

Ficha Catalográfica

Cipriano, Vivian Taís Fernandes

Por que o fator de transcrição PacC não poderia ativar, em fungos filamentosos, genes expressos em pH ácido?

Ribeirão Preto, 2009.

103 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós Graduação em Bioquímica) -
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Regulação pelo pH, Expressão gênica, *Aspergillus nidulans*, *Neurospora crassa*

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**Por que o fator de transcrição PacC não poderia ativar,
em fungos filamentosos, genes expressos em pH
ácido?**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Bioquímica da Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto – USP, para obtenção
do título de mestre em Ciências.

Vivian Taís Fernandes Cipriano

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Ribeirão Preto – SP

2009

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**Por que o fator de transcrição PacC não poderia ativar,
em fungos filamentosos, genes expressos em pH
ácido?**

Vivian Taís Fernandes Cipriano

Orientador: Prof. Dr. Antonio Rossi Filho

Ribeirão Preto – SP

2009

DEDICO

Ao Octávio Fernandes da Silva e à Pedrosa
Garcia da Silva: servos de Deus, pais
maravilhosos e avós mais que presentes!

*AGRADECIMENTOS
ESPECIAIS*

“Sei que Teus olhos sempre atentos permanecem em mim.
E os teus ouvidos estão sensíveis para ouvir meu clamor.
Posso até chorar, mas a alegria vem de manhã.
És Deus de perto, e não de longe;
Nunca mudaste; tu és fiel! “

Davi Sacer, Verônica Sacer e Ronald

Obrigada, meu Deus!

Aos meus pais, Gerson e Ruth, pela presença, mesmo de longe.
Pelo carinho, pelo apoio, por enxugarem minhas lágrimas tantas
vezes e por nunca deixarem me faltar nada.

Mãe, obrigada por me fazer dormir tomando um copo de leite
quentinho com aspirina!

Pai, obrigada por me dizer que sou a filha que você mais gosta
e por me chamar de “fofi” diariamente.

Ao meu irmão, pelos conselhos e, por ser, desde sempre, meu
ídolo!

Ao meu namorado Rogério, por me ouvir diariamente: sorrir
comigo, chorar comigo, ser meu melhor amigo, me aconselhar e
me amar em todos os momentos.

À minha cunhada Graziella pelos conselhos infinitos e por me
aguentar tantas vezes em sua casa.

AGRADECIMENTOS

Rossi, nosso primeiro contato foi por *e-mail*; vim fazer a prova de seleção sem ao menos conhecê-lo pessoalmente; passei e aqui estou eu: defendendo meu mestrado. Desde o início você sempre esteve de portas abertas para mim, me ensinou muito, me deu a chance de ser sua orientada e me orientou; não só profissionalmente, mas pessoalmente também. Obrigada pelas broncas, pelos elogios, por mostrar que “Bioquímica também é cultura” e por ser um orientador tão presente.

À Profa. Dra. Nilce Maria Martinez Rossi, pelo apoio e orientação também; pelas considerações feitas, por disponibilizar o laboratório e por acalmar o professor tantas vezes... rs.

Aos meus tios e primos de São Paulo, Presidente Prudente e Rancharia (isso mesmo, Rancharia!) por contribuírem pessoalmente com tudo isso.

Aos meus “sogrinhos” e à minha cunhadinha Dani, pela hospitalidade, amor e carinho.

À Con, Bete, Dona Isabel e Fátima, por ajudarem no meu crescimento desde sempre.

À Dalvinha, pela correção gramatical desta dissertação. Saiba que te admiro muito desde sempre!

Ao Beeeeeeeeest Fausto Bruno, que sempre esteve disposto a me ajudar, independente do horário ou situação; meu irmãozinho loiro!

Às minhas geriris mais que preciosas Nerry e Má: Vocês foram e constituem a família que Deus colocou na minha vida aqui em Ribeirão: choramos juntas, rimos juntas e FOMOS PARA PORTO SEGURO JUNTAS! rs

À Rach e Leila: amigas, sei que posso contar com vocês a qualquer momento. Obrigada por me fazerem rir tanto e por enxugarem minhas lágrimas também.

Ao Ivan, que passou de *personal* a amigo. Obrigada pelos conselhos e por ser tão divertido! Ai de você se eu não for madrinha do seu casamento!

A todos integrantes e agregados da república Cueca Miada (opss... virada), por tornarem meus finais de semana bem mais felizes: Nego, Muller, Beraba, Williamzinho: vocês são muuuuuuuuito importantes na minha vida!

À Fá (neeeeeeeeeeeega) por ser tão companheira, mesmo nunca tendo tempo pra mim... rs. Dizer que te amo é pouco!

À Thaís Amaral, pelas baladas, pelas conversas e por me ajudar tanto nessa fase final de confecção da dissertação.

À Michelin, pelas baladas boas e chiques e pelas ótimas conversas.

Ao Lobão, por me ensinar *Blast* e pelos papos cabeça.

À Jana (pois uma Perom sempre ajuda outra) e à Jú ,com essa paciência sem fim... Sei que não somos apenas amigas de laboratório. Aprendi demais com vocês, ri demais com vocês e sinto saudades demais de vocês!

À Erna, por tantos momentos felizes e por me ajudar profissional e pessoalmente.

À Emiliania e ao Carlos, por tudo que me ensinaram nessa jornada. Aprendi muito com vocês.

Ao Fábio, por me ensinar desde os meus primeiros passos até quase tudo que sei, por me estressar às vezes e por me fazer rir tanto.

À Niege Maria, pelas conversas à toa, por me ajudar nos experimentos e ser essa pessoa tão meiga e querida.

À Diana, por me ensinar a fazer RT, por me obrigar a entender “portunhol” e ser tão engraçada.

Ao Rodrigo, por me ensinar a fazer *Nothern*, por ter paciência comigo e tornar tudo tão divertido!

Aos técnicos José, Pita e especialmente ao Beto, por tantas colunas, géis, quantificações de proteínas e muitos papos: aprendi demais com vocês!

À Sílvia, não só por cuidar do laboratório, mas também por ser uma mãezona conselheira em todas as horas. Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Genética e Biologia Molecular de Fungos, Henrique, Nalu, Luciene, Jeny pela colaboração e discussões.

Aos técnicos Mendel, Pablo e Roseli, pelo apoio e disponibilidade.

Às secretárias do departamento da Bioquímica, Ivone e Lúcia, pela ajuda e atenção.

Aos docentes, funcionários e pós-graduandos do departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de estarem aqui e pelas contribuições que serão feitas a este trabalho. Magali, você me ensinou a engatinhar e a dar os primeiros passos na Pesquisa. Tê-la aqui hoje, torna este dia muito mais especial.

À CAPES, FAEPA, CNPq, FAPESP e Pró-Reitoria de Pós-graduação, pelos auxílios recebidos.

Enfim, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

Resumo

Os microrganismos desenvolveram vias de transdução de sinal que permitem adaptação ao pH ambiente. A regulação da expressão gênica pelo pH em *Aspergillus nidulans*, e em outros fungos, é mediada pelo conservado fator de transcrição PacC, cujo gene codifica para uma proteína do tipo *Zn-finger*, e pelos seis genes *pal* (*palA*, *B*, *C*, *F*, *H*, e *I*). Essa cascata sinalizadora promoveria a ativação do PacC apenas em ambiente alcalino.

Estudos prévios mostraram que o fator de transcrição PacC pode ser ativado em pH ácido, em função da composição do meio de cultivo. Para caracterizar a resposta adaptativa ao pH ácido em *A. nidulans*, foram avaliadas as interações proteína-DNA através do EMSA (ensaio do retardo da mobilidade eletroforética), em associação com cromatografia de filtração em gel. As linhagens *pabaA1* e *pabaA1 palB7* (*A. nidulans*); e 74A e *pacC^{K0}* (*Neurospora crassa*) cresceram por 16 horas em pH ácido, em diferentes condições de cultivo, incluindo diferentes concentrações de fosfato inorgânico. Além disso, foi avaliado por *Northern blot* a expressão do gene *pacC* em *N. crassa*, quando cultivada em diferentes fontes de carbono.

Nossos resultados mostraram a inegável influência da composição dos meios de cultura na regulação da transcrição do gene *pacC* e na ativação do fator de transcrição PacC. Os resultados apresentados não invalidam a hipótese da cascata de sinalização governada por PacC em resposta ao pH alcalino. Entretanto, está claro que o sensoriamento do pH alcalino não é sua única função.

Abstract

Microorganisms have evolved signal transduction networks that enable them to adapt in response to environmental pH. The regulation of gene expression by pH in *Aspergillus nidulans* and in other fungi is mediated by the conserved transcription factor PacC, whose gene codes for a Zn-finger transcription factor, and for the six *pal* genes (*palA*, *B*, *C*, *F*, *H*, and *I*). This signaling cascade would promote the proteolytic activation of PacC only in alkaline environment.

Recent studies showed that PacC could be activated at acid pH, as a function of the culture medium composition. To characterize the adaptive response to acid pH in *A. nidulans*, we evaluated protein-DNA interactions by EMSA (electrophoresis mobility shift assay) in association with gel filtration chromatography. The *pabaA1* and *pabaA1 palB7* strains of *A. nidulans*; and 74A and *pacC^{k0}* strains of *Neurospora crassa* were grown for 16 hours under acid pH, in different culture conditions, including different inorganic phosphate shortage. Besides that, we evaluated in *N. crassa* the transcription of gene *pacC* under different carbon sources.

Our results showed the undeniable influence of the culture media in the regulation of gene *pacC* and the activation of the transcription factor PacC. The results presented do not invalidate the hypothesis that the conserved PacC-signaling cascade governs the physiological responses to alkaline pH. However, it's clear that the sensing of alkaline pH is not its sole function.

Índice

I. Introdução.....	17
1. <i>Aspergillus nidulans</i> e <i>Neurospora crassa</i> : modelos para fungos filamentosos.....	17
2. A interferência do pH na expressão gênica de fungos.....	20
3. Fosfato Inorgânico (Pi).....	26
4. O fator de transcrição PacC pode ser funcional em pH ácido?...	27
5. Proteínas de Choque Térmico (HSPs).....	29
6. Ensaio do Retardo da Mobilidade Eletroforética – EMSA	31
II. Objetivos.....	34
III. Material e Métodos.....	36
1. Linhagens.....	36
1.1. Linhagens de <i>N. crassa</i>	36
1.2. Linhagens de <i>A. nidulans</i>	36
2. Extração de proteínas totais de <i>A. nidulans</i> e <i>N. crassa</i>	36
2.1. Preparação das amostras para eletroforese em SDS PAGE.....	39
2.2. Determinação da concentração de proteínas.....	39
3. Coluna cromatográfica de filtração em gel.....	40
4. Ensaio do Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA).....	40
4.1. Preparo da sonda: marcação e anelamento.....	41
4.2. Purificação das sondas.....	42
4.3. Formação do complexo proteína-DNA.....	42
4.4. Eletroforese.....	42
4.5. Exposição e revelação do gel de poliacrilamida.....	42
5. <i>Northern blot</i>	43
5.1. Extração de RNA e transferência para membrana de náilon.....	43

5.2. Determinação da atividade enzimática da fosfatase ácida.....	44
5.3. Preparação da sonda para <i>Northern Blot</i>	45
5.3.1. Extração de DNA genômico (Sambrook <i>et al</i> , 1989).....	45
5.3.2. Amplificação e marcação radioativa do fragmento do gene <i>pacC</i>	46
5.3.3. Hibridação da membrana com sonda radioativa e detecção da marcação.....	47
6. Regulação da expressão de HSPs em <i>N. crassa</i>.....	47
IV. Resultados e Discussão.....	50
1. Quantificação das proteínas extraídas.....	50
2. Perfis cromatográficos.....	50
3. EMSA – Ensaio do Retardo da Mobilidade Eletroforética.....	62
4. Regulação da Expressão do gene <i>pacC</i> e atividade da fosfatase ácida em <i>N. crassa</i>.....	68
5. Regulação da Expressão de HSPs em <i>N. crassa</i>.....	72
V. Conclusões.....	76
VI. Referências	79
Apêndice.....	90

ABREVIATURAS

atm	Atmosfera
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Ci	Curie = unidade de radioatividade definida como desintegrações por segundo
DEPC	dietil pirocarbonato
dNTP	deoxinucleotídeo trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EST	<i>Expressed sequence tag</i> :
FGSC	Fungal Genetic Stock Center
hepes	Ácido 2-[4-(2-hidróxietil)-1-piperazinil]-etanosulfônico
M. Mín	Meio Mínimo
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo
OD	densidade ótica
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (fase aberta de leitura)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> = fluoreto de fenil metil sulfato
PNP-p	Para-nitrofenilfosfato
qsp	quantidade suficiente para
RNA_m	ácido ribonucléico mensageiro
rpm	rotações por minuto
s/ Pi	Sem fosfato
SDS	dodecil sulfato de sódio
SSC	citrato salino de sódio
TAE	tampão Tris-ácido acético-EDTA
taq	polimerase termostável de DNA
TBE	tris borato EDTA
TE	tampão Tris-EDTA
Tris	Hidroximetilaminometano
U	Unidade
v/v	Porcentagem volume/volume

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A sobrevivência dos microrganismos está diretamente ligada à sua adaptação a alterações ambientais como temperatura, salinidade, pH, entre outros. A quantidade de nutrientes no meio em que vivem (fontes de carbono, nitrogênio e fosfato) também interfere no seu desenvolvimento (Kunamoto, 2008).

Nos últimos anos, o estudo dos processos biológicos envolvidos na adaptabilidade dos fungos às mudanças ambientais passou a ser relevante para a medicina. Os fungos patogênicos, em especial o dermatófito *Trichophyton rubrum*, vem atuando de modo invasivo, sendo responsáveis pelo aumento da mortalidade de indivíduos aidéticos, pacientes imunodeprimidos ou ainda em pacientes com órgãos transplantados. Essa constatação implica na necessidade da elucidação dos mecanismos que regem a patogenicidade e a resistência a inibidores dos fungos. A necessidade de organismos modelo para estudar tais aspectos vem se fortalecendo, já que muitos dermatófitos ainda não possuem o seu genoma sequenciado.

1. *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*: modelos para fungos filamentosos

Os fungos filamentosos são organismos eucarióticos que representam um grupo heterogêneo e têm importantes funções em muitas atividades, incluindo processos biotecnológicos, fitopatológicos e pesquisas biomédicas. São constituídos por longos túbulos microscópicos ramificados denominados hifas que formam um emaranhado denominado micélio. O micélio cresce pelo alongamento apical das hifas. Este processo requer um rigoroso balanço entre a lise da parede celular e a síntese de nova parede celular. Os micélios dos fungos formam estruturas especializadas para reprodução assexuada e sexuada.

As dimensões dos micélios dos fungos filamentosos variam grandemente de acordo com a espécie e condições de crescimento encontradas pelo fungo. Há micélios com diâmetro de alguns milímetros e há

fungos que produzem micélios que atingem mais de quinze metros de diâmetro.

O *Aspergillus nidulans* é um fungo filamentoso, pertencente ao filo dos Ascomycota. Possui um sistema genético bem caracterizado e um ciclo assexuado que resulta na formação de conídios, os quais são formados em cadeias em uma estrutura denominada conidióforo.

