977), através da utilização de trifosfatos de didesoxinucleosídeos marcados com corantes fluorescentes derivados da rodamina. As reações de sequenciamento, a precipitação do DNA e a lavagem para retirada dos terminadores não incorporados foram realizadas em tubos Eppendorf. A reação foi realizada com aproximadamente 400 ng de DNA plasmidial (e água ultra-pura estéril num total de 4 μL), 2 μL da pré-mistura de Big Dye (fornecida com o kit), 2 μL de oligonucleotídeo (1,6 pmoles/μL) e 2 μL de tampão de sequenciamento. A reação em termociclador consistiu de 40 ciclos de 96°C por 30 seg, 52°C por 30 seg, 60°C por 4 min, após desnaturação inicial de 96°C por 2 min. O DNA foi precipitado pela adição de 80 μL de isopropanol 70% (centrifugação a 9.300 x g por 20 min em microcentrífuga), lavado com 1 mL de etanol 70% por 2 vezes e, após secagem à temperatura ambiente, guardado a -20°C. No momento da aplicação no gel, o DNA foi ressuspenso em 2 μL de reagente preparado a partir do kit ABI PRISM Lane Guide[™] da PE Biosystems ("Quinto Corante") e desnaturado a 96°C por 2 min. O sequenciamento foi realizado em seqüenciador automático ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems) conectado a um computador Macintosh com os programas para coleta e análise dos dados ABI Prism Data Collection" e "ABI Prism DNA Sequencing Analysis. As seqüências nucleotídicas foram analisadas pelo programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999).

Tampão de sequenciamento: Tris-HCl 200 mM, pH 9,0; MgCl₂ 5 mM.

Resultados e Discussão

I – Isolamento do cDNA e do gene que codifica a proteína semelhante a Pho85p em *Neurospora crassa*

Quando este trabalho se iniciou, a biblioteca plasmidial de cDNA (λAD5-NC, FGSC) construída no bacteriófago λ havia sido previamente rastreada em nosso laboratório e, um plasmídeo contendo o cDNA que codifica a proteína havia sido isolado. Resumidamente, a següência da proteína Pho85 da levedura S. cerevisiae foi utilizada análise BLAST em uma por (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html) com o objetivo de buscar uma proteína ortóloga em N. crassa. A partir da seqüência nucleotídica identificada, no genoma do fungo, oligonucleotídeos específicos foram desenhados e utilizados em reações de amplificação por PCR. Um fragmento de 1,1 kb foi amplificado a partir do DNA genômico, o qual, após sequenciamento parcial, mostrou codificar uma proteína semelhante à Pho85p de S. cerevisiae. O fragmento foi utilizado para rastrear a biblioteca de cDNA do fungo, resultando em um plasmídeo que continha um inserto de aproximadamente 2,2 kb, o qual contém a ORF que codifica a proteína semelhante à Pho85p de S. cerevisiae e as regiões upstream e downstream à ORF.

Dando continuidade ao trabalho, o inserto foi submetido ao sequenciamento completo utilizando oligonucleotídeos específicos. Após o sequenciamento, uma seqüência nucleotídica de 1014 bp foi identificada como a ORF, incluindo o códon de término, a qual codifica um polipeptídeo de 337 aminoácidos. A seqüência nucleotídica completa do inserto e a seqüência polipeptídica deduzida a partir da seqüência nucleotídica estão mostradas na Figura 10. A região *upstream* possui 304 nucleotídeos, enquanto que a região *downstream* possui 561 nucleotídeos.

A comparação da seqüência nucleotídica obtida por sequenciamento de DNA comparada com a seqüência correspondente, depositada no banco genômico de *N. crassa* (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html) permitiu determinar a presença de um *intron* de 89 bp próximo à extremidade 5´ do cDNA, no nucleotídeo 69. Na região *downstream* à ORF foi identificada uma seqüência de nucleotídeos de adenina localizada no nucleotídeo 610, a partir do códon de terminação, a qual é composta de 26 nucleotídeos de adenina. Um provável sítio de poliadenilação (AAATAAT) foi identificado 28 nucleotídeos

ECORI CTGCAG GAATTC GGCACGAGCTCCCATCTTCACACTGTTCTAGACTTGTTAGATTTATCGGCGCAGAGACTGCTTCAGTGCATCTTTGCTCTCCATCACGGCTTCTCACGGGCGACAGCTGCCTGACCAACAAGACCCAACAGGCGGCGAATCCCCCA ATCCCCTGCGCAAGACGGTCACTATTGGCTCTGTACTTTTCAACCGCGCCCATACGACCCAGCGACAACCTTCGCCACA **M** D G R K H P S S F Q Q L E K L G E G T Y A T V F 25 ATG GACGGCAGGAAACACCCAAGTTCTTTCCAGCAGCTTGAAAAGCTGGGAGAGGGTACTTATGCTACTGTCTTCK G R N R Q T G E L V A L K E I H L D S E E G T P 50 AAAGGCCGCAACCGACAGACGGCGAGCTTGTAGCTCTCAAGGAGATTCACCTTGACTCGGAAGAGGGGACACCG TAIREISLMKELKHENIVALHDVI75 ${\tt AGCACGGCAATCCGCGAGATCTCGCTCATGAAAGAACTGAAGCACGAGAACATTGTTGCTCTACACGATGTTATT}$ H T E N K L M L V F E Y M D G D L K K F M D T N G 100 ERGALKPHVIKSFMHQLLKGIDFCH125 GAGAGGGGAGCCCTCAAGCCACATGTCATCAAGTCCTTCATGCATCAGTTGCTCAAGGGTATTGACTTCTGCCAC KNRVLHRDLKPQNLLINSKGALKLG 150 AAGAACAGGGTCCTACATCGAGACCTGAAGCCGCAGAACCTCCTTATCAACAGCAAGGGCGCTCTGAAGCTGGGT D F G L A R A F G I P V N T F S N E V V T L W Y R GATTTCGGTTTGGCGAGAGCATTCGGTATTCCAGTCAACACCTTTTCGAATGAGGTCGTCACTCTTTGGTATCGA P D V F L G S R T Y N T S I D I W S A G C I M A ${\tt GCTCCCGACGTGTTTCTTGGAAGTAGAACCTACAACACCAGCATCGACATTTGGTCCGCGGGATGTATCATGGCT}$ EMFTGRPLFPGTTNEDQIVRIFRIM 225 GAGATGTTCACCGGCAGGCCTTTGTTTCCCGGCACCACTAACGAGGATCAGATTGTTCGCATTTTTAGGATAATG GTPTERTWPGLTSFPEYKPNWQMYA250 GGCACGCCGACGGAACGTACATGGCCTGGCCTCACCTCGTTCCCCGAGTACAAGCCTAACTGGCAAATGTATGCG T Q S L S S I L P Q I D R D G I D L L Q R M L Q L 275 ACACAGAGCCTGTCATCCATCTTACCTCAGATTGACCGCGACGGCATCGACTTGCTTCAGCGGATGCTACAGTTG RPELRISAHDALQHHWFNDLVHQQH300 $\tt CGGCCCGAATTGCGATCTCGGCTCACGATGCGCTTCAACACCACTGGTTCAACGACCTGGTCCACCAACAGCAT$ H H Q A Q Q S M M Q Q P P M M Q Q P M M Q Q H R 325 CATCACCAAGCGCAGCAGTCAATGATGCAACAACCGCCGATGATGCAGCAACAGCCAATGATGCAGCAACATAGA

Figura 10 - Seqüência nucleotídica completa do fragmento de DNA isolado após excisão plasmidial pAD5-Ncpho85. A seqüência mostra a ORF que codifica a proteína semelhante a Pho85p de S. cerevisiae em N. crassa, a seqüência de aminoácidos deduzida a partir da seqüência nucleotídica e as seqüências das regiões upstream e downstream à ORF. O provável sítio de poliadenilação está mostrado em negrito, os sítios de restrição EcoRI e XhoI utilizados na construção da biblioteca estão mostrados e os codons de iniciação (ATG) e término (TAG) estão mostrados em negrito.

upstream à cauda poli-A. O gene foi denominado Ncpho85 e a proteína deduzida NcPHO85.

A Figura 11 mostra o alinhamento de seqüências entre as proteínas semelhantes a Pho85 de diferentes fungos e a seqüência polipeptídica deduzida de *N. crassa*. A proteína do fungo *Aspergillus nidulans* utilizada foi a PHOA^{M1} e podemos verificar os 46 resíduos a mais que esta proteína contém na extremidade N-terminal. Pode-se observar que a proteína de *N. crassa* mostra uma identidade alta às proteínas do fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* (85%) e do fungo filamentoso *Aspergillus nidulans* (82%), mostrando também uma boa identidade à proteína da levedura *Schizosaccharomyces pombe* (70%) e uma menor identidade à proteína da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (65%). Entretanto, como a proteína Pho85p de *S. cerevisiae* foi a melhor estudada com relação às suas propriedades bioquímicas, utilizaremos esta como base comparativa.

O motif PSTAIRE, aminoácidos composto pela seqüência de EGTPSTAIREISLMKE está presente em todas as proteínas analisadas. Isso era esperado visto que foi descrito que este domínio é importante para a função destas Cdks (ESPINOZA et al., 1994; MORGAN, 1997; BUSSINK; OSMANI, 1998; JESÚS-BERRÍOS; RODRÍGUEZ-DEL VALLE, 2002). O domínio T-loop, descrito por Nishizawa et al. (1999) na Pho85p de S. cerevisiae, e que compreende os aminoácidos 163-NTFSSE-168 (NISHIZAWA et al., 1999) possui o resíduo Ser167 alterado para Asn nos outros fungos utilizados para o alinhamento, inclusive na seqüência de N. crassa. Por outro lado, diversos pesquisadores concluíram que este loop não necessitava ser fosforilado para que houvesse ativação da Pho85p (NISHIZAWA et al., 1999; WILSON; MAHRENHOLZ; ROACH, 1999). Nishizawa et al. (1999) descreveram que o resíduo importante para a ativação parece ser a Thr (em negrito), portanto a função destas Cdks estaria preservada. O domínio rico em glicinas que compreende os aminoácidos 14-GNGTYATVY-22 (NISHIZAWA et al., 1999) possui mais de uma alteração na enzima de N. crassa, bem como nas enzimas dos outros fungos comparados.