O gênero *Aspergillus* engloba espécies de grande importância médica e econômica. Na área agrícola, *A. flavus* e *A. parasiticus* representam os principais produtores de micotoxinas (aflatoxinas) contaminando alimentos e grãos estocados, enquanto que na área médica, *A. fumigatus* pode causar doenças graves (em pacientes imunocomprometidos) e em animais (por exemplo: aspergilose invasiva pulmonar).

O sequenciamento do genoma do *A. nidulans* foi recentemente concluído, apresentando um tamanho de aproximadamente 31 Mb, organizado em 8 cromossomos (Archer *et al.*, 2004; GOLD-Genome online data). Entretanto, devido ao baixo número de genes caracterizados antes do sequenciamento do genoma, mais de 90% de todas ORFs identificadas foram denominadas hipotéticas ou proteínas preditas. Portanto, atribuições funcionais de genes baseadas em dados genéticos podem ser complementadas com informações bioquímicas e evidências fisiológicas. Assim, o *A. nidulans* se tornou um dos organismos modelo de fungos filamentosos mais estudados nas áreas de genética e bioquímica. Esse microrganismo tem sido útil no estudo do desenvolvimento de células e da regulação da expressão gênica (Arst *et al.*, 2003).

Em relação à *Neurospora crassa*, este fungo é uma espécie pertencente ao filo Ascomycota. Morfologicamente, têm um aspecto cotonoso com hifas de coloração alaranjada. As hifas que penetram no meio, onde absorvem nutrientes, são coletivamente conhecidas como micélio vegetativo, enquanto que aquelas que se projetam acima da superfície do meio constituem o micélio aéreo. É um organismo quimioheterotrófico e apresenta reprodução assexuada com produção de conídios (figura 1). Na ausência de certos nutrientes (principalmente fontes de nitrogênio) é iniciada a fase sexuada. (Froehlich *et al.*, 2005; Kaldi *et al.*, 2005).

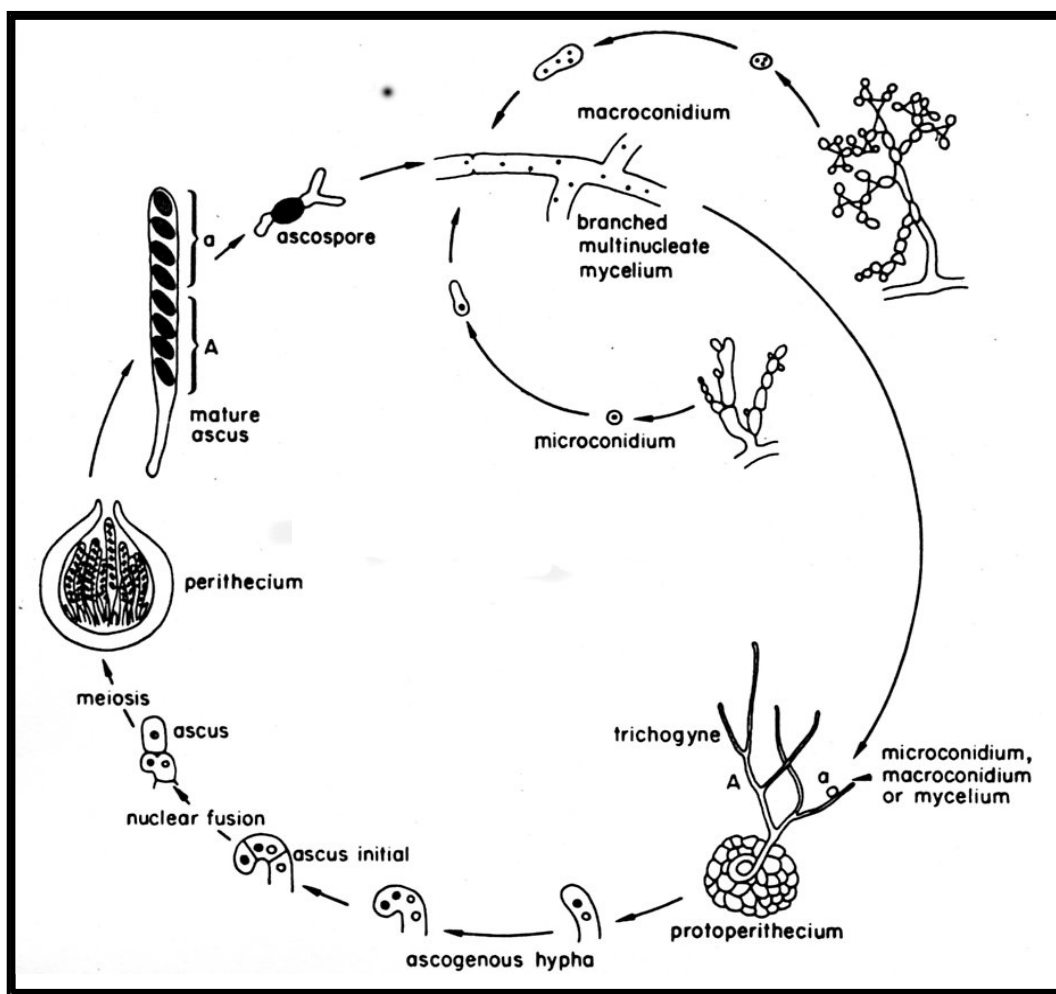


Figura 1. Ciclo sexual de *N. crassa*. Na fase assexual do ciclo, a germinação e o crescimento do esporo assexual haplóide (conídium ou *conidium*) resulta na formação de uma hifa vegetativa. A freqüente fusão entre filamentos hifais resulta numa massa, denominada micélio. As hifas vegetativas que constituem o micélio são multinucleadas e contêm septos nas paredes celulares, os quais permitem o movimento das organelas entre os compartimentos hifais. Dependendo das condições ambientais, o micélio vegetativo forma cadeias de esporos assexuais de macroconídios multinucleados para dispersão ou microconídios uninucleados que estabelecem um novo crescimento vegetativo. A macroconidiação é controlada pelo ritmo circadiano, modulado pela exposição à luz. Quando ocorre limitação de nitrogênio, *N. crassa* entra na fase sexual de seu ciclo de vida, produzindo corpos de frutificação (*protoperithecium*), cada um originando de 100 a 200 núcleos vegetativos. Uma hifa feminina especializada se projeta do *protoperithecium* em direção a uma célula (um conídium) de *mating type* oposto, e carrega seu núcleo para dentro do *protoperithecium*. Após a fertilização, os heterocárions formados sofrem meiose, originando quatro produtos haplóides, os quais permanecem juntos em sacos, denominados de ascos. Cada célula haplóide sofre mitose. Assim, cada ascósporo passa a possuir oito ascósporos que germinam e iniciam novamente a fase assexual. Figura extraída do site do Fungal Genetic Stock Center (<http://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB2.htm>).

Desde o trabalho clássico de Beadle e Tatum, o qual definiu o papel dos genes no metabolismo em 1941 (prêmio Nobel em 1956), esse fungo tem se mostrado um excelente modelo biológico.

O genoma de *N. crassa* apresenta um tamanho de 43 Mb contendo aproximadamente 10.620 genes, distribuídos em sete cromossomos. Vários genes identificados no genoma de *N. crassa* não apresentam homologia em *Saccharomyces cerevisiae*, porém são similares a genes de animais, plantas e outros fungos filamentosos. Além disso, existem 200 proteínas preditas que mostram similaridade a produtos gênicos humanos que, quando mutados podem causar doenças, como aquelas associadas ao sistema imune, desordens metabólicas, doenças neurológicas e câncer (Borkovich *et al.*, 2004).

A facilidade de manipulação genética e o curto ciclo de vida, aliados as exigências nutricionais simples, ferramentas genômicas e moleculares disponíveis e principalmente ao genoma recentemente sequenciado e analisado, têm definido a escolha desses microrganismos como referência para fungos filamentosos e outros eucariotos multicelulares contribuindo para o progresso não somente da pesquisa básica, mas também do estudo da patogenicidade de animais e plantas, biotecnologia e biodegradação. (Galagan *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2004; Borkovich *et al.*, 2004).

A *N. crassa*, o *Aspergillus nidulans* e outros fungos modelo, como *Saccharomyces cerevisiae* estão sendo utilizados no estudo da resposta adaptativa a mudanças ambientais, como a limitação de fosfato inorgânico (Pi) e variações do pH extracelular (Nahas *et al.*, 1982; Caddick *et al.*, 1986; Peleg *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2004; Mouillon e Persson, 2005).

2. A interferência do pH na expressão gênica de fungos

A investigação sistemática da regulação da expressão gênica pelo pH ambiente em fungos foi realizada por Dorn (1965b) através de análises genéticas e mutacionais onde foi selecionado um grande número de mutações que afetam as fosfatases ácida e alcalina em *A. nidulans* (figura 2). Foi observado que, em concentrações limitantes de fosfato e em pH 6,5, os mutantes *pal* (*A*, *B*, *C*, *D*, *E* e *F*) apresentam níveis altos de fosfatase ácida e níveis baixos de fosfatase alcalina, enquanto que os mutantes *pacC*

apresentam níveis altos de fosfatase alcalina e níveis reduzidos de fosfatase ácida (figura 3) (Dorn, 1965a; Caddick *et al.*, 1986).

Strain	Phosphatase activity			
	pH 8.2		pH 4.8	
	35°C	25°C	35°C	25°C
<i>bil</i> (wild type)	+	+	+	+
<i>palA1</i>	-	-	+++	+++
<i>palA14</i>	-	-	+++	+++
<i>palB7</i>	-	±	+++	+++
<i>palB9</i>	-	-	+++	+++
<i>palB13</i>	-	-	+++	+++
<i>palC4</i>	-	-	+++	+++
<i>palD8</i>	-	±	+	+
<i>palE11</i>	-	-	+++	+++
<i>palF15</i>	-	-	+++	+++
<i>pacB4</i>	+	+	±	+
<i>pacC5</i>	+	+	-	+
<i>palcA1</i>	-	+	-	+

Dorn, G. (1965) *Science* **150**:1183-1184.

Figura 2. Mutantes isolados a partir dos padrões de secreção de fosfatases ácida e/ou alcalina.

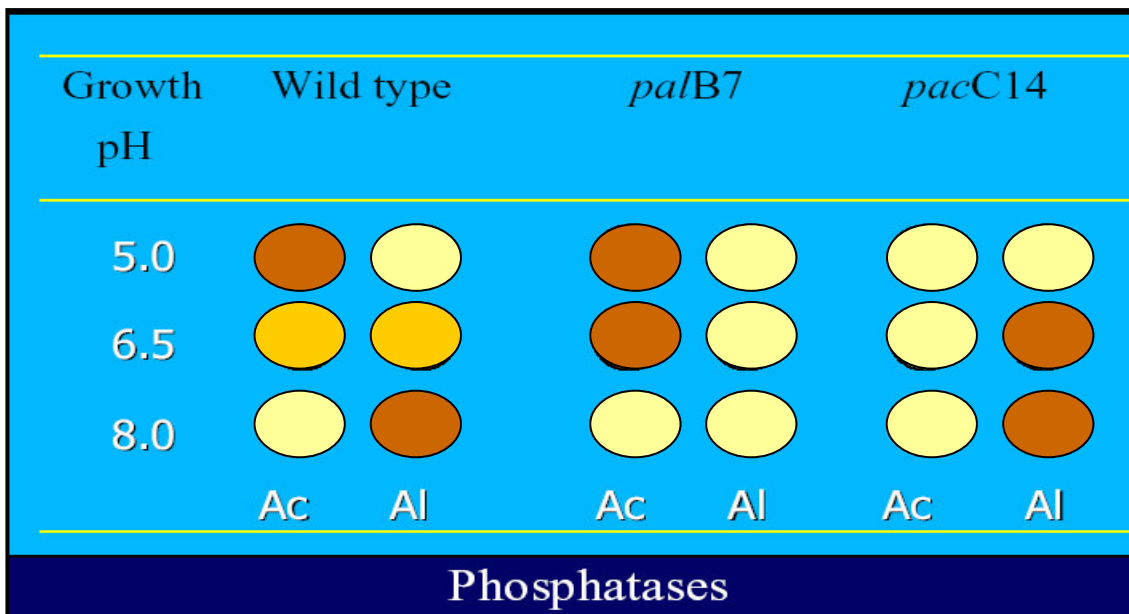


Figura 3. Esquema da secreção das fosfatases ácida e alcalina nas linhagens selvagem e mutantes (*palB7* e *pacC14*). A linhagem selvagem secreta fosfatase ácida em pH 5; fosfatase alcalina em pH 8 e as duas fosfatases, quando cultivada em pH 6,5. Já a mutante *palB7* só secreta fosfatase ácida, nos pHs 5 e 6,5; enquanto a mutante *pacC14* só secreta fosfatase alcalina, nos pHs 6,5 e 8,0.

Em *N. crassa*, a regulação pelo pH foi descrita pela primeira vez por Nahas *et al.*, (1982), quando foi demonstrado que a secreção das fosfatases ácida e alcalina Pi-repressíveis por este fungo eram dependentes do pH do meio de cultivo, ou seja, as fosfatases ácida e alcalina eram preferencialmente secretadas em meio ácido e alcalino, respectivamente.

Os primeiros genes envolvidos no sensoriamento do pH ambiente foram identificados em *A. nidulans* por Caddick *et al.* (1986) os quais demonstraram que a resposta ao pH é mediada por uma via metabólica, constituída por pelo menos sete genes: os genes *pal* (*palA, B, C, F, H e I*) e o gene *pacC* (Orejas *et al.*, 1995, Maccheroni *et al.*, 1997, Denison 2000).

Análises moleculares confirmaram que o gene *pacC* codifica um fator de transcrição do tipo *zinc-finger* de 678 aminoácidos, o qual reconhece uma região consenso de um hexanucleotídeo 5'-GCCR(A/G)AG-3' (Tilburn *et al.*, 1995; Espeso *et al.*, 1993). Esse fator é responsável pela ativação da transcrição de genes alcalinos específicos e repressão de genes ácidos específicos modulado por um sinal gerado pelo genes *pal* em resposta ao pH alcalino do meio extracelular (Figura 4) (Tilburn *et al.*, 1995, Peñalva e Arst, 2002).