Analisando a seqüência protéica de *N.* crassa e a dos outros fungos observamos que o domínio rico em glicinas de *N. crassa* está levemente deslocado em relação ao de *S. cerevisiae* e há duas alterações em seus resíduos, de Asn15 na levedura para Glu18 no fungo, e de Tyr22 para Phe25. Porém, foi o resíduo Tyr18

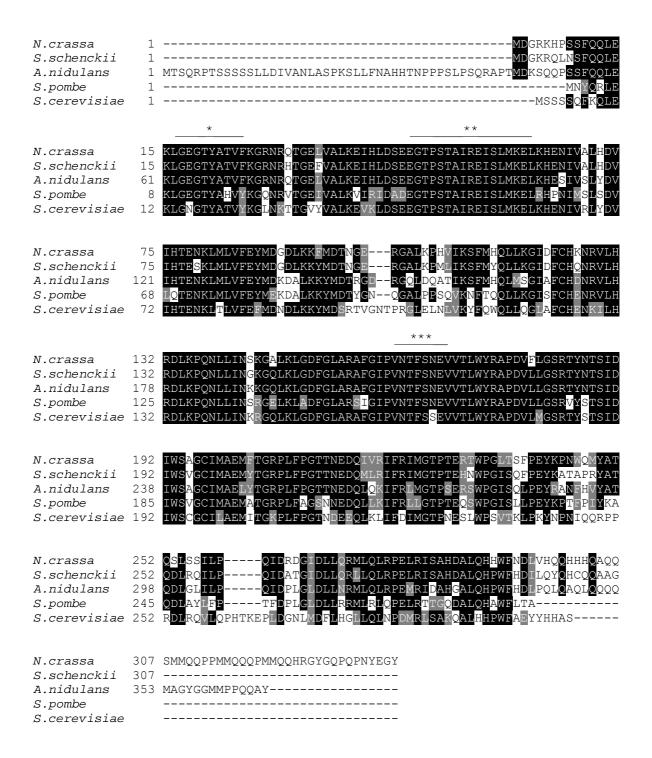


Figura 11 - Alinhamento de seqüências de proteínas semelhantes a Pho85p de S. cerevisiae de diferentes organismos. O alinhamento foi realizado com o programa ClustalW, e a identidade e similaridade foram determinadas por Boxshade. Os aminoácidos idênticos estão em negro e as trocas conservativas estão representadas em cinza. As seqüências de aminoácidos correspondentes aos domínios rico em glicina (*), PSTAIRE (**) e T-loop (***) estão indicados.

da levedura que mostrou ser importante na ligação à ciclina Pho80p (NISHIZAWA *et al.*, 1999) e este aminoácido está conservado na proteína de *N. crassa*.

Santos et al. (1995) descreveram uma região de aproximadamente 100 aminoácidos na extremidade C-terminal que seriam essenciais para a função e especificidade da Pho85p na levedura, porém a partir do resíduo 194 da proteína da levedura há uma região pouco conservada entre as proteínas semelhantes a Pho85p analisadas neste alinhamento. Uma seqüência descrita por interagir com as ciclinas e por ligar-se a fosfato compreende a seqüência de aminoácidos 36-KEVKLD-41 (SANTOS et al.1995) e na proteína de N. crassa os resíduos nesta região são 39-KEIHLD-44. Podemos observar que os resíduos de aminoácidos Val38 e Lys39 na levedura são Ile41 e His42 na seqüência do fungo.

O isolamento da seqüência genômica do gene foi realizado utilizando uma biblioteca genômica de *N. crassa* construída em vetor λ e como sonda o fragmento de aproximadamente 1,1 kb do cDNA marcado radiativamente (descrito anteriormente). O rastreamento foi realizado através de três ciclos de hibridização e após os ciclos foram obtidas cinco amostras de vírus, as quais foram utilizadas para infectar células da linhagem bacteriana de *E. coli* BNN132. Esta linhagem de bactéria foi utilizada para a obtenção dos plasmídeos contendo os insertos através de excisão plasmidial. Após a excisão plasmidial, os plasmídeos foram utilizados para transformar a linhagem de *E. coli* DH10B e os DNAs plasmidiais obtidos foram analisados por digestão com as endonucleases de restrição *Bam*HI e *Xho*I. A Figura 12 mostra que foram liberados dois fragmentos, um de aproximadamente 5 kb (plasmídeo) e outro de 5,5 kb, o qual corresponde ao fragmento genômico isolado da biblioteca λBARGEM7-2 a partir das cinco amostras de DNA viral.

Para verificarmos se o inserto selecionado continha o gene que codifica a proteína semelhante a Pho85p de *S. cerevisiae*, o sequenciamento parcial da região codificadora do gene e das regiões *upstream* e *downstream* à ORF foi realizado. O sequenciamento de DNA confirmou a presença do gene em todas as amostras de DNA plasmidiais. Um dos plasmídeos foi selecionado para o sequenciamento completo da região codificadora do gene e da região *upstream* à ORF. Após sequenciamento foi observado que a seqüência nucleotídica da região codificadora contém 1103 bp, a qual corresponde a ORF de 1014 bp e um *intron* de 89 bp. O sequenciamento também confirmou a presença dos nucleotídeos

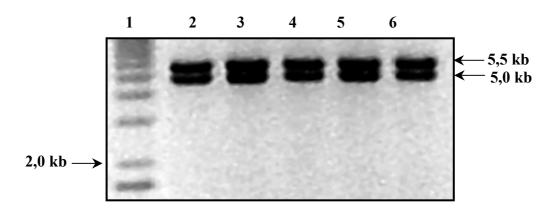


Figura 12 - Eletroforese dos plasmídeos isolados da biblioteca genômica λBARGEM7-2. A digestão foi realizada com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I. Linha 1: marcador de peso molecular de DNA, 1kb *ladder*. Linhas 2 a 6: amostras dos diferentes DNAs plasmidiais.

Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5% em tampão TAE 1x.

gt e ag nas extremidades 5' e 3' do *intron*, respectivamente, como os sítios doadores e aceptores de *splicing* (Figura 13).

A região *upstream* apresentou um tamanho de 1131 bp, como podemos observar na figura. Os sítios *Smal*, *Kpnl* e *Eco*RI presentes da região de clonagem múltipla do vetor foram identificadas na região *upstream*. Nesta região foram identificadas cinco seqüências ricas nos nucleotídeos A e T, sendo uma delas a provável seqüência TATA box (AAATTTAAA) (destacadas em lilás). Estas seqüências estão localizadas muito distantes do códon de iniciação (ATG). Um provável sítio CAP (TTCAG) foi localizado 238 bp antes do códon de iniciação (ATG) (destacado em azul), o qual também está presente na seqüência do cDNA isolado anteriormente e que pode levar à conclusão de que o cDNA isolado possa estar completo. Uma seqüência Kozak (AAGCCATGGA) foi identificada, a qual é importante para o início da tradução (KOZAK, 1986), e está destacada em verde.

A região *downstream* à ORF foi parcialmente seqüenciada e apenas 999 bp de um total aproximado de 3,3 kb foram seqüenciados. Nesta região foi identificado um provável sítio de poliadenilação (AAATAAT), o qual havia sido previamente identificado na seqüência do cDNA. Nesta região é importante salientar a existência de uma ORF, na qual o provável sítio de poliadenilação está contido. Esta ORF de 570 nucleotídeos codifica uma proteína de 189 resíduos de aminoácidos, a qual foi anotada como uma *putative protein* e o gene de xnc086_110 (http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/singleGeneReport.html?entry=xnc086_110).

II - Análise da expressão gênica

II.1. Análise da expressão gênica por Northern blot

Com o objetivo de determinarmos a expressão do gene *Ncpho85* durante o crescimento vegetativo do fungo, células da linhagem selvagem (FGSC 424, A) foram crescidas em dois meios de cultura líquidos (meio VM e meio Fries, pobre em fosfato), e o micélio foi coletado em diferentes tempos de crescimento. O RNA total foi extraído a partir de conídios coletados para representar o tempo zero, e a partir de amostras coletadas nos tempos de 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas de

```
Smal Kpnl EcoRI
TTCGAACCCGGGGTACCGAATTAGTAACGCTTAAATTACTTTAATCCTATAGTAGTAGGCTATATTTAATTAGGT -1079
TTATTATAATTAGAATATTCGGGAGAATACTAAATTTAAACAAGAGGAAGGGTAAATTAAATACAAATATAAAAA -929
GGTTATTAAATTAAAATTAGAACGGCCGTTTCCTAGAACGAATAGTAAATTATATCGAATAAATTAAGCGTCGTAG -854
CGCTCTAATTAGAATTACGGAGAATAAAAACAAATATATTACCGTATTACGACTTTAGGGGGTTTCGTTCTAGTAA -704
AAGTAAATAATTAGAATTAAGGNGTATCTTAACTCTNACTAGAGCAGAGTTCAATTGCAATAGTTGGGCCCCACA -629
AGGTTAGTGGGTNTGACTGAGANTACTGCTGTACCTGAGGTCCCCANTGCCCTTCNTGGCGCGCCCGACCCAA -479
CTGAACCCAAACCAACCCAGGGCAACCTTATTTCCCCTTCCATGTCCACGTTTGACCCTTCCACCATCCGTC -404
CTCATTCCGACATCCACGCCCGACCCTTCCACCGCCTGCGAACATCTACCGTACACCATCTCCCATAAAGTNTGA -329
\texttt{ACCGCCTCTCCCATACCGGCCTACGATCGCCA} \underline{\textbf{c}} \texttt{TCCCATCTTCACACTGTTCTAGACGTGTTAGATTTATCGGCG} - 254
CAGAGACTGCTTCAGTGCATCTCTCCATCACGGCTTCTCACGGGCGACAGCTGCCTGACCAACAAGACCC -179
AACAGGCGGCGAATCCCCCAATCCCCTGCGCAAGACGGTCACTATTGGCTCTGTACTTTTCAACCGCGCCCCATAC -104
GACCCAGCGACAACCTTCGCCACATCCTCATTATCTAGTCCAACAGTCCTCCGTTTCTTCAACCACAGCCCAGTC -29
GGATCTATCTTCGGCACTCAGAGAAGCCATGGACGGCAGGAAACACCCAAGTTCTTTCCAGCAGCTTGAAAAGCT +47
\tt GGGAGAGGGTACTTATGCTACT \textbf{\textit{gt}} aagagatctctccttggcccagaactgtccctcggtgaacagggagaagta
\textbf{Tttgtagggtgcaaatggctgacactacgtcctc} \textbf{\textit{ag}} \texttt{GTCTTCAAAGGCCGCAACCGACAGACGGGCGAGCTTGTA}
GCTCTCAAGGAGATTCACCTTGACTCGGAAGAGGGGACACCGAGCACGGCAATCCGCGAGATCTCGCTCATGAAA
GAACTGAAGCACGAGAACATTGTTGCTCTACACGATGTTATTCACACCGAGAACAAGCTTATGTTGGTGTTTTGAG
TACATGGATGGCGATCTTAAAAAGTTTATGGACACCAACGGCGAGAGGGGGAGCCCTCAAGCCACATGTCATCAAG
TCCTTCATGCATCAGTTGCTCAAGGGTATTGACTTCTGCCACAAGAACAGGGTCCTACATCGAGACCTGAAGCCG
\tt CAGAACCTCCTTATCAACAGCAAGGGCGCTCTGAAAGCTGGGTGATTTCGGTTTGGCGAGAGCATTCGGTATTCC
{\tt AGTCAACACCTTTTCGAATGAGGTCGTCACTCTTTGGTATCGAGCTCCCGACGTGCTTCTTGGAAGTAGAACCTA}
{\tt CAACACCAGCATCGACATTTGGTCCGCGGGATGTATCATGGCTGAGATGTTCACCGGCAGGCCTTTGTTTCCCGG}
CACCACTAACGAGGATCAGATTGTTCGCATTTTTAGGATAATGGGCACGCCGACGGAACGTACATGGCCTGGCCT
TGACCGCGACGGCATCGACTTGCTTCAGCGGATGCTACAGTTGCGGCCCGAATTGCGAATCTCGGCTCACGATGC
GCTTCAACACCACTGGTTCAACGACCTGGTCCACCAACAGCATCATCACCAAGCGCAGCAGTCAATGATGCAACA
ACCGCCGATGATGCAGCAACAGCCAATGATGCAGCAACATAGAGGCTACGGACAGCCGCAACCCAACTACGAGGG
CTACTAGACAGAGTACCTTCCAAAAACCGGAAGGCAGACACCGCCGGTTTTGGGGGTTTCCTCCACCAGTTTTGTG +1171
GCATCGACCGATGCCAGTAGTGTCAGGATCTCCTCCACCAGGATTCAAGAAGAATTTGGGAGCAACTGATGCCAG +1246
TAAGAGAGGGCTACTACACCGAAGAGCAGTTTCTAGGAGAGCGAACAATGCCAGGGGTATCCTCCACCAGGGAGAT +1321
ATCCTCAACCGATACCCGGACATCCTCCAGCATGGAGAAATTATCCATCAATACCCGGACATCCTCCAGCATGGA +1396
AATATTCTCAACCAATGCCCGGGCATCCTCTACGTGGGGAACATCCGCAACCGATGTCATGGTATCCTTCAAACC +1471
CAATGGCGTGGAAAGGAAATTTCAAGAGTGGCAATTCTAAATTGGACATGTCACGGCGGTCACTGCCCGTGGACC +1621
CCAGTCTCAACCCGTTTCAACATGATAATGGACAGCG<mark>AAATATAA</mark>TGGTGCCACACAGGCCCCCAATACAAACAG +1696
GTGTAATGGGTGATGGACACCCAAATGCGATGCCGCCGCGATTTCAGTTGCTTCAGTCATCTTTCATGCCTCCGG +1771
TCCCCCCTCCTCCACCGGCCTTATCGAGGTTACCGGCGTCACATGAGCCTCGACATAAACAGATTGAATTTCCAC +1846
GAAGTTTCCAATATTAATTCATGATGTGAATGGTCCCGGACCTAACGCTGGAAAGAGAAGTTCATCTGTTTTCAG +1921
TTTGAGAAGCTGCCGCCTGGTTCTCGATCATTCCGGACAAGAACATACGCCGATGTTGCACGTTCCTCAAGCTTT +1996
GGATGGTCATTATCTACAAAACGGGGGCATA
                                                                    +2102
```

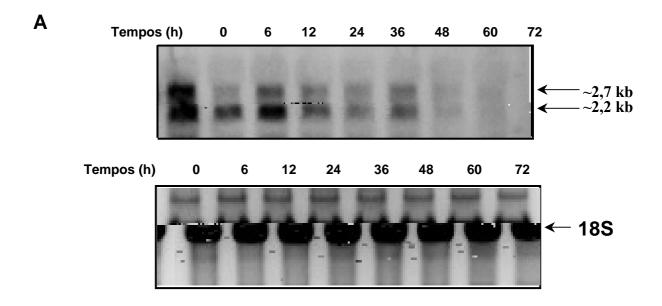
Figura 13 - Seqüência nucleotídica completa do fragmento de DNA isolado após excisão plasmidial pBARGEM-Ncpho85. A seqüência mostra a ORF que codifica a proteína semelhante a Pho85p de *S. cerevisiae* em *N. crassa*, o *intron* e as seqüências das regiões *upstream* e *downstream*. A região 5'-UTR contida na seqüência do cDNA inicia-se no <u>C</u>. Em destaque observamos os prováveis: TATA box (lilás), sítios CAP (azul), seqüência Kozak (verde), sítio de poliadenilação (grifado em amarelo), gene xnc086_110 (vermelho). O nucleotídeo A do códon de iniciação ATG foi considerado como o nucleotídeo +1.

crescimento. A expressão do gene foi analisada através de *Northern blot* e os resultados estão mostrados nas Figuras 14 e 15, em meio VM e em meio Fries, respectivamente. Os resultados mostraram a presença de duas bandas de hibridização sendo a inferior de 2,2 kb, a qual, muito provavelmente, corresponde ao transcrito do gene *Ncpho85*.

Uma outra banda de hibridização, de aproximadamente 2,7 kb foi também identificada, a qual foi verificada em diferentes experimentos utilizando diferentes preparações de RNA. Portanto, a presença desta banda de hibridização não pode ser atribuída à qualidade das preparações de RNA utilizadas. Como relatado anteriormente, a presença das seqüências TATA box na região *upstream* à ORF foram identificadas muito anteriormente ao códon de iniciação da ORF (de -900 a -700), o que não é característico da maioria dos genes em fungos. Entretanto, um outro códon de iniciação (em negrito na Figura 13) foi identificado mais próximo à seqüência TATA box, o qual poderia estar presente em outro transcrito do gene de tamanho maior. A presença do transcrito de maior massa molecular observado nas figuras 14 e 15 poderia, portanto, ser explicada considerando a existência de dois sítios de início da transcrição distantes entre si em aproximadamente 450 nucleotídeos. Para comprovar esta suposição os sítios de início da transcrição do gene *Ncpho85* devem ser identificados.

O gene *phoA* de *A. nidulans* foi identificado por codificar duas proteínas quinases (PHOA^{M1} e PHOA^{M47}), as quais contêm o *motif* PSTAIRE e, provavelmente, são resultado de um *splicing* alternativo do RNAm. Neste gene um *intron* localizado na região 5′-UTR contém um ATG adicional, o que deve iniciar a síntese da proteína maior. A proteína PHOA^{M1} seria codificada pelo mesmo gene que a proteína PHOA^{M47}, mas com outro sítio de início de transcrição (BUSSINK; OSMANI, 1998). Baseado no que foi descrito para *A. nidulans* seria possível supor que o transcrito de maior peso molecular para o gene *Ncpho85* seria produto do mesmo gene, mas com outro sítio de início da transcrição.

Para aumentar a especificidade da análise da expressão, uma sonda menor de 383 bp, correspondente à seqüência dos nucleotídeos finais da extremidade 3´ do cDNA, a qual codifica uma seqüência de aminoácidos pouco conservada entre as quinases analisadas, foi também utilizada. Neste caso, as duas bandas de hibridização também foram observadas. Em todas as análises foi possível observar uma maior intensidade dos dois transcritos em 12 horas de cultivo. Nos tempos de



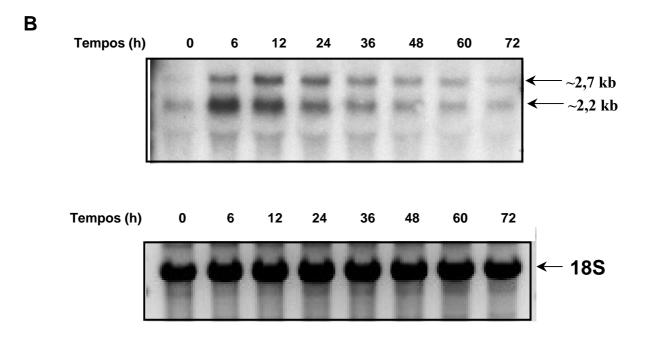


Figura 14 – Análise da expressão do gene *Ncpho85* durante o crescimento em meio VM através de *Northern blot*. Os números indicam os tempos de crescimento de: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h. (A) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 1,0 kb do cDNA; (B) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 350 bp correspondente à extremidade 3´ da ORF. As amostras de RNA foram fracionadas em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2%, transferidas para membrana de nylon neutra e hibridizadas nas condições descritas em Materiais e Métodos.