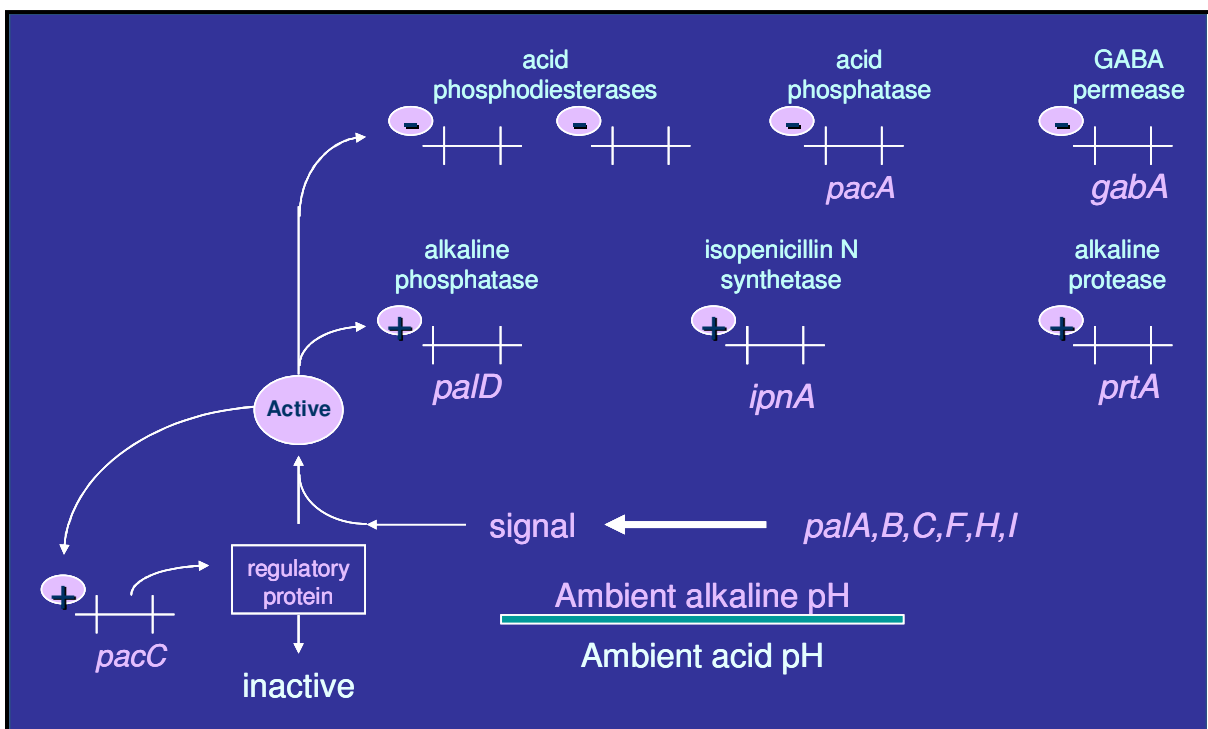


Figura 4. Modelo proposto para a regulação da expressão gênica pelo pH em *A. nidulans*, por Tilburn *et al* (1995). Em pH alcalino, o gene *pacC*, funcional, ativa a transcrição de genes alcalino específicos e reprime a transcrição de genes ácido específicos.

O produto primário PacC é mantido inativo por interações intramoleculares com a extremidade C-terminal. Em pH externo alcalino, o produto dos genes *pal*, introduz uma modificação estrutural que quebra a interação intramolecular, expondo a proteína à proteólise. A proteólise da extremidade C-terminal converte PacC a uma forma ativa (Orejas *et al.*, 1995). Três formas de PacC com massas moleculares de 72kDa (PacC⁷²), 53kDa (PacC⁵³) e 27kDa (PacC²⁷), são detectáveis em extratos de proteínas (Orejas *et al.*, 1995, Díez *et al.*, 2002). PacC⁷² predomina sob condições de crescimento ácido e estaria inativo, não apresentando função na regulação transcricional (Orejas *et al.*, 1995).

A ativação do PacC⁷² em resposta à alcalinização ambiente envolve dois passos proteolíticos. Primeiramente, PacC⁷² é convertido em PacC⁵³. Essa clivagem, dependente da sinalização do pH alcalino, ocorre numa sequência conservada de 24 resíduos, designada *signalling protease box*. Segundo, independente do pH ambiente, o processamento da protease cliva PacC⁵³ em PacC²⁷, o qual contém ~250 resíduos N-terminal de PacC. PacC²⁷ é ativo e funciona na ativação e repressão de genes estruturais (Perez-Esteban *et al.*, 1993; Orejas *et al.*, 1995, Mingot *et al.*, 1999, Díez *et al.*, 2002).

Em 2003, Arst & Peñalva sugeriram algumas alterações no modelo da regulação pelo pH inicialmente proposto. Nessa nova versão indicou-se que *pall* e *palH* codificam proteínas transmembrana que funcionam como sensores de pH e que o produto do gene *palB*, uma calpaína da família das cisteínas proteases, poderia ser o responsável pelo reconhecimento do sinal da proteólise (*protease box*) e portanto pela remoção de 180 resíduos da porção C-terminal da proteína PacC (Denison *et al.*, 2000; Herranz *et al.*, 2005; Peñas *et al.*, 2007). Em 2008, Peñalva *et al.* apresentaram um modelo contendo essas novas informações, e afirmando, mais uma vez, que em pH ambiente ácido, são detectadas baixas quantidades de PacC presentes na conformação aberta e acessível ao processamento proteolítico concordando com os modelos anteriores (figura 5).

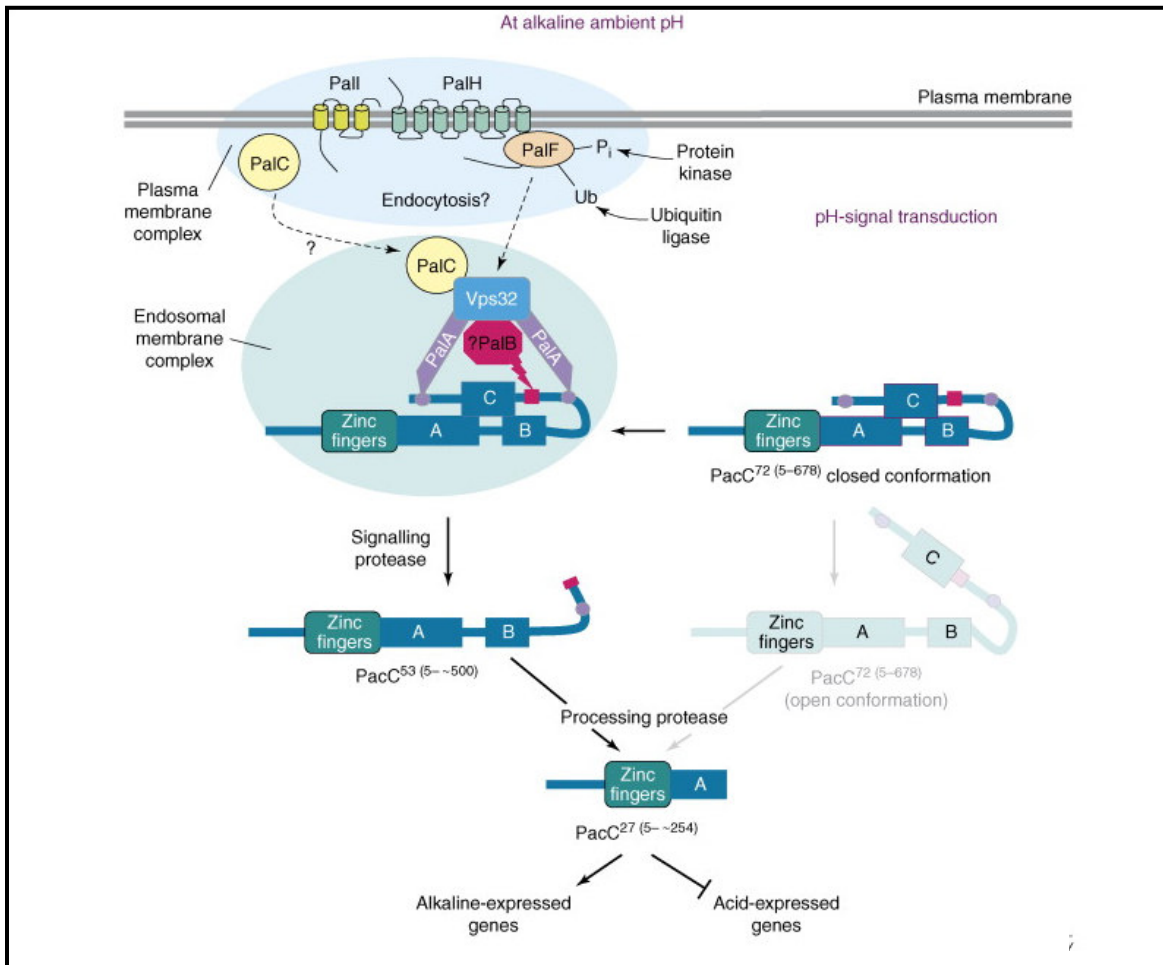


Figura 5. Regulação do pH em *A. nidulans* (Penálva et al., 2008). Em condições ácidas, PacC apresenta-se numa conformação fechada e não acessível à proteólise. Em condições alcalinas, um sinal do pH ambiente alcalino é transmitido de um complexo presente na membrana plasmática, por um processo que provavelmente envolve a endocitose de PalH e ou PalF e a participação de PalC, para um complexo de membrana endossomal na superfície do endossomo. Para que se inicie a proteólise é necessário que a proteína PalA se ligue aos dois motivos YPXL/I (círculos roxo), localizados em cada lado da “signaling protease box” (quadrado vermelho). Em seguida, a proteólise é catalisada pela proteína PalB, responsável pela conversão da forma íntegra à forma intermediária PacC53. PacC53 possui uma conformação aberta e acessível ao processamento proteolítico, provavelmente exercido pelo proteasoma, o qual remove ≈ 245 resíduos independente do pH para formar PacC27, responsável pela ativação de genes alcalinos e repressão de genes ácidos.

Apesar desse modelo ainda ser considerado único, vários resultados obtidos no nosso laboratório mostraram que a proteína PacC deve ser ativa também em pH ácido, de acordo com o meio de cultivo em que o fungo cresce (página 17).

3. Fosfato Inorgânico (Pi)

Além do pH, outro fator determinante para a sobrevivência dos fungos é o fosfato inorgânico. O Pi (fosfato inorgânico) é um nutriente essencial para todos os organismos vivos, sendo necessário tanto para a estrutura celular como para a síntese de ácidos nucleicos, fotossíntese e crescimento celular (Paytan e McLaughlin, 2007). Em resposta à limitação de Pi, os fungos filamentosos *N. crassa*, *A. nidulans* e muitos outros organismos vivos, sintetizam fosfatases, nucleases e fosfato permeases para atender à necessidade intracelular desse nutriente (Metzenberg e Chia, 1979; Nahas *et al.* 1982). Assim, quando o Pi disponível é insuficiente, fosfatases são secretadas.

Em *N. crassa*, a síntese e secreção da fosfatase alcalina Pi-repressível não é reprimida em pH ácido, porém ocorre uma perda na atividade enzimática dessa enzima nesse pH (Nozawa *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 1989). Foi visto que a fosfatase alcalina Pi-repressível secretada em pH alcalino difere daquela secretada em pH ácido somente quanto ao nível de glicosilação, onde essa última apresenta 13% de açúcar contra 21% encontrado na primeira (Palma *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1994; Nozawa *et al.*, 2002).

Esses resultados demonstraram que a síntese de fosfatase alcalina Pi-repressível em *N. crassa* é regulada por mecanismos de sinalização do pH independentes de PacC e, que o pH ambiente determina a glicosilação da fosfatase alcalina secretada (Palma *et al.*, 1989; Han *et al.*, 1994; Thedei *et al.*, 1998; Nozawa *et al.*, 2003b). Portanto, o monitoramento do pH extracelular é determinante na secreção seletiva, mas não na síntese dessa enzima em *N. crassa*.

4. O fator de transcrição PacC pode ser funcional em pH ácido?

De acordo com o modelo inicialmente proposto, o perfil de secreção e as propriedades das fosfatases ácidas secretadas pelas linhagens controle e pelas linhagens mutantes *pal*, deveriam ser idênticos. Entretanto, resultados obtidos anteriormente (Maccheroni *et al* 1995) mostraram que as fosfatases ácidas secretadas pelas linhagens mutantes *palA1* (B7, C4 e F15) apresentavam propriedades alteradas em relação àquela secretada pela linhagem controle. Assim, assumiu-se que os loci *palA*, *B*, *C*, e *F* também estão envolvidos em modificações pós-traducionais em ambas as fosfatases ácida e alcalina como mediadores da resposta adaptativa ao pH extracelular.

Um outro estudo mostrou que a fosfatase ácida secretada pelo mutante *palB7* em pH 5.0, apresenta nível reduzido de manose e N-acetilgalactosamina em relação àquele observado na fosfatase ácida secretada pela linhagem controle. Além disso, genes que codificam para uma manosil-transferase e a NADH-ubiquinona oxidoreductase foram regulados negativamente nesse mutante (Nozawa *et al.*, 2003).

Na literatura já foi descrito que em *Saccharomyces cerevisiae* (Bôer *et al.*, 1966), *Candida albicans* (Odss *et al.*, 1973), *Schizosaccharomyces pombe* (Dibenedeto *et al.*, 1975) e *Rhodotorula glutinis* (Trimble *et al.*, 1981) a fosfatase ácida de fato é uma glicoproteína e que as glicosilações são importantes no processo de secreção.

O modelo atual também implica que a remoção da extremidade C-terminal de PacC (mutação *pacC^c14*) resulta em ganho de função e representa uma etapa metabólica na ativação do fator de transcrição PacC dependente do pH alcalino. Entretanto, em *N. crassa*, o gene *pacC-1*, homólogo do gene *pacC* de *A. nidulans*, complementa a mutação *pacC^c14* de *A. nidulans*, incluindo a remediação de ambas fosfatases (ácida e alcalina) Pi-repressíveis e secretadas em pH 5.0 (Nozawa *et al.*, 2003a). Demonstrou-se também que a linhagem controle secreta fosfatase alcalina Pi-repressível em pH 5.0 e a linhagem *pacC^c14*, quando cultivada a 22°C, secreta os mesmos níveis de fosfatase ácida que a linhagem controle. Isso representa uma perda de função e não o ganho de função proposto anteriormente (Tilburn *et al.* 1995) para a mutação *pacC^c14*.

Em relação à transdução de sinal, via PacC, o modelo vigente defende que a ativação do PacC não ocorre em pH ácido (Tilburn *et al.*, 1995). Porém, recentemente, mostrou-se que o fenótipo da linhagem controle *biA1* foi parcialmente restaurado no mutante *palC4* cultivado em meio sólido suplementado com extrato de levedura (YAG) nos pHs 8.0 e 7.1, tamponado com 50mM de Tris. A secreção da fosfatase ácida foi reprimida em meio YAG líquido, pH 5.0, indicando que a transdução de sinal via PacC ocorre dependendo da composição do meio de cultivo (Freitas *et al.*, 2007). Além disso, utilizando a técnica de hibridação subtrativa supressiva (*Suppression Subtractive Hybridization-SSH*), foram identificados genes com expressão aumentada na linhagem mutante *palA1* de *A. nidulans* cultivadas em meio mínimo Pi-limitante, pH 5.0, indicando que o gene *palA* tem função também em pH ácido (Silva *et al.*, 2008).

Embora o modelo de sensoriamento do pH extracelular proposto tenha sido identificado em outros fungos, ainda é incerto afirmar se apenas esta via seria responsável pelo mecanismo que governa a expressão gênica em função do pH. A existência de outras vias independentes da ação direta de PacC em resposta ao pH ambiente tem sido proposta em *C. albicans*, onde a clivagem de Rim101 (homólogo ao PacC) ocorre independente do pH ambiente (Li *et al.*, 2004).