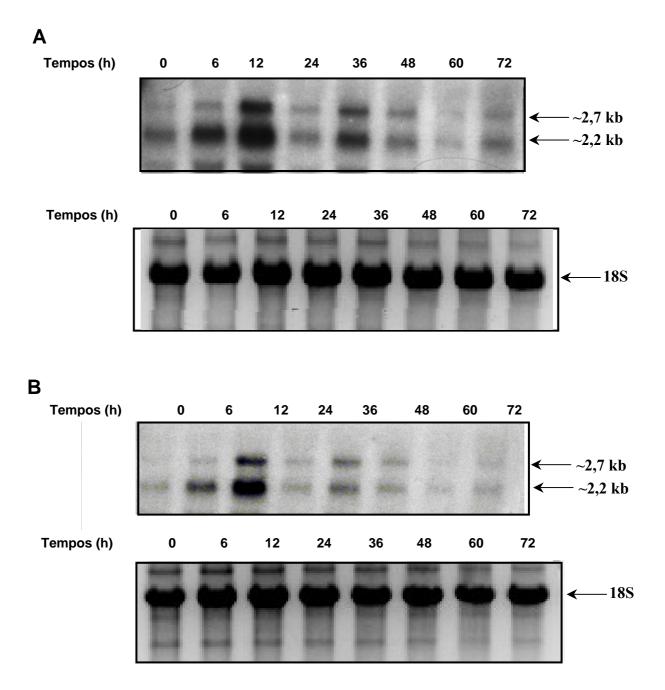


Figura 15 – Análise da expressão do gene *Ncpho85* durante o crescimento em meio Fries através de *Northern blot*. Os números indicam os tempos de crescimento de: 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72 h. (A) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 1,0 kb do cDNA; (B) Preparações de RNA 18S (painel inferior) e autoradiografia do gel (painel superior) utilizando como sonda o fragmento de 350 bp correspondente à extremidade 3´ da ORF. As amostras de RNA foram fracionadas em gel de agarose 1,5% contendo formaldeído 2%, transferidas para membrana de nylon neutra e hibridizadas nas condições descritas em Materiais e Métodos.

crescimento anteriores e posteriores a 12 horas os níveis dos transcritos foram menores. Este pico em 12 horas foi mais evidente quando o fungo foi cultivado em meio pobre em fosfato (meio Fries). O transcrito de menor massa molecular (2,2 kb) apresentou bandas mais intensas, o que leva à conclusão de que há maior quantidade deste transcrito, o qual provavelmente seria o transcrito correspondente ao cDNA isolado no rastreamento da biblioteca de cDNA.

Frente a estes resultados tornou-se importante determinar se duas proteínas são produzidas a partir dos dois transcritos. Para isto, a proteína codificada pela ORF de 1,1 kb foi produzida na forma recombinante em *E. coli* e utilizada para produzir anticorpos em coelhos (resultados descritos nos itens V e VI). A expressão da proteína foi analisada por *Western blot*.

II.2. Análise da expressão da proteína NcPHO85 por Western blot

Outra maneira de analisarmos a expressão do gene foi avaliar a expressão da proteína por *Western blot*. A extração das proteínas totais do fungo foi realizada a partir das amostras coletadas nos diferentes tempos de crescimento em meio VM. Os extratos protéicos foram fracionados por SDS-PAGE 12%, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e hibridizadas com o anticorpo anti-NcPHO85, produzido em coelho. A seqüência nucleotídica da ORF do gene *Ncpho85* contém 1014 bp e a proteína codificada por esta possui 337 aminoácidos, portanto, o peso molecular predito da proteína NcPHO85 é de aproximadamente 38 kDa.

Uma análise da expressão da proteína ao longo do crescimento vegetativo do fungo está mostrada na Figura 16. Podemos observar que quando utilizamos apenas conídios, tempo zero de crescimento, a expressão da proteína foi baixa, ocorreu um aumento bastante significativo em 6 horas de crescimento, atingindo um pico em 12 horas, diminuindo em 24 horas e estabilizando em 36 horas. Esta expressão obedece a um perfil semelhante ao observado no nível do transcrito do gene *Ncpho85* (banda inferior de 2,2 kb) nos dois meios de cultura utilizados (Figuras 14 e 15). Uma banda de hibridização de aproximadamente 40 kDa foi observada, o que leva à conclusão de que apenas uma proteína é traduzida como produto da expressão do gene *Ncpho85*. Outra banda de hibridização de tamanho muito inferior, aproximadamente 25 kDa, foi observada em todas as amostras

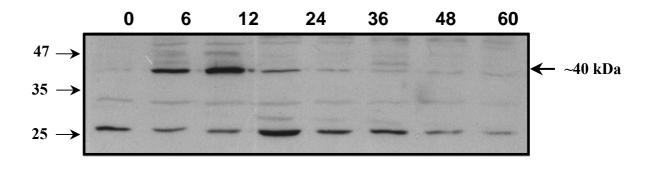


Figura 16 - Análise da expressão da proteína NcPHO85 durante o crescimento em meio VM por Western blot. Quantidades de 40 μg dos extratos protéicos correspondentes aos tempos de 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas, foram aplicadas no gel SDS-PAGE 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e hibridizada com anticorpo anti-NcPHO85 (1:1000) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase. Os valores de peso molecular (PM) estão indicados em kDa. As condições de hibridização e revelação da proteína estão descritas em Materiais e Métodos.

analisadas, muito provavelmente resultado de hibridização inespecífica, uma vez que a proteína utilizada na produção dos anticorpos não estava totalmente pura. Esta análise é preliminar e novas análises deverão ser realizadas para confirmar a presença de apenas uma proteína. Se a presença de apenas uma proteína for confirmada podemos dizer que a regulação da expressão do gene em *N. crassa* é diferente da que ocorre no fungo *A. nidulans*, no qual duas proteínas são sintetizadas como produto da expressão do gene *phoA* (BUSSINK; OSMANI, 1998).

III – Inativação do gene Ncpho85:

III.1. Inativação gênica mediada por RIP

A primeira técnica de inativação gênica utilizada foi RIP, a qual baseia-se na introdução de uma cópia extra do gene a ser inativado, através da transformação de uma linhagem do fungo (SELKER, 1990). Transformantes contendo uma cópia adicional introduzem mutações pontuais na seqüência genômica quando submetidos a cruzamento seguido de meiose (WATTERS et al., 1999). As mutações são principalmente do tipo C→T, as quais podem levar a trocas de aminoácidos e eventualmente à introdução de códons de terminação da tradução em ambas cópias da seqüência duplicada (CAMBARERI; SINGER; SELKER, 1991). Para isto realizamos a subclonagem da cópia genômica do gene Ncpho85 no vetor pMSN-1 e utilizamos o plasmídeo para transformar conídios da linhagem selvagem FGSC 3957 (A) por eletroporação. Os DNAs genômicos dos clones transformantes foram extraídos, quantificados e digeridos com a endonuclease de restrição EcoRI, devido a ausência de sítios desta enzima no gene Ncpho85. Estes DNAs foram analisados para a presença de cópia extra do gene Ncpho85 pela técnica de Southern blot (Figura 17). Como controles positivos foram utilizados o DNA genômico da linhagem não transformada e o DNA plasmidial pMSN1-Ncpho85. Podemos observar na autoradiografia a presença de duplas cópias do gene em cinco dos clones transformantes analisados, os clones numerados como 3, 9, 10, 11 e 15.

Um transformante contendo a dupla cópia do gene de interesse, o clone 9, foi utilizado para o prosseguimento da inativação, sendo este submetido ao cruzamento com uma linhagem do fungo de *mating type*

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15

Figura 17 - Southern blot dos clones após transformação. DNA genômico de 13 clones foram digeridos e analisados para a apresença de duplas cópias do gene *Ncpho85*. Linha 1: pMSN1-*Ncpho85*, linha 2: linhagem selvagem, linhas 3 a 15: DNA dos clones transformantes. O DNA foi digerido com a enzima *Eco*RI, fracionado em gel de agarose 1% e transferido para membrana de nylon Hybond-N⁺ e hibridizado nas condições descritas em Materiais e Métodos.

segregantes foram selecionados para a extração de DNA genômico. As seqüências genômicas de seis clones foram amplificadas por PCR e subclonadas no vetor pMOSBlue. Os plasmídeos resultantes foram utilizados nas reações de sequenciamento para analisar a introdução de mutações pontuais ao longo da següência genômica. Após o sequenciamento foi verificado que o processo de RIP levou à introdução de algumas mutações pontuais no gene, entretanto, nenhuma mutação levou à introdução de stop codon prematuro. Para intensificar as mutações, foi realizado um novo cruzamento entre o clone que contém a dupla cópia do gene e um dos segregantes apresentando mutações pontuais. Este segundo cruzamento resultou em um segregante com uma mutação que levou à introdução de um stop codon no resíduo de aminoácido 166 da seqüência polipeptídica. As seqüências nucleotídica e polipeptídica do clone phorip estão representadas na Figura 18. Podemos observar quatro trocas nucleotídicas, sendo que na posição 497 houve a troca entre C→A, a qual gerou um códon de terminação (TCG→TAG). Sendo assim, células deste clone (phorip) devem produzir uma proteína truncada com aproximadamente metade da següência polipeptídica da proteína nativa. Duas das trocas nucleotídicas ocorreram antes do stop codon inserido, porém não alteraram o aminoácido codificado pela trinca. Por outro lado, a última troca nucleotídica levou a uma alteração do aminoácido codificado, mas este se encontra após o stop codon. Uma das observações importantes dos nossos resultados é de que o *motif* PSTAIRE não foi alterado e está presente na proteína truncada, assim como o domínio rico em

				G T Y A T GGTACTTATGCTAC	
				D S E E G GACTCGGAAGAGGG	
				V A L H D GTTGCTCTACACGA	
				K F M D T AAGTTTATGGACAC	
			~	K G I D F AAGGGTATTGACTT	
				K G A L K AAGGGCGCTCTGAA	
				V V T L W	
				S A G C I	
				V R I F R GTTCGCATTTTAG	
				PNWQM CCTAACTGGCAAAT	
~		~		L Q R M L CTTCAGCGGATGCT	~
				D L V H Q	_
				P M M Q Q CCAATGATGCAGCA	
G Y G Q P GGCTACGGACAGCC	~	-			337

Figura 18 - Seqüência nucleotídica e polipeptídica do gene *Ncpho85* do clone *pho^{rip}*. Os nucleotídeos trocados (posições 12, 465, 497, 538) estão em negrito e sublinhados e o *stop codon* introduzido pela mutação está sublinhado e representado por asterisco.

a troca entre dois fragmentos de DNA, desde que estes possuam regiões flanqueadoras iguais ou muito semelhantes (Figura 8). Para isto, o fragmento de 1 kb das regiões *upstream* e *downstream* à ORF, contendo aproximadamente 20 bp do gene *hph* (resistência à higromicina) em uma das suas extremidades foram amplificadas por PCR, gerando fragmentos de 950 bp e 1050 bp, respectivamente. O mesmo procedimento foi realizado com o gene *hph*, gerando um fragmento de aproximadamente 2,8 kb, também contendo aproximadamente 20 bp do gene *Ncpho85* em ambas extremidades. Os três fragmentos resultantes foram submetidos a uma PCR de fusão gerando um único produto de PCR de aproximadamente 5 kb. Na Figura 19 podemos visualizar os fragmentos resultantes da PCR por eletroforese em gel de agarose. Na Figura 19A podemos observar os fragmentos de 950 bp e 1050 bp das regiões *upstream* e *downstream* à ORF, linhas 1 e 2, respectivamente, e na Figura 19B, visualizamos o fragmento de 2,8 kb referente ao gene *hph*.

Os três fragmentos citados foram submetidos a uma PCR de fusão e obtivemos um único fragmento de aproximadamente 5 kb (Figura 19C). Este fragmento resultante foi subclonado no vetor pMOSBlue e sequenciado, confirmando a presença dos três fragmentos de origem unidos em um único fragmento maior. Este fragmento de aproximadamente 5 kb foi utilizado para transformar conídios da linhagem (FGSC 9781) de N. crassa. Nesta linhagem o processo de inserção ectópica é reduzido o que favorece eventos de recombinação homóloga por crossing over. Foram isolados 12 clones transformantes diferentes, os quais foram selecionados em meio contendo higromicina. Dentre os clones isolados sete possuem alterações morfológicas notáveis. Entretanto, a seqüência nucleotídica do gene após recombinação homóloga ainda não foi determinada em nenhum dos clones selecionados.

IV - Análise do mutante obtido por RIP

O clone resultante do processo de RIP foi avaliado pela taxa de crescimento em meio sólido utilizando *race tubes* (Figura 20). Células das linhagens selvagem e mutante foram rejuvenescidas e hifas (7 a 10 dias de crescimento) foram inoculadas em uma das extremidades dos tubos, o crescimento foi monitorado a cada 24 horas até a linhagem selvagem atingir o final do tubo. A taxa de crescimento foi expressa

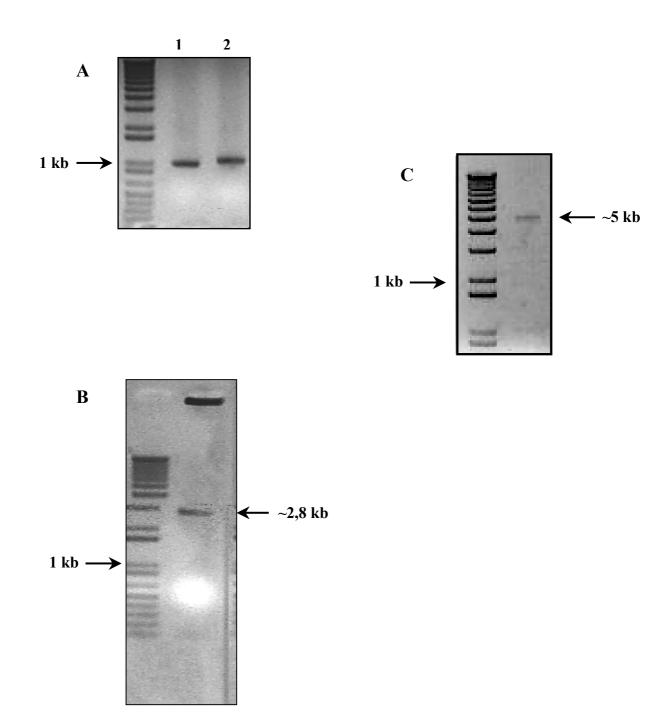


Figura 19 - Eletroforese dos fragmentos de DNA utilizados para a recombinação homóloga. (**A**) Fragmentos amplificados das regiões 5'- (950 bp) e 3'-UTR (1050 bp) do gene *Ncpho85* linhas 1 e 2, respectivamente. (**B**) Fragmento amplificado do gene *hph* de 2,8 kb. (**C**) Produto da PCR de fusão, contendo o fragmento de aproximadamente 5 kb. Eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo brometo de etídio 0,5% em tampão TAE 1x.

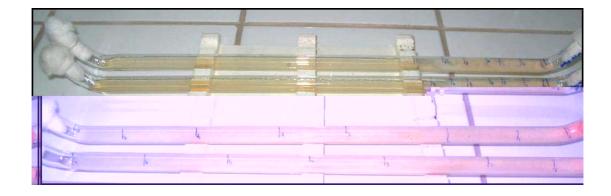


Figura 20 - Avaliação do crescimento das linhagens mutante e selvagem em *race tubes.* Os dois tubos superiores mostram o crescimento da linhagem mutante *pho^{rip}* e os dois tubos inferiores mostram o crescimento da linhagem selvagem, ambos em meio VM a 25°C.

em mm/dia. A Figura 21 mostra os gráficos do crescimento das linhagens selvagem e mutante. O crescimento apresentado pela linhagem *phorip* comparado ao apresentado pela linhagem selvagem, no sétimo dia, foi de aproximadamente 30% nos experimentos realizados em meio VM a 25°C (Figura 20A). Com isso foi possível verificar o reduzido crescimento da linhagem mutante em relação à selvagem. Nos experimentos realizados em meio VM a 37°C (Figura 20B), a linhagem selvagem apresentou um crescimento mais rápido (maior taxa de crescimento nesta temperatura) quando comparado a 25°C, enquanto que a mutante foi incapaz de crescer nestas condições. No meio de cultura suplementado com extrato de levedo 2% a 25°C (Figura 20C), a linhagem selvagem apresentou padrão semelhante ao meio VM a 37°C, enquanto que a mutante apresentou um ligeiro crescimento no primeiro dia e, em seguida, não mostrou um avanço no crescimento.

Linhagens da levedura *S. cerevisiae* contendo o gene *PHO85* inativado também apresentam alteração da morfologia celular e defeitos no brotamento (MEASDAY *et al.*, 1997). Portanto, era esperado que a linhagem mutante de *N. crassa* obtida no procedimento de RIP também apresentasse defeitos no crescimento celular. Além disso, este mutante *pho*^{rip} é termosensível.

V - Produção da proteína NcPHO85 na forma recombinante em *E. coli*

Ao analisarmos a expressão do gene *Ncpho85* ao longo do crescimento do fungo *N. crassa*, nos experimentos de *Northern blot*, detectamos a presença de duas bandas de hibridização, tornando-se necessária a análise da expressão da proteína NcPHO85. Para isto, a proteína na forma recombinante foi produzida em *E. coli* e anticorpos foram produzidos em coelhos utilizando a proteína purificada. Para a obtenção da proteína recombinante a ORF do gene *Ncpho85* foi subclonada no vetor pET-28a e o plasmídeo resultante utilizado para transformar células de *E. coli*, linhagem BL21(DE3). Clones bacterianos produzindo a proteína foram analisados em relação à presença da proteína: se solúvel (no sobrenadante) ou insolúvel (corpos de inclusão). Para a análise da solubilidade da proteína recombinante, a indução da expressão foi realizada com adição de 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG durante 5 e 4 horas, respectivamente, e nas temperaturas de 30 e 37°C. Para verificarmos em qual condição a proteína recombinante seria mais solúvel, a presença da proteína foi avaliada em gel de poliacrilamida 12% (Figura 22). Foi

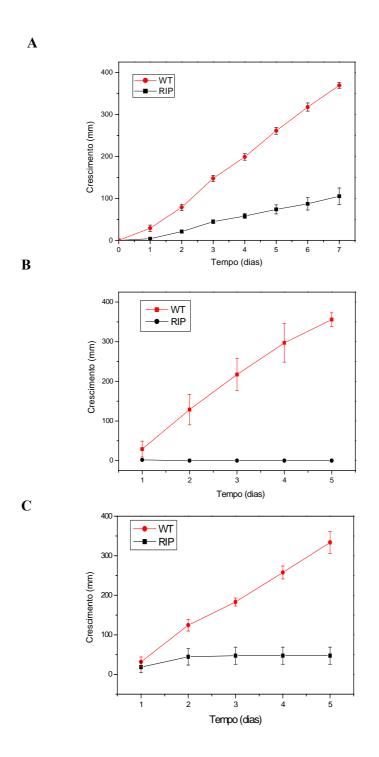


Figura 21 - Crescimento das linhagens selvagem e mutante. (**A**) Crescimento da linhagem selvagem (WT) e da mutante (RIP) em meio VM contendo sacarose 2% na temperatura de 25°C, (**B**) Crescimento em meio VM contendo sacarose 2% na temperatura de 37°C, (**C**) Crescimento em meio VM contendo sacarose 2% com adição de extrato de levedo 2% na temperatura de 25°C. O crescimento foi avaliado pela extensão das hifas aéreas em *race tubes*.