A partir de resultados obtidos em nosso laboratório, relacionados à funcionalidade dos genes *palA* e *palB*, bem como os resultados da literatura, verificou-se que a ativação fisiológica de PacC é um processo no qual as condições experimentais são essenciais para gerar uma determinada resposta. O mecanismo molecular envolvido na regulação do pH é desencadeado de acordo com cada condição de cultivo oferecida, como pHs variados e diferentes nutrientes. Portanto, a regulação da expressão gênica em *Aspergillus nidulans* não se encontra restrita a um determinado pH ou meio de cultivo; a mesma se altera de acordo com o sensoriamento externo feito pela célula.

Desse modo, os mecanismos envolvidos na via de transdução de sinal constituída pelos genes *pal* no monitoramento do pH do meio, bem como o sinal gerado para disparar o processamento da proteína regulatória

expressada pelo gene *pacC* são, sem sobra de dúvidas, um problema ainda não resolvido.

5. Proteínas de Choque Térmico - HSPs

As HSPs têm função de chaperonas, guiando e estabilizando a conformação de outras proteínas, como também facilitando a degradação de cadeias polipeptídicas que apresentem dobramento incorreto (Hartl e Hayer-Hartl, 2002; Mayer e Bukau, 2005).

A síntese imediata de HSPs, em resposta a mudanças bruscas do meio ambiente é um atributo fundamental para os organismos sobreviverem.

Classificadas de acordo com sua massa molecular, sequência, homologia e função, essas proteínas são altamente conservadas entre os organismos e abundantemente sintetizadas em resposta a uma variedade de estresses, como calor, salinidade, metais pesados, etanol, hormônios, pH, limitação de nutrientes, entre outros. (Rensing *et al.*, 1998; Mager e Kruijff *et al.*, 1995; Cernila *et al.*, 2003).

Análises funcionais das proteínas de choque térmico indicam que elas também participam de outros processos celulares, como divisão celular, translocação de proteínas através de membranas e metabolismo de DNA e RNA (Bevilacqua *et al.*, 2003).

Um das principais proteínas de choque térmico são as Hsp70 que contribuem com uma família de proteínas ubiquitinas expressas através de sistemas biológicos, com representantes encontrados em todos os tipos celulares (Gething e Sambrook, 1992). Estudos bioquímicos sugerem que Hsp70 funcionem como chaperonas moleculares auxiliando uma grande variedade de processos, desde o empacotamento de proteínas recém sintetizadas até a facilitação da degradação proteolítica de proteínas instáveis em processos dependentes de energia (Kapoor *et al.*, 1994; Gething, 1997).

Pode-se dizer então, que essa chaperona tem duas tarefas importantes: ajudar o enovelamento, e impedir que várias proteínas malformadas, com sequências hidrofóbicas expostas, formem agregados, que além de inúteis podem ser nocivos. Assim, as hsp70 são proteínas que se

ligam em sequências hidrofóbicas expostas e mantêm a cadeia peptídica desenovelada até que ela possa assumir a conformação tridimensional correta. Cada Chaperona possui um compartimento central, que acomoda a proteína recém-sintetizada, impedindo que esta tenha um dobramento prematuro gerando uma forma inadequada. Desta forma, as Chaperonas ajudam as proteínas a se moldar, associarem-se a outras proteínas de maneira estável e tornarem-se estruturas ativas, evitando a associação de proteínas ainda não enoveladas corretamente. Também atuam ativamente, com hidrólise de ATP e modificação conformacional de algumas proteínas (Mayer *et al*, 2005).

Nem sempre esse tipo de chaperona age em cadeias protéicas que estão sendo sintetizadas; elas também estão envolvidas no transporte de proteínas para dentro das organelas e do núcleo, desenovelando-as para tanto. Dentro da organela, a proteína se enovela novamente, na sua forma termodinamicamente mais estável (enovelamento espontâneo da proteína), mas ela não pode ficar assim. Então entram em ação as chaperonas que as forçam a se enovelarem na forma biologicamente ativa. Um bom exemplo é a transferência de proteínas que são sintetizadas no citosol, lá ficam prontas, mas devem funcionar na mitocôndria. Para entrar na mitocôndria, ela precisa ser desenovelada, transportada e depois re-enovelada no interior da mitocôndria. Certamente, as chaperonas ajudam a direcionar a cadeia para o interior da mitocôndria (Fenton *et al*, 2003).

Alguns estudos têm mostrado que o pH extracelular induz a expressão de genes que codificam para HSP em condições normais de temperatura. A exposição de astrócitos de ratos ao pH extracelular ácido, principalmente quando o pH foi ajustado para 5.5, provocou um aumento na síntese de várias proteínas, incluindo uma HSP-68 (Nishimura *et al.*, 1989). Células de rim de camundongos expostas ao pH extracelular ácido ajustado para 5.5, também apresentaram uma indução da expressão de uma proteína HSP70 (Khandjajian, 1990). Em *Brucella suis*, foi observada uma ativação da transcrição do gene homólogo a *hsp70* de *N. crassa* (*dnaK*) pelo pH ácido; condição encontrada nos macrófagos do hospedeiro. Essa indução de *dnaK* é um evento essencial para sobrevivência e adaptação de *Brucella suis* nos fagócitos (Köhler *et al.*, 2002).

Em nosso laboratório, um estudo feito com bibliotecas subtrativas (SSH) identificou genes de HSP70 diferencialmente expressos em *N. crassa*.

Uma busca feita por HSPs na base de dados do genoma da *Neurospora crassa* (<http://mips.gsf.de/genre/proj/ncrassa/>), mostrou 27 genes prováveis, candidatos ou confirmados.

6. Ensaio do Retardo da Mobilidade Eletroforética - EMSA

O método de retardo em gel é uma das formas mais rápidas de se analisar a interação entre DNA e proteína(s) *in vitro*. A estratégia se fundamenta no fato de que a mobilidade eletroforética de um ácido nucléico se altera quando uma proteína se liga a ele.

Essa técnica se popularizou a partir das publicações de Garner e Revzin; e Fried e Crothers, 1981. O extrato protéico é incubado com segmentos de DNA de fita dupla, marcados radioativamente (as sondas), para permitir a formação do complexo proteína-DNA. A mistura é submetida à eletroforese sob condições não desnaturantes. O complexo DNA/proteína formado apresenta, em geral, uma mobilidade eletroforética mais lenta quando comparada àquela exibida pela sonda livre. As bandas correspondentes ao DNA ligado à proteína e ao DNA livre são visualizadas por autorradiografia.

Para confirmar se os retardos da mobilidade eletroforética são ocasionados pela ligação específica da sonda com a proteína de interesse, utilizam-se nesses experimentos dois tipos de sondas: a sonda controle que contém uma seqüência qualquer, diferente do suposto sítio de reconhecimento da proteína e a sonda original, que contém a seqüência específica (consenso) à qual a proteína em estudo se liga. Assim, tanto a sonda original como a sonda controle, são submetidas à incubação em contato com o extrato protéico, para que ocorra a formação dos complexos proteína-DNA. Se após essa incubação, o retardo em gel for observado apenas na eletroforese da sonda específica+proteína, pode-se confirmar que o retardo foi ocasionado realmente pelo reconhecimento do consenso pela proteína.

Como o EMSA é um ensaio que não nos fornece a massa molecular das proteínas em estudo, associamos essa técnica à cromatografia de filtração

em gel para que as frações protéicas de 72KDa, 53KDa e 27KDa obtidas a partir da cromatografia fossem submetidas ao EMSA.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Analisar a expressão gênica e o processamento do fator de transcrição PacC nos fungos filamentosos *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa* quando cultivados em diferentes meios de cultivo.

*MATERIAL E
MÉTODOS*

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Linhagens

1.1. Linhagens de *N. crassa*

Foram utilizadas as linhagens selvagem St.L.74-OR23-1VA (FGSC#2489) e nocaute *pacC*^{KO} (FGSC#11397) obtidas do *FGSC (Fungal Genetics Stock Center), Kansas City, USA*. Essas linhagens foram estocadas em leite em pó diluído a 5% (m/v) e transferidos para tubos *ependorfs* contendo sílica gel seca e estéril.

1.2. Linhagens de *A. nidulans*

As linhagens *pabaA1* (requer ácido p-aminobenzóico; FGSC#A610) e *pabaA1 paB7* (FGSC#A244) de *A. nidulans* também foram usadas no presente estudo. As mutações em *A. nidulans* foram descritas por Clutterbuck, 1993 e as linhagens mutantes são encontradas no Fungal Genetic Stock Center (University of Missouri, Kansas City, MO). A linhagem mutante foi selecionada por apresentar níveis reduzidos de atividade de fosfatase alcalina em pH 6,5 (Dorn, 1965b). Os conídios foram estocados também em leite em pó.

2. Extração de proteínas totais de *A. nidulans* e *N. crassa*

As linhagens *pabaA1* e *pabaA1 paB7* de *A. nidulans*, foram semeadas em placas de Petri (9 x 2 cm) contendo 30 mL de meio completo sólido em pH 5 ou 6,5, respectivamente por 5 dias, a 37° C (Cove, 1966). Posteriormente, as placas foram raspadas e os conídios depositados em frascos contendo, cada um, cerca de 15ml de tween 80. Então, foram filtrados em lã de vidro e centrifugados por 10 minutos, a 5000 rpm, sendo o sobrenadante descartado, e o precipitado ressuspense em salina 0,85%. Foi

feita uma diluição dessa suspensão em água destilada (1:100) e os conídios foram contados em câmara de Neubauer, para que 10^6 conídios por mililitro fossem inoculados em meio líquido. Então, as linhagens *pabaA1* e *pabaA1 paB7* cresceram nos meios líquidos correspondentes (tabela 1) por 16 horas sob agitação (200rpm), a 37°C (Tilburn *et al*, 1995).

O meio mínimo líquido foi preparado conforme descrito por Cove (1966). Foram adicionados glicose 1% (v/v) como fonte de carbono e *paba* (0,20 µg/mL) após o meio ter sido autoclavado.

O meio líquido YAG foi preparado adicionando-se 0,5% (w/v) de extrato de levedura, 55 mM de glicose, 0,1% (v/v) de solução de elementos traços e 0,2% (v/v) de solução de vitaminas. As soluções de elementos traços e vitaminas foram descritas por Cove (1966). Foram adicionadas concentrações variadas de KH_2PO_4 nesses meios, conforme indicação na tabela 1 (Heinonem e Lathi, 2004).

Todos os meios foram tamponados com 50 mM de citrato de sódio (pH 4,5).

Em relação às linhagens 74A (parental) e *pacC^{K0}* de *N. crassa*, para a obtenção de conídios, uma pequena porção de hifas contendo esporos de cada linhagem de *N. crassa* foi inoculada em *erlenmeyers* contendo 30 mL de meio sólido de Vogel, inclinado (Vogel, 1956). Após inoculação, os *erlenmeyers* foram incubados a 30°C por 72 h. Em seguida, os mesmos foram deixados à temperatura e luz ambiente por 3 a 4 dias para favorecer a conidiação. Essas culturas podem ser estocadas por até 30 dias a 4°C, sendo renovadas após esse período.

Posteriormente, conídios de cada linhagem de *N. crassa* cultivados no meio sólido de Vogel foram suspensos em água destilada estéril, filtrados em lã de vidro estéril para retirada do micélio, diluídos e contados em câmara de Neubauer no microscópio. A suspensão de conídios contendo 10^6 células/ml cresceu a 30°C por 16 h sob agitação (200 rpm) em 100mL de meio líquido de *Fries*, pH 5, suplementado com 100µM de fosfato (Crocken & Nick, 1963).

As condições de cultivo para extração de proteínas do *A. nidulans* e da *N. crassa*, estão relacionados na tabela I e no apêndice I.

Microrganismo	Linhagem	Meio de Cultivo
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1</i>	M.Mín, Pi 200µM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	Meio YAG, Pi 100mM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1</i>	Meio YAG, s/Pi, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1</i>	Meio YAG, Pi 100mM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	M.Mín, Pi 200µM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	Meio YAG, s/Pi, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	M.Mín, Pi 10mM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1</i>	M.Mín, Pi 200µM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1</i>	Meio YAG, s/Pi, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	M.Mín, Pi 200µM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	Meio YAG, s/Pi, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1</i>	YAG, Pi 10mM, pH 4,5
<i>A. nidulans</i>	<i>pabaA1 pa/B7</i>	Meio YAG, Pi 10,3mM, pH 4,5
<i>N. crassa</i>	74A	Meio <i>Fries</i> , Pi 100µM, pH 5
<i>N. crassa</i>	<i>pacC^{K0}</i>	Meio <i>Fries</i> , Pi 100µM, pH 5

Tabela 1. Diferentes linhagens e meios de cultivo utilizados na extração de proteínas totais.

Após 16 h de crescimento, antes de se iniciar a extração, todos os meios de cultivo tiveram o pH conferido e não apresentaram alterações, já que os meios eram tamponados. Então, o micélio de todas as linhagens foi filtrado em funil de *buchner*, macerado com areia e homogeneizado ao tampão de lise, numa proporção aproximada de 1ml para cada 0,1g de micélio, contendo inibidor de proteases (apêndice IV). Para separar a areia da solução, a suspensão foi centrifugada a 12000 rpm por 15 minutos. Em seguida, a proteína foi precipitada pela adição de sulfato de amônio ao sobrenadante, a 70% da concentração de saturação. A solução permaneceu a 0° C, sob agitação por 30 minutos e foi centrifugada a 15000 rpm por 10 minutos. O precipitado final foi submetido à diálise (apêndice IV) para retirada do sulfato de amônio resultante. Todo experimento foi realizado a, no máximo, 4° C. (Perez-Esteban *et al*, 1993; Orejas *et al*, 1995)

Após extraídas, as proteínas foram quantificadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (SDS-PAGE) para verificação de sua integridade (Laemmli, 1970; Sambrook *et al.*, 1989).

2.1. Preparação das amostras para eletroforese em SDS-PAGE

20 µg de proteína foram homogeneizadas em um volume final de 20 µL contendo SDS 2% (m/v), glicerol 27,6% (v/v), azul de bromofenol 0,001% (v/v) e β-mercaptoetanol 1% (v/v). As amostras assim preparadas foram incubadas em banho a 100°C por 5 min e depois aplicadas no gel polimerizado. Foram utilizados como padrões de peso molecular: Albumina (PM= 66000), Ovoalbumina (PM= 44000) e Anidrase Carbônica (PM= 29000) (Sigma).

Após a eletroforese, o gel de poliacrilamida foi corado com Coomassie Blue e lavado com ácido acético (apêndice IV).

2.2. Determinação da concentração de proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada pelo método do microbiureto, conforme descrito por Itzhaki e Gill (1964).

Esse método faz uso da propriedade de íons Cu^{2+} , em meio alcalino, de formar ligações com o nitrogênio das ligações peptídicas. Desta reação, (reação de biureto) resulta uma coloração púrpura intensa. Assim, a quantidade de proteínas na solução é determinada por colorimetria. A cor desenvolvida pela reação dos íons Cu^{2+} com as proteínas, em meio alcalino, deve-se exclusivamente às ligações peptídicas e a sua intensidade é proporcional à quantidade de tais ligações.

3. Coluna Cromatográfica de filtração em gel

Antes de submetermos as proteínas extraídas ao EMSA, elas foram cromatografadas, em coluna Sephadex G-100, medindo 1,10m x 2cm de diâmetro, previamente equilibrada com tampão NH_4HCO_3 50mM pH 7,5. A resina foi hidratada, equilibrada com o tampão de eluição da coluna e deaerada por 1 hora (Rossi *et al*, 1975).