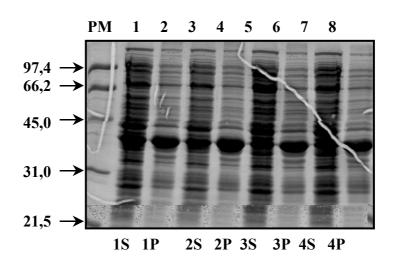


Figura 22 - Análise da solubilidade da proteína His6-NcPHO85 recombinante produzida em *E. coli*. Eletroforese SDS-PAGE das frações coletadas dos sobrenadantes (S) e dos precipitados (P) nas quatro condições: 1- (0,1 mM de IPTG, 30°C); 2- (0,4 mM de IPTG, 30°C); 3- (0,1 mM de IPTG, 37°C) e 4- (0,4 mM de IPTG, 37°C). PM, peso molecular em kDa (Invitrogen). As condições de produção da proteína estão descritas em Materiais e Métodos.

observado que a condição de 0,1 mM de IPTG e temperatura de 30°C durante 5 horas foi a condição de expressão escolhida, pois mostrou uma boa quantidade da proteína na forma solúvel (Figura 22, linha 1).

Utilizando estas condições, a proteína recombinante foi produzida em maior quantidade (1 L). As células foram lisadas e uma alíquota do extrato bruto (EB) foi removida. Em seguida, o extrato foi centrifugado e alíquotas do precipitado (P) e do sobrenadante (S) foram também removidas. O sobrenadante, contendo a proteína fusionada à cauda de poli-His foi utilizado para a purificação da proteína por cromatografia de afinidade. O perfil cromatográfico da purificação está mostrado na Figura 23. As frações EB, sobrenadante, precipitado antes da purificação e as frações coletadas durante a purificação (FT, flow through e frações após eluição com imidazol) foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 24). Podemos observar que as frações coletadas após eluição com imidazol apresentaram grande quantidade da proteína recombinante, entretanto vários contaminantes protéicos estavam presentes. A proteína encontrou-se razoavelmente pura nas frações de 6 a 10. Os conteúdos destes tubos foram misturados e o volume final foi dialisado duas vezes para a remoção de imidazol. Após diálise, a proteína foi quantificada e armazenada a 4°C, para posterior utilização.

VI – Produção e análise de anticorpos anti-NcPHO85

A produção dos anticorpos foi realizada utilizando coelhos jovens, os quais foram imunizados com a proteína recombinante. Uma alíquota de sangue antes da imunização (soro pré-imune) foi removida do animal. Uma semana após a quarta injeção, a sangria total do animal foi realizada através de punção cardíaca. O soro contendo o anticorpo foi analisado por *Western blot*, utilizando a proteína recombinante produzida em *E. coli* e o soro nas diluições de 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000. O soro pré-imune foi utilizado como controle, nas mesmas diluições citadas. Na Figura 25 está mostrado o resultado do *Western blot* para a titulação do soro, no qual podemos observar que o so

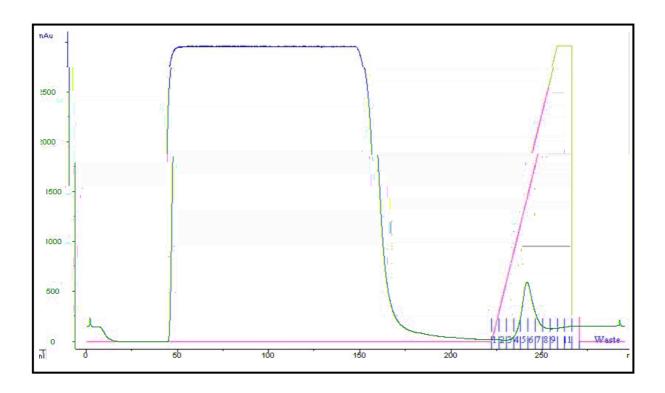
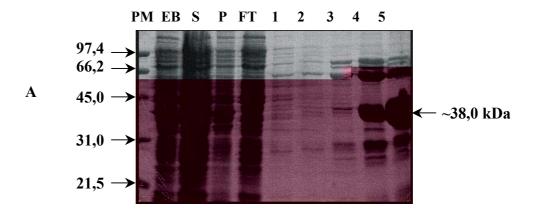


Figura 23 - Perfil cromatográfico da purificação da proteína recombinante NcPHO85 produzida em *E. coli*. A proteína foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna cromatográfica de Ni²⁺ *HiTrap Chelating* (Amersham). A eluição foi realizada em gradiente de imidazol (0 a 500 mM). Frações de 4 mL foram coletadas durante a eluição.



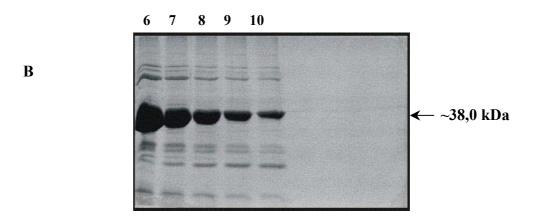


Figura 24 - Análise das frações obtidas durante a purificação da proteína His6-NcPHO85 recombinante. Eletroforese SDS-PAGE 12% das frações EB (extrato bruto), S (sobrenadante), P (precipitado), e FT (*flow-throught*), e das frações 1 a 10, após eluição. (A) Gel contendo EB, S, P, FT, e frações 1 a 5. (B) Gel com as frações 6 a 10. A seta indica a proteína recombinante com aproximadamente 38 kDa. PM, peso molecular em kDa (Invitrogen).

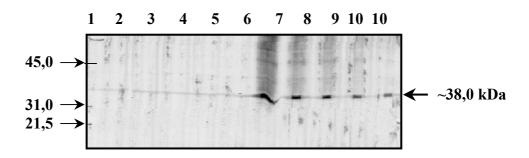


Figura 25 – Titulação do anticorpo anti-NcPHO85 produzido em coelho. Quantidades de 20 μg, por canaleta, da proteína recombinante foram fracionadas em gel SDS-PAGE 12%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e hibridizada com o anticorpo anti-NcPHO85, sendo que, as canelatas de 1 a 5 foram aplicadas amostras do soro pré-imune nas diluições 1:100, 1:500, 1:1000, 1:2000 e 1:5000, respectivamente, e nas canaletas de 6 a 10 foi utilizado o soro após imunização, nas mesmas diluições. Posteriormente, a membrana foi hibridizada com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase. A seta indica a proteína recombinante com aproximadamente 38 kDa. As condições de hibridização e revelação da proteína estão descritas em Materiais e Métodos.

Conclusões

As principais conclusões deste trabalho foram:

- Um cDNA de aproximadamente 2 kb foi isolado (*Ncpho85*), o qual possui uma ORF com 1014 bp e codifica uma proteína de 337 aminoácidos (NcPHO85), a qual apresenta homologia a outras proteínas semelhantes à Pho85p existentes em bancos de dados. Na seqüência da proteína NcPHO85 foram identificados: o domínio PSTAIRE, o domínio rico em glicina e o domínio T-*loop*, os quais estão presentes na seqüência da proteína da levedura *S. cerevisiae*, a proteína melhor estudada até o momento.
- Utilizando a seqüência da ORF como sonda, um fragmento de aproximadamente de 5,5 kb do DNA genômico foi isolado. O gene *Ncpho85* foi sequenciado e a seqüência obtida foi comparada com a seqüência depositada em bancos de dados de *N. crassa* confirmando a presença de um *intron* (89 bp) no nucleotídeo 69. A região *upstream* à ORF também foi seqüenciada e contém 1131 bp, prováveis seqüências TATA box e sítios CAP foram também identificados. Além disso, a presença de outro provável códon de iniciação foi observada. A região *downstream* à ORF foi parcialmente seqüenciada (999 nucleotídeos desta região) e o provável sítio de poliadenilação foi identificado, além da presença de uma outra ORF, a qual contém o provável sítio de poliadenilação.
- A análise da expressão do gene ao longo do crescimento do fungo em diversas condições de crescimento foi realizada por *Northern blot*. A presença de duas bandas de hibridização foi observada, sendo um transcrito correspondente ao cDNA isolado e outro de maior massa molecular, o qual provavelmente seria o transcrito obtido a partir do códon de iniciação adicional. Este resultado tornou necessária uma análise da expressão da proteína.
- A proteína NcPHO85 recombinante foi expressa em *E. coli*, purificada e utilizada para a produção de anticorpos em coelhos. Os anticorpos anti-NcPHO85 foram utilizados em experimento de *Western blot*, no qual foi observada a presença de apenas uma banda de proteína do peso molecular esperado. Os resultados são preliminares, mas podemos concluir que, baseado nos dados obtidos, no fungo *N. crassa* apenas uma proteína é sintetizada como produto da expressão do gene *Ncpho85*.
- Uma linhagem mutante contendo o gene *Ncpho85* inativado pelo processo de RIP foi construída. Nesta linhagem, o gene *Ncpho85* produz uma proteína truncada de 165 resíduos de aminoácidos. Células do clone *pho^{rip}* apresentam

alterações morfológicas e reduzido crescimento. Uma outra metodologia (*gene replacement*) para a inativação do gene foi iniciada, na qual um gene de resistência foi inserido no genoma do fungo interrompendo o gene *Ncpho85*. Vários clones contendo alterações morfológicas bastante notáveis foram isolados e devem ser confirmados para a inativação do gene *Ncpho85*. Estes resultados são preliminares e necessitam de estudos futuros.

Referências

- BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic control of chemical reactions in *Neurospora*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 27, p. 499–506, 1941.
- BISTIS, G. N.; PERKINS, D. D.; READ, N. D. Cell types of *Neurospora crassa*. **Fungal Genetical Newsletter**, v. 50, p. 17–19, 2003.
- BRAUN, E. L.; HALPERN, A. L.; NELSON, M. A.; NATVIG, D. O. Large-scale comparison of fungal sequence information:mechanism of innovation in *Neurospora crassa* and gene loss in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genome Research**, v. 10, p. 416-430, 2000.
- 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, n. 12, p. 1309-18, 1993.
- BUSSINK, H. J.; OSMANI, S. A. A cyclin-dependent kinase family member (PHOA) is required to link developmental fate to environmental conditions to *Aspergillus nidulans*. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 14, p. 3990-4003, 1998.
- CAMBARERI, E. B.; SINGER, M. I.; SELKER, E. U. Recurrence of repeat-induced point mutation (RIP) in *Neurospora crassa*. **Genetics**, v. 127, n. 4, p. 699-710, 1991.
- CARROLL, A. S.; BISHOP, A. C.; DERISI, J. L.; SHOKAT, K. M.; O'SHEA, E. K. Chemical inhibition of the Pho85 cyclin-dependent kinase reveals a role in the environmental stress response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 22, p. 12578-12583, 2001.
- CARROLL, A. S.; O'SHEA, E. K. Pho85 and signaling environmental conditions. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 27, n. 2, p. 87-93, 2002.
- CAO, Y.; MAHRENHOLZ, A. M.; DE PAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 20, p. 14687-14693, 1993.
- CHENG, C.; MU, J.; FARKAS, I.; HUANG, D.; GOEBL, M.; ROACH, P. J. Requirement of the self-glucosylating initiator protein Glg1p e Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 12, p. 6632-6640, 1995.

COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEISS, R. L.; BORKOVICH, K. A.; DUNLAP, J. C. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10352-7, 2006.

DAVIS, R. H.; DE SERRES, F. J. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. **Methods in Enzymology**, v. 17, A, p. 79-143,1970

DAVIS, R. H.; PERKINS, D. D. *Neurospora*: a model of model microbes. **Nature Reviews, Genetics**, v. 3, p. 397-403, 2002.

DE BRONDT, H. L.; ROSENBLATT, J.; JANCARIK, J.; JONES, H. D.; MORGAN, D. O.; KIM, S. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. **Nature**, v. 363, p. 595-602, 1993.

DE PAULA, R.; AZZARITI DE PINHO, C.; TERENZI, 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, p. 241-253, 2002.

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

DE PAULA, R. M.; WILSON, W. A.; TERENZI, H. F.; ROACH, P. J.; BERTOLINI, M. C. GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 435, n. 1, p. 112-124, 2005a.

DE PAULA, R. M.; WILSON, W. A.; ROACH, P. J.; TERENZI, H. F.; BERTOLINI, M. C. Biochemical characterization of *Neurospora crassa* glycogenin (GNN), the self-glucosylating initiator of glycogen synthesis. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2208-2214, 2005b.

DOU, X.; WU, D.; AN, W.; DAVIES, J.; HASHMI, S. B.; UKIL, L.; OSMANI, S. A. The PHOA and PHOB cyclin-dependent kinases perform an essential function in *Aspergillus nidulans*. **Genetics**, v. 165, p. 1105-1115, 2003.

- ESPINOZA, F. H.; OGAS, J.; HERSKOWITZ, I.; MORGAN, D. O. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. **Science**, v. 266, p. 1388-1391, 1994.
- FARKAS, I.; HARDY, T. A.; DE PAOLI-ROACH, A. A.; ROACH, P. J. Isolation of the *GSY1* gene encoding yeast glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, p. 20879-20886, 1990.
- FARKAS, I.; HARDY, T. A.; GOEBL, M. G.; ROACH, P. J. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 24, p. 15602-15607, 1991.
- FIOL, C. J.; MAHRENHOLZ, A. M.; WNAG, Y.; ROESKE, R. W.; ROACJ, P. J. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 29, p. 14042-14048, 1987.
- FLOTOW, H.; ROACH, P. J. Synergistic phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by cyclic AMP-dependent protein kinase and casein kinase I. Implications for hormonal regulation of glycogen synthase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 16, p. 9126-9128, 1989.
- FRANÇOIS, J.; HERS, H. G. The control of glycogen metabolism in yeast. 2- A kinetic study of the two forms of glycogen synthase and of glycogen phosphorylase and an investigation of their interconversion in a cell-free extract. **European Journal of Biochemistry**, v. 174, n. 3, p. 561-567, 1988.
- FRIEDMAN, D. L.; LARNER, J. Studies on UDPG- α -glucan transglucosylase III. Interconversion of two forms of muscle UDPG- α -glucan transglucosylase by phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence. **Biochemistry**, v. 2, p. 669-675, 1963.
- FRIES, N. Über die Bedeutung von Wuchstoffen für das Waschstum verschiedener Pilze. **Symbolae Botan. Upsalienses 3 (Art. 2)**, p. 188, 1938.
- GALAGAN, J. E.; SELKER, E. U. RIP: the evolutionary cost of genome defense. **Trends in Genetics**, v. 20, n. 9, p. 417-423, 2004.

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

GIBBONS, B. J.; ROACH, P. J.; HURLEY, T. D. Crystal structure of the auto-catalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. **Journal of Molecular Biology**, v. 319, n. 2, p. 463-477, 2002.

GILLIQUET, V.; BERBEN, G. Positive and negative regulators of the Saccharomyces cerevisiae `PHO system' participate in several cell functions. **FEMS Microbiology Letters**, v. 108, p. 333-339, 1993.

GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, P. K. T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual Reviews of Genetics**, v. 34, p. 165-186, 2000.

HARDY, T. A.; ROACH, P. J. Control of yeast glyconensynthase-2 by COOH-terminal phosphotylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 32, p. 23799-23805, 1993.

HARTREE, E. F. Determination of proteins: a modification of the Lowry method that give a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HIRST, K.; FISHER, F.; MCANDREWS, P. C.; GODING, C. R. The transcription factor, the Cdk, its cyclin and their regulator: directing the transcriptonal response to a nutritional signal. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 22, p. 5410-5420, 1994.

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

HOROWITZ, N. H. Fifty years ago: the *Neurospora* revolution. **Genetics**, v. 127, n. 4, p. 631-635, 1991.

HUANG, D.; FARKAS, I.; ROACH, P. J. Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisae*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 16, n. 8, p. 4357-4365, 1996.

HUANG, D. Q.; MOFFAT, J.; WILSON, W. A.; MOORE, L.; CHENG, C.; ROACH, P. J.; ANDREWS, B. Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity in vitro and in vivo: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 6, p. 3289-3299, 1998.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868-877, 1999.

HUANG, D.; MOFFAT, J.; ANDREWS, B. Dissection of a complex phenotype by functional genomics reveals roles for the yeast cyclin-dependent protein kinase Pho85 in stress adaptation and cell integrity. **Molecular and Cellular Biology**, v. 22, n. 14, p. 5076-5088, 2002.

JESÚS-BERRÍOS, M.; RODRÍGUEZ-DEL VALLE, N. Expression of a Pho85 cyclin-dependent kinase is repressed during the dimorphic transition in *Sporothrix schenkii*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 37, p. 39-48, 2002.

JOHNSTON, M.; CARLSON, M. Regulation of carbon and phosphate utilization. In: JONES, E. W.; PRINGLE, J. R.; BROACH, J. R. (Ed.). **The molecular and cellular biology of the yeast** *Saccharomyces*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. p. 193-281.

KAFFMAN, A.; HERSKOWITZ, I.; TJIAN, R.; O'SHEA, E. K. Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. **Science**, v. 263, p. 1153-1156, 1994.

KANG, S.; METZENBERG, R. L. Molecular analysis of *nuc-1*⁺, a gene controlling phosphorus acquisition in *Neurospora crassa*. **Molecular And Cellular Biology**, v. 10, n. 11, p. 5839-5848, 1990.

KANG, S.; METZENBERG, R. L. Insertional mutagenesis in *Neurospora crassa:* Cloning and molecular analysis of the *peg+* gene controlling the activity of the transcriptional activator NUC-1. **Genetics**, v. 133, n. 2, p. 193-202, 1993.

KOZAK, M. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. **Cell**, v. 44, n. 2, p. 283-292, 1986.

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

LEHNINGER, A. L. Lehninger princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: W. H. Freeman and Company, 2000.

LOMAKO, J.; LOMAKO, W. M.; WHELAN, W. J. A self-glucosylating protein is primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 2, n. 15, p. 3097-3103, 1988.

MANNHAUPT, G.; MONTRONE, C.; HAASE, D.; MEWES, H. W.; AIGN, VERENA.; HOHEISE, J. D.; FARTMANN, B.; NYAKATURA, G.; KEMPKEN, F.; MAIER, J.; SCHULTE, U. What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 7, p. 1944-4954, 2003.

MEASDAY, V.; MOORE, L.; RETNAKARAN, R.; LEE, J.; DONOVIEL, M.; NEIMAN, A. M.; ANDREWS, B. A family of cyclin-like proteins that interact with Pho85 cyclin-dependent kinase. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 3, p. 1212-1223, 1997.

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

MISHRA, N. C.; TATUM, E. L. Effect of L-sorbose on polysaccharide synthetases of *Neurospora crassa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 2, p. 313-317, 1972.

MORGAN, D. O. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks and microprocessors. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 13, p. 261-291, 1997.

MU, J.; CHENG, C.; ROACH, P. J. Initiation of glycogen synthesis in yeast. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 43, p. 26554-26560, 1996.

NASMYTH, K. Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 5, n. 2, p. 166-179, 1993.

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 of the United States of America**, v. 101, n. 33, p. 12248-53, 2004.