Após enchida e lavada, a coluna foi padronizada com várias repetições, utilizando-se o blue dextran de massa molecular de 2000KDa como indicador do volume morto da coluna; e os padrões BSA (Albumina do Soro Bovino), Ovoalbumina e Anidrase Carbônica, de massas moleculares 66000Da, 44000Da e 29000Da, respectivamente. O fluxo médio mantido foi de 15ml/hora, coletando-se frações de aproximadamente 2,0 mL por tubo. Foram aplicados 40mg de cada amostra de proteína na coluna de filtração em gel e os perfis cromatográficos foram desenhados.

A partir dos volumes obtidos para cada padrão utilizado, pudemos traçar a reta padrão da coluna ($\text{PM } 10^{-3} \times v/v_0$) e identificar os volumes em que as frações protéicas de 72KDa, 53KDa e 27KDa, correspondentes às frações íntegra, intermediária e processada do PacC, respectivamente, seriam coletadas da coluna, ao aplicarmos cada amostra protéica.

As proteínas foram monitoradas durante os processos cromatográficos com relação às suas concentrações por leitura em absorbância no comprimento de onda de 280 nm, considerando que resíduos de aminoácidos aromáticos absorvem a luz ultravioleta, sendo o triptofano o mais intenso (280 nm) seguido por tirosina (274 nm). Cada amostra protéica foi cromatografada pelo menos duas vezes, para que tivéssemos certeza do perfil traçado.

4. Ensaio de Retardo da Mobilidade Eletroforética (EMSA)

Para avaliarmos a presença da proteína PacC nas preparações protéicas, foi realizado o EMSA: ensaio do retardo da mobilidade eletroforética (Espeso *et al*, 2000; Ruscher *et al*, 2000; Vetchinova *et al*, 2006).

Nesse experimento, foram utilizadas duas sondas de 29pb do gene da isopenicilina sintase. A primeira, denominada sonda específica, continha o consenso para o fator de transcrição PacC (**GCCAAG**), para permitir a formação do complexo proteína-DNA (5'-**CGAAGCACTGCCAAGGGCCTTCACAAGA-3'**). A segunda sonda, denominada sonda-controle, tinha o consenso mutado (5'-**CGAAGCACTGCCTAGAGGCCTTCACAAGA-3'**), diferente do suposto sítio de reconhecimento da proteína PacC, para confirmar se a ligação entre o extrato protéico e a sonda original era específica.

Esse ensaio não nos fornece a massa molecular das amostras; mas apenas se a proteína liga-se ou não ao oligonucleotídeo específico. Por esse motivo, além de realizarmos o EMSA com os extratos protéicos totais, fizemos o mesmo ensaio de retardo com as frações protéicas de 72KDa, 53KDa e 27KDa, obtidas a partir da coluna sephadex G100, pois assim poderíamos verificar a presença da proteína PacC íntegra e/ou processada.

4.1. Preparo da sonda: Marcação e Anelamento

Cada oligonucleotídeo (0,85ng das fitas simples tanto da sonda específica como da sonda controle) foi adicionado a 4µl da enzima T4 poli kinase, 5µl do tampão 10X, 34µl de água estéril e 2µl de ATP. A reação foi marcada por 1 hora a 37° C. O radioativo utilizado nessa reação foi o ATP, [γ -³²P] – 3000Ci/mmol, 250µCi (PerkinElmer). Em seguida, os oligonucleotídeos foram anelados, cada um com sua fita complementar, através da reação: 96° C por 5 minutos, 94° C por 1 minuto, 92° C por 1 minuto, 90° C por 1 minuto, 88° C por 1 minuto, 86° C por 1 minuto, 84° C por 1 minuto, 82° C por 1 minuto, 80° C por 1 minuto, 78° C por 1 minuto, 76° C por 1 minuto, 74° C por 1 minuto, 72° C por 1 minuto, 70° C por 1 minuto, 68° C por 1 minuto, 66° C por 1 minuto, 64° C por 1 minuto, 62° C por 1 minuto, 60° C por 1 minuto, 58° C por 1 minuto e, finalmente, os oligonucleotídeos permaneceram incubados a 56° C por uma hora. Assim, obtivemos a fita dupla da sonda controle e da sonda específica prontos para serem utilizados no EMSA.

4.2. Purificação das Sondas

Para a purificação das sondas, foi feito um sistema de coluna, utilizando-se uma seringa para insulina (sem o êmbolo), a qual foi colocada dentro de um *ependorf* de 1500 μ l aberto. Todo o sistema foi colocado dentro de um frasco *falcon* de 15ml. Essa “coluna” foi preenchida com resina G25 em tampão Tris-EDTA (apêndice V). Em seguida, as sondas controle e específica foram purificadas, passando-as por essa coluna, a 1000 RPM por 3 minutos.

4.3. Formação do Complexo Proteína-DNA

Para que os complexos DNA-proteína fossem formados, aproximadamente 50 μ g de cada extrato protéico foram adicionados a 2 μ l da sonda já purificada, e incubados no tampão de ligação (apêndice V). A incubação foi feita em geladeira por uma hora. 2 μ l da sonda em contato apenas com o tampão, na ausência de proteína, também foram incubados, para controle da distância percorrida pela sonda livre no gel de poliacrilamida.

4.4. Eletroforese

Após a ligação, o complexo proteína–DNA e a sonda livre, foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em tampão TBE 1X. Em cada amostra, foi adicionado o tampão (*loading*) (apêndice V) antes da eletroforese.

4.5. Exposição e Revelação do gel de poliacrilamida

Feita a eletroforese dos complexos e da sonda livre, a detecção da radiação e revelação foram visualizadas no aparelho *scanner Cyclone* (Perkin Elmer).

5. Northern blot

As análises de *Northern blot* permitem a detecção e quantificação de RNAs de tipos particulares de células. Os RNAs extraídos foram, em seguida, submetidos a uma eletroforese em um gel de agarose contendo formaldeído. A molécula de RNA foi então separada e corada com brometo de etídio que permite a visualização das subunidades do RNA ribossômico através da luz ultravioleta, com tamanhos respectivos de 28S e 18S (aprox. 4.8 e 1.9 kb).

O gel de RNA foi então transferido para uma membrana de nitrocelulose, e o RNA mensageiro foi detectado por hibridação usando uma sonda específica marcada radioativamente (α -[³²P]-dUTP-*labelled probe*). Em nossos experimentos, utilizou-se como sonda, um segmento do gene *pacC* para detecção dos seus níveis de expressão em *N. crassa*, após seu cultivo em diferentes fontes de carbono e concentrações de fosfato. Para a normalização da marcação, utilizou-se o gene da actina, marcado radioativamente.

5.1 Extração de RNA e transferência para membrana de náilon

Todo o material utilizado nas extrações de RNA total foi previamente tratado com água/DEPC (0,1% v/v) (Sambrook *et al.*, 1989) e esterilizado em estufa a 120°C por 24 horas, ou em autoclave por 30 min, a 1,3 atm de pressão.

O RNA total da linhagem selvagem 74A de *N. crassa* foi extraído do micélio, após seu crescimento em meio líquido de *Fries*, pH 5. Os meios de cultivo tiveram suas fontes de carbono variadas entre sacarose 44mM, acetato de sódio 44mM ou acetato 44mM e sacarose 44mM. Cada meio foi suplementado com baixas (100µM) ou altas (10mM) concentrações de fosfato. Assim, a linhagem selvagem foi inoculada nos três tipos de meios de cultivo empregados (apêndice I).

Aproximadamente 50 mg de micélio foram macerados em cadinho primeiramente com auxílio de nitrogênio líquido, e em seguida com 1,0 mL de Trizol® (Invitrogen). A mistura foi transferida para um *eppendorf*, agitada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente durante 5 min. Em seguida,

foi adicionado clorofórmio na proporção de 0,2 mL para cada 1 ml de Trizol® e, após agitação, as amostras foram incubadas novamente à temperatura ambiente por 3 min e centrifugadas a 12.000 RPM por 15 min a 4°C. A fase aquosa foi precipitada com 0,5 mL isopropanol/mL de Trizol®, incubada por 10 min à temperatura ambiente e centrifugada a 12.000 RPM por 10 min a 4°C. O precipitado resultante foi lavado com etanol 75% e seco à temperatura ambiente por 30 min. O pellet obtido foi ressuspenso em água tratada com DEPC (0,1% v/v) e incubado a 65°C por 5 min para sua completa dissolução.

A concentração dos RNAs foi determinada em espectrofotômetro, pela absorvância das preparações em 260 nm, utilizando $1_{OD260} = 40 \mu\text{g/mL}$ de RNA como valor padrão. O grau de pureza foi avaliado pela relação OD 260/280 nm, que deve ser próxima a 2,0 para ácidos nucleicos. As amostras de RNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5%, e congeladas a -80°C.

Após a eletroforese, o gel contendo os RNAs foi incubado em NaOH 50 mM por 20 min, lavado com água/DEPC, e em seguida incubado em SSC 20X por 45 min. A transferência dos RNAs para membrana de nylon *Hybond N⁺* (GE Healthcare) foi realizada através do sistema de *Vacuum Blotter Model* (Bio-Rad), utilizando SSC 2x como tampão de transferência por aproximadamente 14 h. A membrana foi deixada à temperatura ambiente por 3 min e exposta à luz ultravioleta por 2 min para fixação do RNA. Todas as soluções utilizadas nessa etapa estão descritas no apêndice II.

5.2. Determinação da atividade enzimática da fosfatase ácida

A atividade da fosfatase ácida secretada no meio de cultivo pela *N. crassa* foi determinada pela incubação de 0,1 mL de amostra em 1,9 mL de solução de reação, contendo 6 mM de substrato pNPP, a 37°C. Essa atividade foi determinada em pH 6,0 (maleato 100 mM, contendo EDTA 2 mM) e a reação foi bloqueada pela adição de 1 mL de NaOH 1M. O *p*-nitrofenol formado foi determinado pela sua absorvância em 405 nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como sendo a liberação de 1 μmol de produto por minuto,

a 37°C. A atividade micelial específica é expressa em unidades de atividade enzimática por mg de proteína (Nahas *et al*, 1982).

5.3. Preparação da Sonda para *Northern Blott*

5.3.1. Extração de DNA genômico (Sambrook *et al*, 1989)

Os conídios da linhagem 74A de *N. crassa* cultivados no meio mínimo sólido de Vogel foram suspensos em água destilada estéril, filtrados em lã de vidro estéril para retirada do micélio, diluídos e contados em câmara de Neubauer no microscópio. A suspensão de conídios contendo 10^6 células foi inoculada em meio líquido de *Fries*, pH 5 sob Pi limitante (100 μ M) (Crocken e Nick, 1963) (Apêndice I).

Após 16 horas de cultivo a 30° C, sob agitação (200 rpm), antes de se iniciar a extração, todos os meios de cultivo tiveram o pH conferido e não apresentaram alterações, já que os meios eram tamponados. Em seguida, 100mg do micélio filtrado em funil de *buchner* foram macerados com nitrogênio líquido, até que uma massa homogênea fosse obtida. Adicionou-se 750 μ l da solução de lise, e o homogeneizado foi incubado por 1 hora a 65° C. Centrifugamos a 13500 RPM por 3 minutos. A partir do sobrenadante, os ácidos nucleicos foram extraídos com 700 μ l de fenol:clorofórmio, e a nova suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 13500 RPM.

700 μ l do reagente SEVAGE foram adicionados ao sobrenadante, e uma nova centrifugação a 13500 rpm por 5 minutos foi feita. Posteriormente, aplicou-se 20 μ l de acetato de sódio 3M, pH 8. O volume do tubo *ependorf* de 1,5 ml foi então preenchido com isopropanol absoluto gelado. Nessa fase, a visualização do DNA já era possível.

Em seguida, o DNA foi precipitado após a centrifugação por 1 minuto a 13500 RPM, e então o sobrenadante foi removido, e o DNA lavado com etanol 70%, gelado.

Mais uma vez, o sobrenadante foi removido e os tubos contendo o DNA foram secos, até que todo etanol fosse retirado. O sedimento foi então dissolvido em água estéril e armazenado a 0° C.

As amostras de DNAs foram quantificadas em espectrofotômetro determinando-se a absorbância em 260 nm, considerando-se como valor padrão $1\text{DO}_{260} = 50 \mu\text{g/mL}$ de DNA.

As soluções utilizadas durante a extração de DNA genômico estão descritas no apêndice III.

5.3.2. Amplificação e marcação radioativa do fragmento do gene *pacC*

Um fragmento de 360pb do gene *pacC* (apêndice VI) contido no DNA extraído da linhagem selvagem da *N. crassa*, foi amplificado por PCR para sua posterior utilização como sonda. Para amplificação por PCR, 0,5 μg de DNA foi transferido para um *ependorf* contendo 1x tampão Taq, 1,5 mM de MgCl_2 , 200 μM de dNTP, 10 μM de cada *primer* (*primers forward* e *reverse* – apêndice VI) e 2.5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen). O volume final foi completado para 25 μl com água deionizada estéril. A reação foi submetida por 2 minutos a 96°C, seguidos de 39 ciclos de 30 segundos a 96°C, 45 segundos a 56°C, 1 minuto a 72°C, e posteriormente por 5 minutos a 72°C, para extensão final.

Para a normalização do *Northern*, o gene constitutivo da actina foi amplificado seguindo o mesmo protocolo, utilizando-se seus *primers* específicos (apêndice VI). Porém, a reação de PCR de 2 minutos a 96°C foi seguida de 39 ciclos de 30 segundos a 96°C, 30 segundos a 59°C, 1 minuto a 72°C; e, finalmente, 5 min a 72°C.

Os produtos das reações foram fracionados em gel de agarose 1% (apêndice III), recortados e purificados utilizando o kit *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (Amersham), conforme instruções do fabricante.

Para marcação do DNA purificado foi utilizado o kit *Random Primers DNA Labelling System* (Invitrogen). Aproximadamente 80 ng do DNA foi diluído em 20 μl de água estéril, denaturado por 5 min a 95°C e incubado imediatamente no gelo. Foram adicionados 2 μl *dATP solution*, 2 μl *dGTP solution*, 2 μl *dTTP solution*, 15 μl *Random Primers Buffer Mixture*, 5 μl (\cong 50 μCi) de [^{32}P]dCTP e 1 μL de *Klenow Fragment*. O volume final foi completado para 50 μl com água deionizada estéril. A reação foi incubada por 1,5 h a 37°C

C. O DNA marcado foi purificado para remoção dos nucleotídeos não incorporados utilizando uma coluna de Sephadex G-50.

5.3.3. Hibridação da membrana com sonda radioativa e detecção da marcação

As membranas foram lavadas com Tampão Church (0,5M EDTA; Na₂HPO₄ 85%; casaminoácidos 1% (m/v) e SDS 7%) aquecida a 65°C por aproximadamente 3h sob agitação suave. A sonda marcada previamente desnaturada foi adicionada à solução de hibridação e a hibridação das membranas foi realizada a 65 °C por 18h. Após a hibridação, foram realizadas lavagens das membranas com solução de SSC 2x e SDS 0,5% (apêndice) aquecida a 42° C sob agitação por 3min. A cada lavagem, as membranas foram checadas quanto à intensidade de radiação. Por fim, foi realizada uma lavagem com SSC 0,1x por 2 min e as membranas foram expostas ao *screening* em placas por 16 h para revelação em *scanner Cyclone* (Perkin Elmer).