NISHIZAWA, M.; SUZUKI, K.; FUJINO, M.; OGUCHI, T.; TOH-E, A. The Pho85 kinase, a member of the yeast cyclin-dependent kinase (Cdk) family, has a ergulation mechanism different from Cdks functioning throughout the cell cycle. **Genes to Cells**, v. 4, p. 627-642, 1999.

NISHIZAWA, M.; TANABE, M.; YABUKI, N.; KITADA, K.; TOH-E, A. Pho85 kinase, a yeast cyclin-dependent kinase, regulates the expression of UGP1 encoding UDP-glucose pyrophosphorylase. **Yeast**, v. 18, n. 3, p. 239-249, 2001.

NISHIZAWA, M.; KATOU, Y.; SHIRAHIGE, K.; TOH-E, A. Yeast Pho85 kinase is required for proper gene expression during the diauxic shift. **Yeast**, v. 21, p. 903-918, 2004.

O'NEIL, E. M.; KAFFMAN, A.; JOLLY, E. R.; O'SHEA, E. K. Regulation of PHO4 nuclear localization by the PHO80-PHO85 cyclin-CDK complex. **Science**, v. 271, n. 5246, p. 209-212, 1996.

OSHIMA, Y. The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*. In: STRATHERN, J. N.; JONES, E. W.; BROACH, J. R. (Ed.). **Metabolism and gene expression**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. p. 159-180.

PALL, M. L.; BRUNELLI, J. P. New plasmid and /plasmid hybrid vectors and a Neurospora crassa genomic library containing the bar selectable marker and the Cre/lox site-specific recombination system for use in filamentous fungi. **Fungal Genetics Newsletter**, v. 41, p. 63-65, 1994.

PAYEN, A. Extrait dún repport adressé à M. Le Marechal de Dalmatie, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altéraion extraordinarie de pain de minition. **American Chimics and Physics**, v. 9, p. 5-21, 1843.

- PEDERSON, B. A.; CHENG, C.; WILSON, W. A.; ROACH, P. J. Regulation of glycogen synthase. Identification of residues involved in regulation by the allosteric ligand glucose-6-P and by phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27753-27761, 2000.
- PELEG, Y.; METZENBERG, R. L. Analysis of the DNA-binding and dimerization activities of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 14, n. 12, p. 7816-7826, 1994.
- PELEG, Y.; ADDISON, R.; AMAMAYO, R.; METZENBERG, R. L. Translocation of *Neurospora crassa* transcription factor NUC-1 into the nucleus is induced by phosphorus limitation. **Fungal Genetics and Biology**, v. 20, n. 3, p. 186-191, 1996.
- PERKINS, D. D.; DAVIS, R. H. *Neurospora* at the millennium. **Fungal Genetics and Biology**, v. 31, n. 3, p. 153-167, 2000.
- PICTON, C.; WOODGETT, J.; HEMMINGS, B.; COHEN, P. Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Phosphorylation of site 5 by glycogen synthase kinase-5 (casein kinase-II) is a prerequisite for phosphorylation of sites 3 by glycogen synthase kinase-3. **FEBS Letter**, v. 150, n. 1, p. 191-196, 1982.
- RAJU, N. B. Genetic control of the sexual cycle in *Neurospora*. **Mycological Research**, v. 96, n. 4, p. 241-262, 1992.
- ROACH, P. J. Control of glycogen synthase by hierarchal protein phosphorylation. The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 4, n. 12, p. 2961-2968, 1990.
- ROACH, P. J. Multisite and hierarchal protein phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 22, p. 14139-14142, 1991.
- ROACH, P. J.; DEPAOLI-ROACH, A. A.; LARNER, J. Ca²⁺-stimulated phosphorylation of muscle glycogen synthase by phosphorylase b kinase. **Journal of Cyclic Nucleotide Research**, v. 4, n. 4, p. 245-257, 1978.
- ROACH, P. J.; SKURAT, A. V.; HARRIS, R. A. Regulation of glycogen metabolism, in handbook of physiology The endocrine pancreas and regulation of metabolism. Oxford: Oxford University Press, 2001.

ROSELL-PEREZ, M.; VILLAR-PALASI, C.; LARNER, J. Studies on UDPG-glycogen transglucosylase. I. Preparation and differentiation of two activities of UDPG-glycogen from rat skeletal muscle. **Biochemistry**, v. 1, n. 5, p. 763-768, 1962.

RYAN, F. J.; BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. The tube method of measuring the growth rate of *Neurospora*. **American Journal of Botany**, v. 30, n. 10, p. 784–799, 1943.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning, a laboratory manual.** Cold Sprin Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTOS, R. C.; WATERS, N. C.; CREASY, C. L.; BERGMAN, L. W. Structure-function relationship of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 10, p. 5482-5491, 1995.

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

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

SELKER, E. U. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. **Annual Reviews in Genetics**, v. 24, p. 579-613, 1990.

SKURAT, A. V.; WANG, Y.; ROACH, P. J. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 41, p. 25534-25542, 1994.

SMYTHE, C.; CAUDWELL, F. B.; FERGUSON, M.; COHEN, P. Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 9, p. 2681-2686, 1988.

SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genetical Newsletter**, v. 67, 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, 1993.

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

TIMBLIN, B. K.; BERGMAN, L. W. Elevated expression of stress response genes resulting from deletion of the PHO85 gene. **Molecular Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 981-990, 1997.

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

TOH-E, A.; UEDA, Y.; KAKIMOTO, S. I.; OSHIMA, Y. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in Saccharomyces cerevisiae. **Journal of Bacteriology**, v. 113, n. 2, p. 727-738, 1973.

TOH-E, A.; TANAKA, K.; UESONO, Y.; WICKNER, R. B. PHO85, a negative regulator of the PHO system, is a homolog of the protein kinase gene, CDC28, of *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular and General Genetics**, v. 214, n. 1, p. 162-164, 1988.

TORIJA, M. J.; NOVO, M.; LEMASSU, A.; WILSON, W.; ROACH, P. J.; FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. Glycogen synthesis in the absence of glycogenin in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 579, n. 18, p. 3999-4004, 2005.

UEDA, Y.; TOH-E, A.; OSHIMA, Y. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bacteriology**, v. 122, n. 3, p. 911-922, 1975.

UESONO, Y.; TANAKA, K.; TOH-E, A. Negative regulators of the PHO system in *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and structural characterization of *PHO85*. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 24, p. 10299-10309, 1987.

VOGEL, H. J. A convinient medium for *Neurospora crassa* (N medium). **Microbiology and Genetical Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, Z.; WILSON, W. A.; FUJINO, M. A.; ROACH, P. J. The yeast cyclins Pcl6p and Pcl7p are involved in the control of glycogen storage by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. **FEBS Letter**, v. 506, n. 3, p. 277-280, 2001.

WATERS, N. C.; KNIGHT, J. P.; CREASY, C. L.; BERGMAN, L. W. The yeast Pho80–Pho85 cyclin–CDK complex has multiple substrates. **Current Genetics**, v. 46, p. 1-9, 2004.

WATTERS M. K.; RANDALL, T. A.; MARGOLIN, B. S.; SELKER, E. U.; STADLER, D. R. Action of repeat-induced point mutation on both strands of a duplex and on tandem duplications of various sizes in Neurospora. **Genetics**, v. 153, n. 2, p. 705-714, 1999.

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

WESTERGAARD, M.; MITCHELL, H. K. *Neurospora* V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. **American Journal of Botanics**, v. 34, p. 573-577, 1947.

WHELAN, W. J. The initiation of glycogen synthesis. **BioEssays**, v. 5, p. 136-140, 1986.

WILLIAMSON, B. D.; FAVIS, R.; BRICKEY, D. A.; RUTHERFORD, C. L. Isolation and characterization of glycogen synthase in *Dictyostelium discoideum*. **Developmental Genetics**, v. 19, p. 350-364, 1996.

WILSON, W. A.; MAHRENHLOZ, A. M.; ROACH, P. J. Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, p. 7020-7030, 1999.

WILSON, W. A.; WANG, Z.; ROACH, P. J. Regulation of yeast glycogen phosphorylase by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. **Biochemical and Biophysical Reseach Communications**, v. 329, p. 161-167, 2005.

ZENG, Q.; MORALES, A. J.; COTTAREL, G. Fungi and humans: closer than you think. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 12, p. 682-684, 2001.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

<u>Baixar</u>	livros	de	Adm	<u>iinis</u>	tra	ção

Baixar livros de Agronomia

Baixar livros de Arquitetura

Baixar livros de Artes

Baixar livros de Astronomia

Baixar livros de Biologia Geral

Baixar livros de Ciência da Computação

Baixar livros de Ciência da Informação

Baixar livros de Ciência Política

Baixar livros de Ciências da Saúde

Baixar livros de Comunicação

Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE

Baixar livros de Defesa civil

Baixar livros de Direito

Baixar livros de Direitos humanos

Baixar livros de Economia

Baixar livros de Economia Doméstica

Baixar livros de Educação

Baixar livros de Educação - Trânsito

Baixar livros de Educação Física

Baixar livros de Engenharia Aeroespacial

Baixar livros de Farmácia

Baixar livros de Filosofia

Baixar livros de Física

Baixar livros de Geociências

Baixar livros de Geografia

Baixar livros de História

Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura

Baixar livros de Literatura de Cordel

Baixar livros de Literatura Infantil

Baixar livros de Matemática

Baixar livros de Medicina

Baixar livros de Medicina Veterinária

Baixar livros de Meio Ambiente

Baixar livros de Meteorologia

Baixar Monografias e TCC

Baixar livros Multidisciplinar

Baixar livros de Música

Baixar livros de Psicologia

Baixar livros de Química

Baixar livros de Saúde Coletiva

Baixar livros de Serviço Social

Baixar livros de Sociologia

Baixar livros de Teologia

Baixar livros de Trabalho

Baixar livros de Turismo