6. Regulação da expressão de HSPs em *N. crassa*

Um estudo feito em nosso laboratório, usando bibliotecas subtrativas (SSH), identificou o gene (NCU08693) que codifica uma proteína HSP70 de *N. crassa*.

Outros dois genes de HSP70 em *N. crassa* foram selecionados em função da sua similaridade e localização já definidas. Assim, os genes para estudo escolhidos foram: NCU09602 (HSP1), NCU08693 (HSP2) e NCU01499 (HSP3). Esses genes, de acordo com a pesquisa de suas sequências utilizando-se os programas Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>) e InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>), apresentam domínio para HSP70 e mostram homologia em duas regiões onde as proteínas HSP70 são sintetizadas: um domínio ATPase na porção amino terminal e a região de ligação de substrato na porção carboxi terminal.

As sequências de aminoácidos das três HSPs foram comparadas entre si através do programa INTERPRO *package* (<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>). A HSP3 apresentou a menor identidade dentre as três HSPs. A identidade entre as HSPs 1 e 3 foi de 15%; entre as HSPs 3 e 2 foi de 18,4% e as HSPs 1 e 2 mostraram 44% de identidade.

Foi realizada uma busca por consensos para o fator de transcrição PACC na região promotora das três HSPs, 1000 nucleotídeos à montante da ORF identificada no *Broad Institute*. A região promotora da HSP1 mostrou 6 vezes o sítio de ligação para o PACC (GCCAAG ou GCCAGG). Em relação às HSPs 2 e 3, o sítio de ligação para o PACC foi encontrado 3 vezes.

Para os genes selecionados, NCU09602 (HSP1), NCU08693 (HSP2) e NCU01499 (HSP3) foram desenhados *primers* para amplificar por PCR os fragmentos específicos, a partir do DNA genômico obtido da linhagem selvagem. Esses fragmentos foram então utilizados como sonda (apêndice VI).

Os ensaios de *Northern Blot* foram feitos para análise da expressão gênica das HSPs durante sua adaptação a variáveis níveis de fosfato, pH e temperatura.

Após o crescimento em meio sólido de vogel, 10^6 conídios de cada linhagem (74A e *pacC*^{K0}) foram inoculados em meio *Fries* líquido, nos pHs 5 e 7,8 em triplicata. Cada cultivo, suplementado com 100 μ M (baixo Pi) ou 10 mM (alto Pi) de fosfato, (Metzenberg e Chia, 1979) cresceram a 30° C por 16 horas. Após esse período, parte do cultivo foi submetida a 1 hora de crescimento a 45° C e outra parte, foi submetida ao mesmo choque térmico por 2 horas. (Crocken e Nyc, 1963; Han *et al.*, 1994; Hafker *et al.*, 1998).

O RNA total foi então extraído das linhagens 74A (selvagem) e *pacC*^{K0}, submetidos ou não ao choque térmico, usando o reagente TRIzol[®] seguindo as especificações do fabricante (Invitrogen).

Em seguida, foi feito o ensaio de *Northern Blott*, previamente descrito no item 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Quantificação das Proteínas Extraídas

Todas as proteínas extraídas, a partir das condições de cultivo descritas, foram quantificadas. As concentrações determinadas, bem como cada condição de cultivo estão representadas abaixo (tabela 2).

Tabela 2. Quantificação dos extratos protéicos.

Amostra	Legenda	Concentração
1	<i>paba</i> A1 M.Mín 200uM pH4,5	8,45mg/ml
2	<i>paba</i> A1 palB7 YAG 100mM pH4,5	7,61mg/ml
3	<i>paba</i> A1 YAG s/Pi pH4,5	9,40mg/ml
4	<i>paba</i> A1 YAG 100mM pH 4,5	8,00mg/ml
5	<i>paba</i> A1 palB7 M.Mín 200uM pH 4,5	9,18ml/ml
6	<i>paba</i> A1 palB7 YAG s/Pi pH 4,5	7,76mg/ml
7	<i>paba</i> A1 palB7 M.Mín 10mM pH 4,5	6,92mg/ml
8	74A <i>Fries</i> 200uM pH 5	9,05mg/ml
9	<i>PacC</i> ^{ko} <i>Fries</i> 200uM pH 5	7,82mg/ml

2. Perfis Cromatográficos

Os extratos protéicos dos fungos *A. nidulans* e *N. crassa*, após seu cultivo nas condições descritas no item 2, em pH ácido, foram cromatografados em coluna Sephadex G100 (Rossi *et al*, 1975).

O volume morto medido a partir do blue dextran 1%, bem como os volumes para cada padrão de massa molecular utilizado, estão apresentados nas figuras 6 e 7.

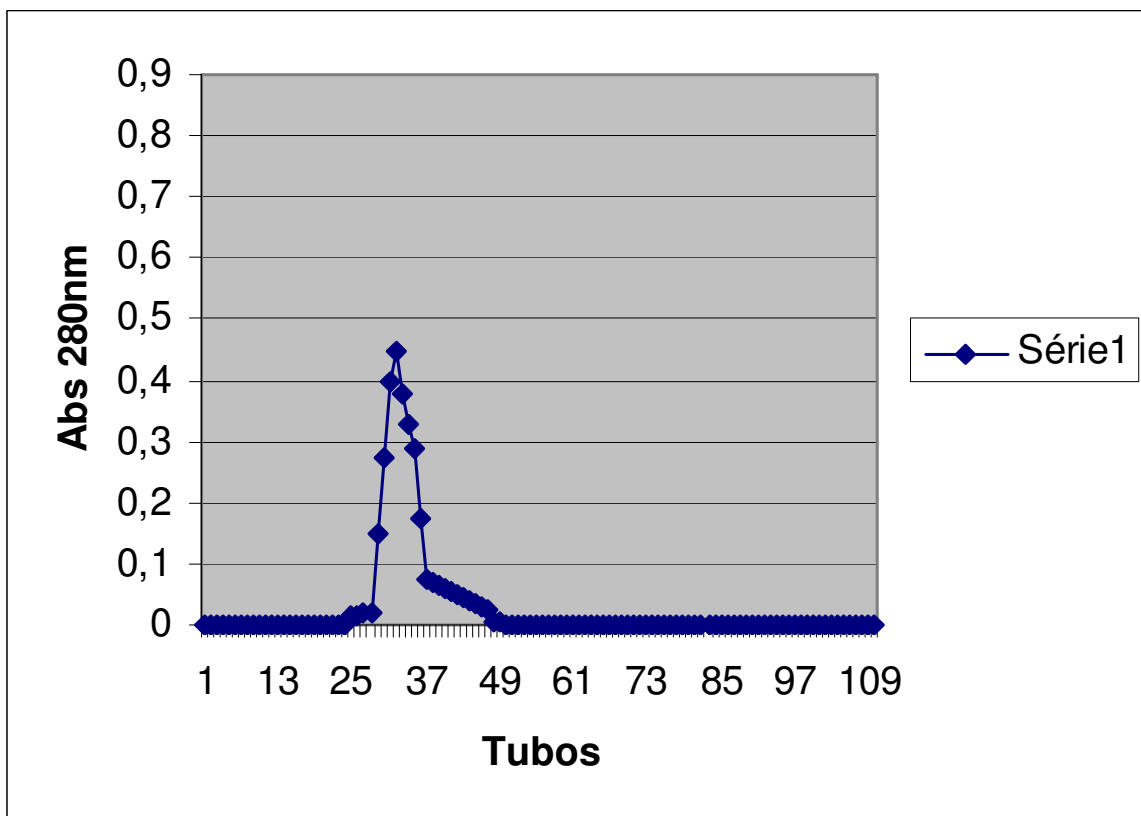


Figura 6. Determinação do volume morto da coluna, expresso em tubos, medido a partir da cromatografia em Sephadex G-100, feita com o padrão de massa molecular Blue Dextran (2000KDa) a 1%.

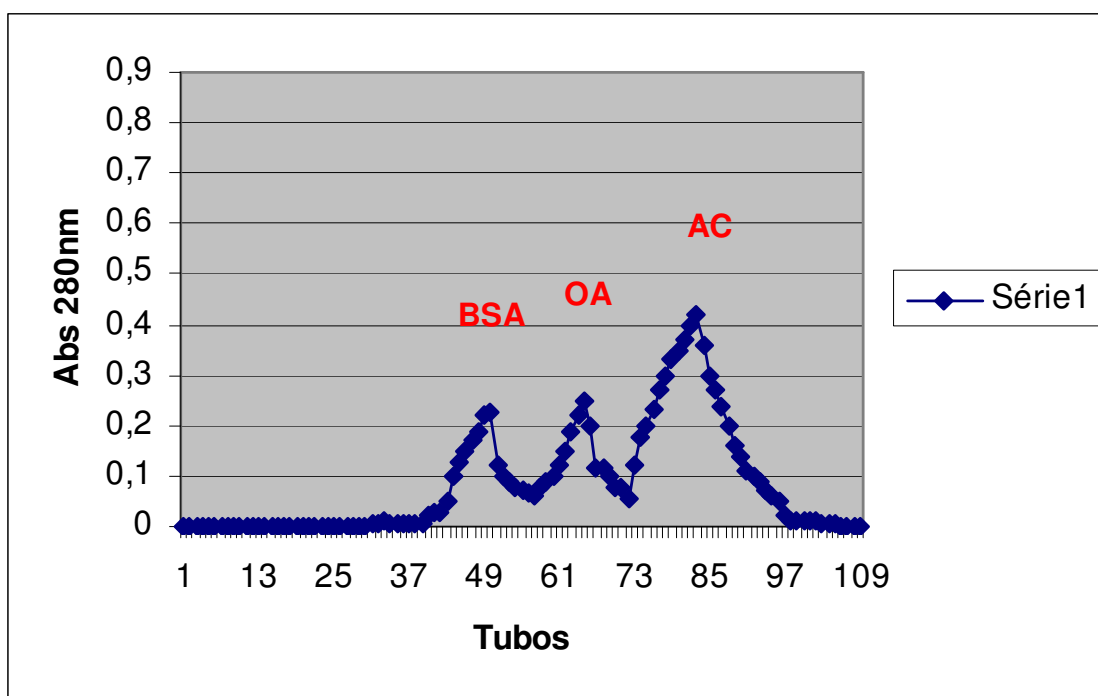


Figura 7. Cromatografia dos padrões de massa molecular, BSA (albumina de soro bovino – 66000Da), OA (ovoalbumina – 44000Da) e AC (anidrase carbônica – 29000Da).

Após padronizarmos a coluna com blue dextran e os padrões de massa molecular, foi construída a curva padrão (figura 8) da coluna. Através dessa curva, e pelos valores de V/v_0 (volume em que as frações de massa molecular definida foram coletadas/volume morto da coluna), foram determinados os volumes 78,7ml, 109,6ml e 157,55 ml que correspondiam aos volumes em que as frações 72, 53 e 27KDa seriam coletadas da coluna.

PM 10^{-3}

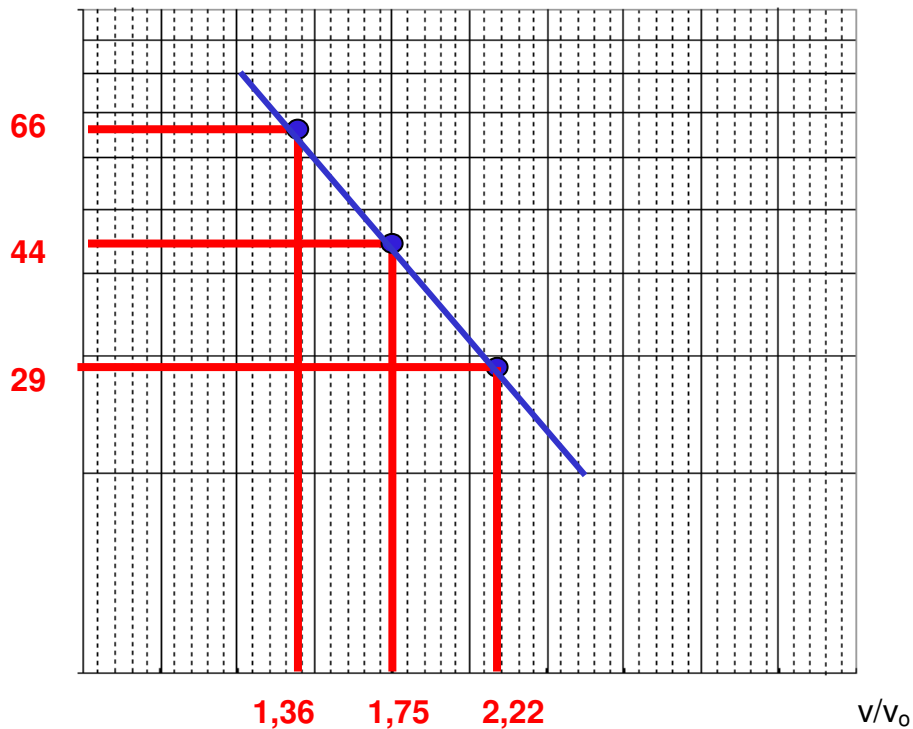


Figura 8. Representação da curva padrão construída a partir dos volumes em que as frações dos padrões de massa molecular foram coletadas. A partir dessa curva, mediram-se os volumes em que nossas frações de interesse (72, 53 e 27KDa) seriam coletadas.

As figuras 9, 10 e 11 mostram os perfis cromatográficos das amostras protéicas, com indicação das frações de interesse.

A análise desses cromatogramas, os quais retratam perfis cromatográficos traçados a partir de extratos protéicos do *A. nidulans*, observou-se um predomínio de proteínas de massa molecular mais baixa no figura 9, enquanto a figura 10 tem uma maior quantidade de proteínas de massa molecular na faixa de 50KDa. Já o cromatograma 11 tem uma diminuição geral na quantidade de proteínas na faixa de peso molecular do nosso interesse (72, 53 e 27). Porém, se compararmos esses 3 tipos de proteínas entre si, veremos que as proteínas de massa 72KDa está em maior quantidade em relação às proteínas de peso 53 e 27.

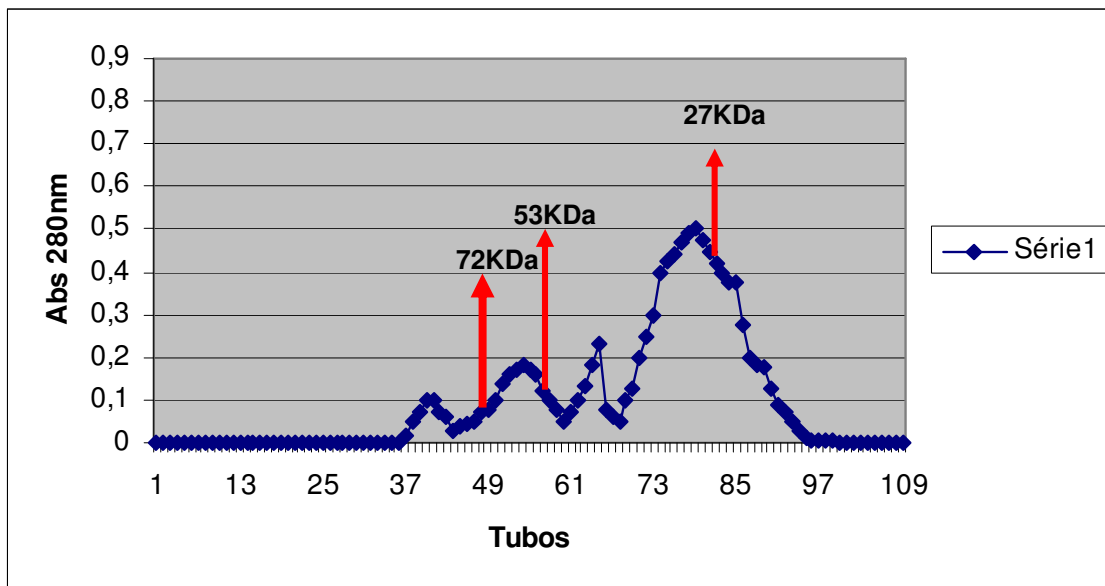


Figura 9. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *paba* A1, cultivada em meio YAG, sem fosfato, pH 4,5.

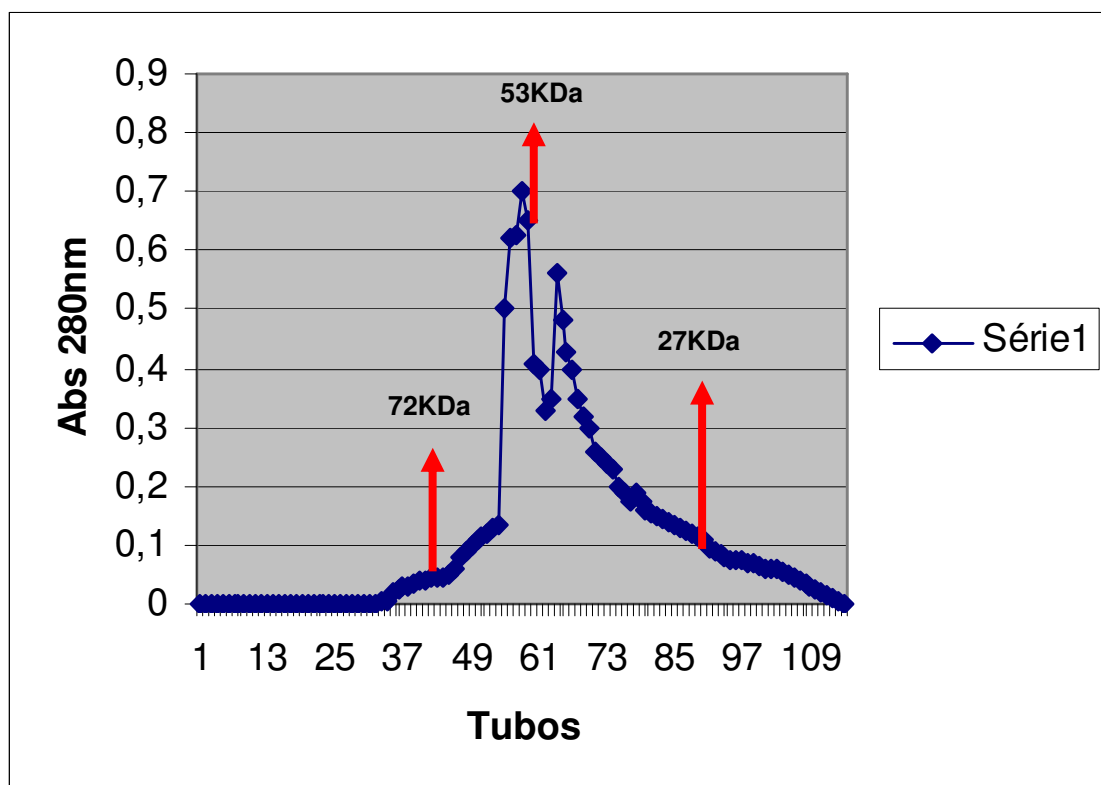


Figura 10. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *paba* A1, cultivada em meio mínimo, suplementado com 200 μ M de fosfato, pH 4,5.

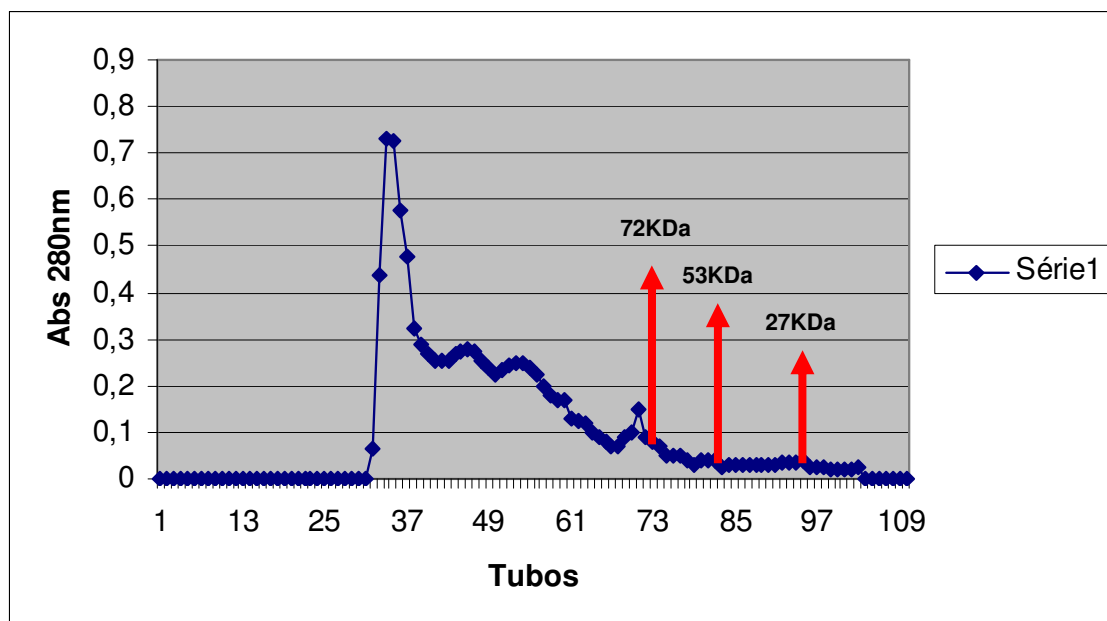


Figura 11. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *paba* A1, cultivada em meio YAG líquido, suplementado com 10,3mM de fosfato, pH 4,5.

Nos cromatogramas 12 e 14, os quais apresentam a linhagem mutante *pabaA1 paB7*, as proteínas de massa molecular de 72kDa, aparecem em maior quantidade em relação às proteínas de 53 e 27kDa. Já no cromatograma 13, há uma similaridade nas quantidades das proteínas de 72kDa e 53kDa além de um pico de proteínas na faixa de 45kDa.

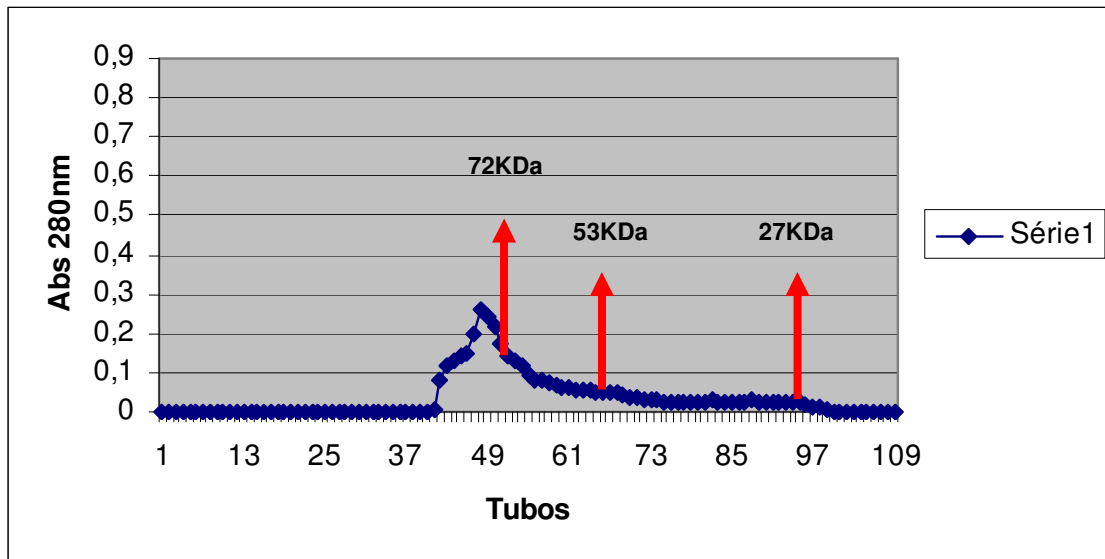


Figura 12. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *pabaA1 paIB7*, cultivada em meio YAG líquido, sem suplemento de fosfato, pH 4,5.

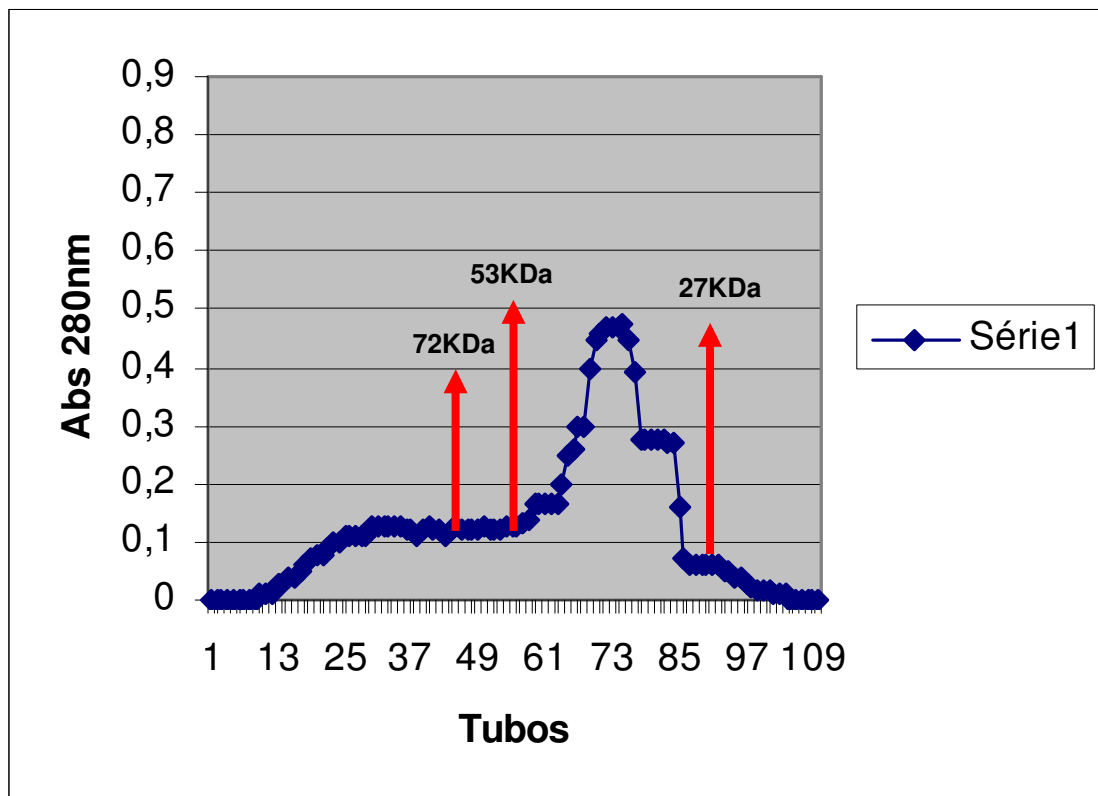


Figura 13. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *pabaA1 paB7*, cultivada em meio mínimo, suplemento com 200µM de fosfato, pH 4,5.

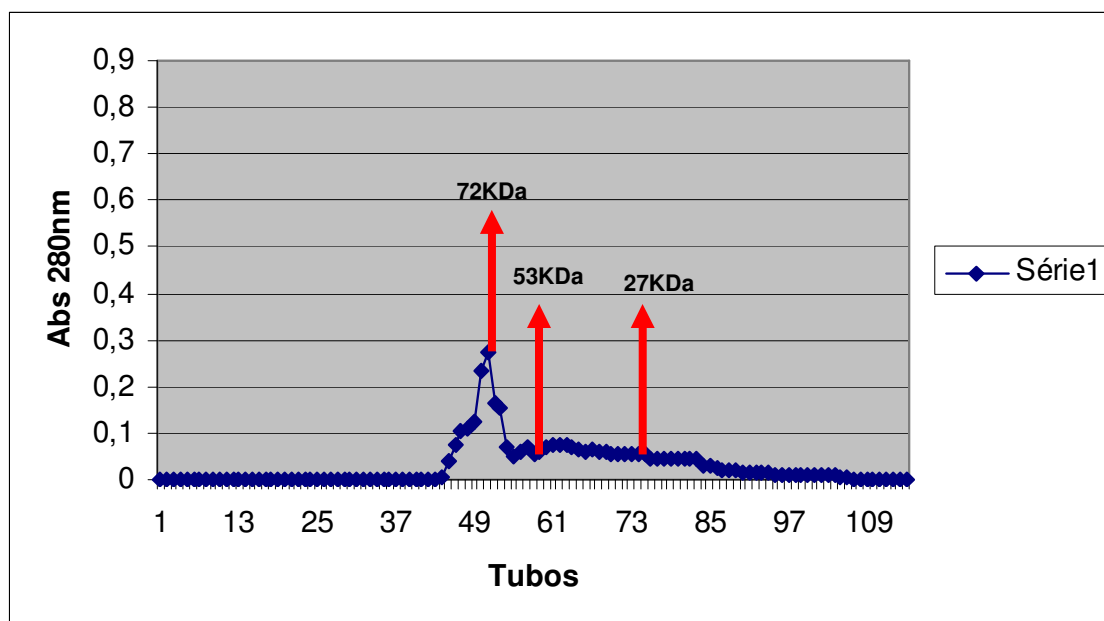


Figura 14. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *pabaA1 paB7*, cultivada em meio mínimo, suplemento com 10mM de fosfato, pH 4,5.

Os perfis cromatográficos (figuras 15 e 16) das amostras protéicas de *N. crassa*, ambas cultivadas em pH 5, sob baixa concentração de fosfato, indicam diminuição das proteínas de peso molecular de 72 e 53, na linhagem nocauteada (figura 16), comparada à linhagem selvagem (figura 15), como esperado. Já a fração protéica de 27KDa permaneceu praticamente a mesma nas duas linhagens.

Por todos esses 9 perfis traçados (figuras 9 a 16), podemos inferir a importância que o meio de cultivo exerce sob o crescimento do fungo e sua síntese protéica. Isso porque, a mesma linhagem, cultivada sob condições diferentes, apresenta um padrão protéico bastante variável. No caso da linhagem *pabaA1* de *A. nidulans*, quando cultivada em YAG, sem fosfato (figura 9), a fração de 27KDa esteve presente em maior quantidade, comparada à mesma linhagem cultivada em meio YAG suplementada com 10,3mM de fosfato (figura 11). O mesmo ocorreu, porém em menor intensidade, com a fração de 53KDa. Já no cultivo em meio mínimo (figura 10), com baixa concentração fosfato (200µM) houve a diminuição das frações 72 e 27KDa (Nahas *et al*, 1982; Freitas *et al*, 2007; Kunamoto, 2008).

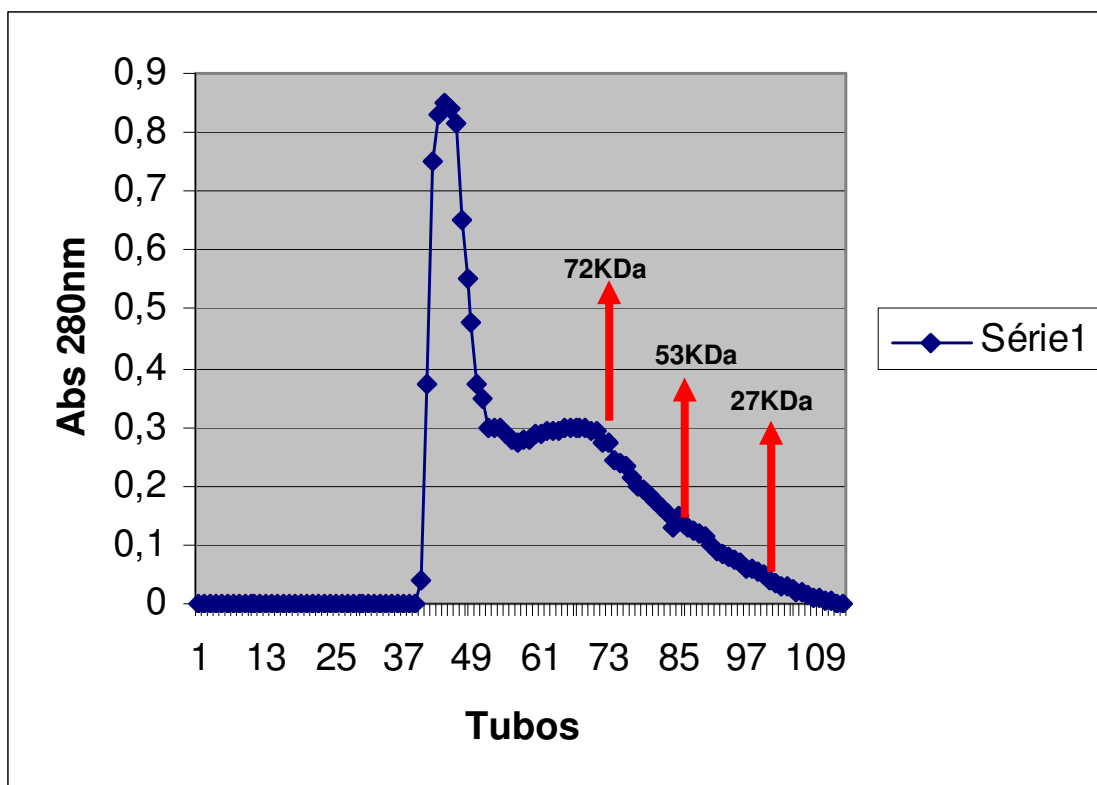


Figura 15. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem 74A de *N. crassa*, cultivada em meio líquido de *Fries*, suplemento com 100µM de fosfato, pH 5.

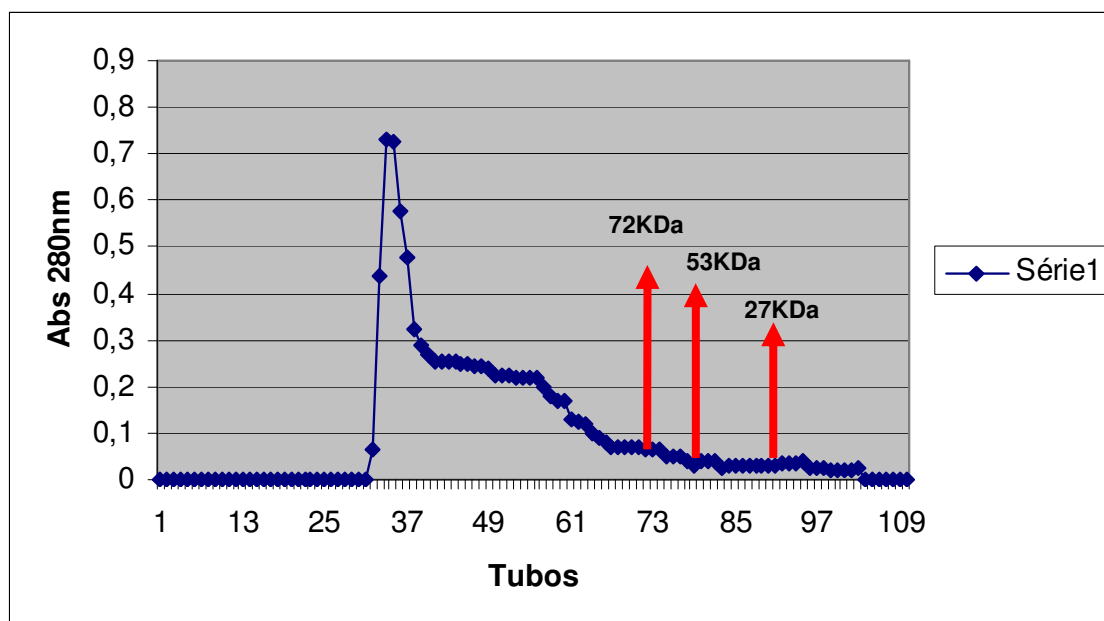


Figura 16. Cromatografia da amostra protéica extraída a partir da linhagem *pacC^{K0}* de *N. crassa*, cultivada em meio líquido de *Fries*, suplemento com 100µM de fosfato, pH 5.

Esses resultados mostraram, mais uma vez, que em meio de cultivo rico, mesmo em pH ácido, na presença de fosfato, o *A. nidulans* não ativa seu fator de transcrição PacC, já que não há necessidade de ativar enzimas como as fosfatases. Porém, quando a quantidade de fosfato disponível no mesmo meio de cultivo foi diminuída, o fungo parece “sentir” a necessidade de ativar estas enzimas, ativando então o PacC.

No cultivo em meio mínimo com baixa concentração de fosfato, em pH ácido, a proteína íntegra (72KDa) apresentou-se em menor quantidade, mostrando também um possível processamento do PacC, para que genes necessários para o crescimento do fungo nesse meio pobre fossem ativados.

Na linhagem mutante *pabaA1 paB7*, a qual tem o gene *paB* da cascata de ativação do PacC mutado (figura 14) a diminuição das proteínas de massa molecular de 27KDa, em relação à linhagem parental já era esperada, já que, nesse caso, não haveria o processamento do PacC. Porém, pode-se também observar a variação nos perfis de proteínas traduzidas, quando o meio de cultivo é variado. Assim, em meios mais “pobres” a síntese protéica foi aumentada, já que o fungo precisa de mais enzimas para sua adaptação e crescimento. Com relação à variação de fosfato disponível no meio YAG, isso

não trouxe grandes diferenças nos perfis cromatográficos 12 e 14, já que, o PacC estaria inativo de qualquer maneira.

Na análise dos cromatogramas obtidos para a *N. crassa*, como o meio de cultivo não variou, observa-se apenas uma diminuição geral das concentrações das proteínas de 72, 53 e 27KDa na linhagem nocauteada, mostrando que, pelo fato do meio de cultivo ser o mesmo, as proteínas traduzidas também seriam as mesmas, se as linhagens não fossem diferentes. Na linhagem mutante, as proteínas de menor massa molecular praticamente não existem, o que era esperado já que o gene *pacC* está inativo.

3. EMSA – Ensaio do Retardo da Mobilidade Eletroforética

Em relação aos géis de EMSA, aqueles feitos com extratos protéicos não fracionados, apresentaram retardo em todas as condições, exceto quando a proteína foi extraída da linhagem *pacC^{K0}* de *N. crassa*, confirmando a presença da proteína PacC, íntegra ou não, em todas as condições de extração de proteína, como esperado (Orejas *et al.*, 1995).

Como controle de cada situação, tanto dos extratos protéicos totais como dos EMSAS feitos com as frações protéicas, foi utilizada a sonda inespecífica, com a qual não foi observado nenhum retardo, mostrando a especificidade dos ensaios. Além disso, a sonda livre, não ligada previamente ao extrato protéico, também foi submetida à eletroforese, mostrando uma distância percorrida no gel maior do que a distância que os complexos proteína-DNA percorreram.

Pode-se dizer também que a ausência de complexo proteína-DNA na linhagem com o gene *pacC* nocauteado (*pacC^{K0}* – *N. crassa*), foi mais um controle da especificidade da sonda utilizada.

A figura 17 mostra o gel de EMSA realizado a partir de proteínas extraídas após o cultivo do *A. nidulans* e *N. crassa*, em meio mínimo e meio YAG, variando sua concentração de fosfato inorgânico adicionado.

O retardo da mobilidade eletroforética foi observado nas linhas 2, 3, 4, 5, 6, 7, e 9; quando comparou-se a distância percorrida por essas amostras

protéicas + sonda, com a eletroforese da sonda livre (linha 1), sem amostra protéica (figura 17).

A única exceção, como era de se esperar, ocorreu com a amostra da linhagem *pacC^{K0}* de *N. crassa*, sob baixa concentração de fosfato, pH5; já que essa linhagem tem o gene *pacC* nocauteado e, portanto, não apresenta essa proteínas traduzida.

Em todas as outras amostras, foi demonstrado a presença da proteína PacC, íntegra ou não, como esperado.

Para se avaliar se a proteína PacC estava processada ou não, foi realizada a cromatografia em coluna Sephadex G100 (cromatogramas 1-10) com essas amostras e, após serem cromatografadas, cada fração protéica (de 72KDa, 53KDa e 27KDa) foi submetida a um novo EMSA.

1	2	3	4	5	6	7	8	9
Sonda Livre	<i>pabaA1</i>	<i>pabaA1</i>	<i>pabaA1</i>	<i>pabaA1</i>	<i>pabaA1</i>	<i>pabaA1</i>	<i>pacC^{K0}</i>	74A
	M.Mín	YAG	<i>palB7</i>	<i>palB7</i>	YAG	<i>palB7</i>	<i>N. Crassa</i>	<i>N.crassa</i>
	Pi 200µM	s/Pi	M.Mín	YAG	Pi 10,3m	YAG	Pi 100µM	Pi 100 µM
	pH4,5	pH 4,5	Pi 200 µM	s/Pi	pH 4,5	Pi 10,3m	pH 5	pH 5
			pH 4,5	pH 4,5		pH 4,5		

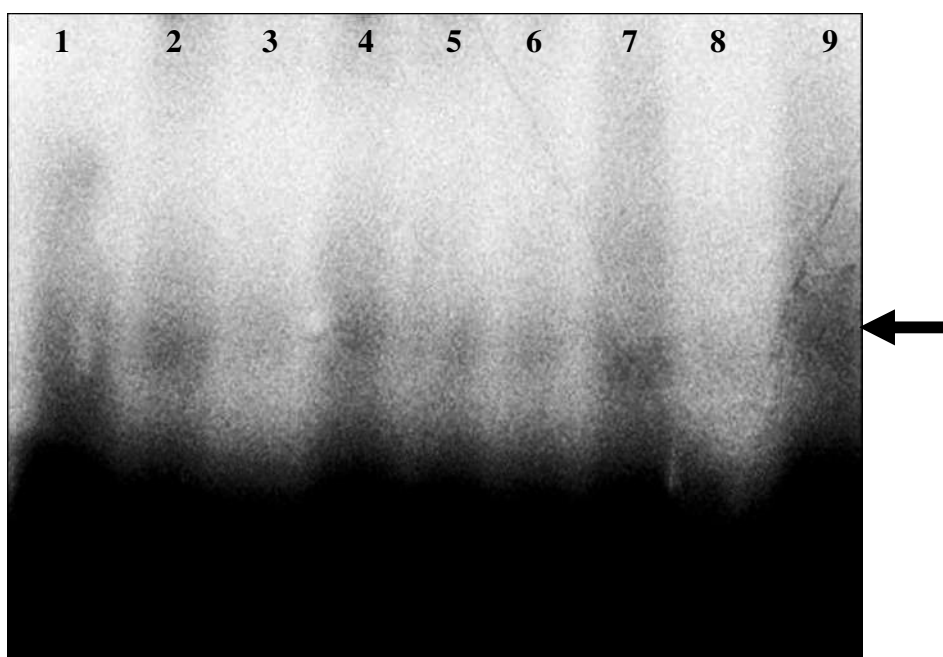


Figura 17. Gel de EMSA feito com amostras protéicas extraídas após cultivo das linhagens *pabaA1* e *pabaA1palB7* de *A.nidulans* e 74A e *pacC^{K0}* de *N. crassa*, nos meios apresentados na figura. A seta mostra o retardo da mobilidade eletroforética resultante do complexo proteína-DNA. A linha 1 apresenta a eletroforese da sonda livre, a qual não apresentou retardo.

Na figura 18a, pode-se observar o retardo da mobilidade eletroforética das frações protéicas tanto obtidas a partir do cultivo da linhagem *paba A1* em meio mínimo de Cove, sob baixa concentração de fosfato; (linhas 2, 3 e 4) quanto em meio YAG sem fosfato adicional (linhas 5, 6 e 7). Como controle desse retardo, foi obtida a eletroforese, em maior distância, da sonda livre (linha 1). Como controle da especificidade da sonda, o mesmo gel foi feito utilizando uma sonda mutada (figura 18b), no qual nenhum retardo foi observado. Isso mostrou que a proteína PacC das frações protéicas ligou-se especificamente ao seu consenso, indicando que essa proteína estava presente na sua forma íntegra (72KDa), intermediária (53KDa) e processada (27KDa) nessas duas condições de cultivo, mesmo sob pH ácido.

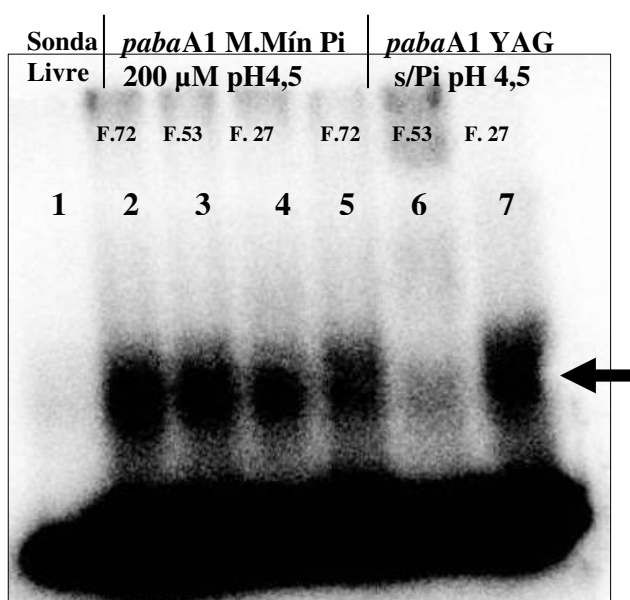


Figura 18a

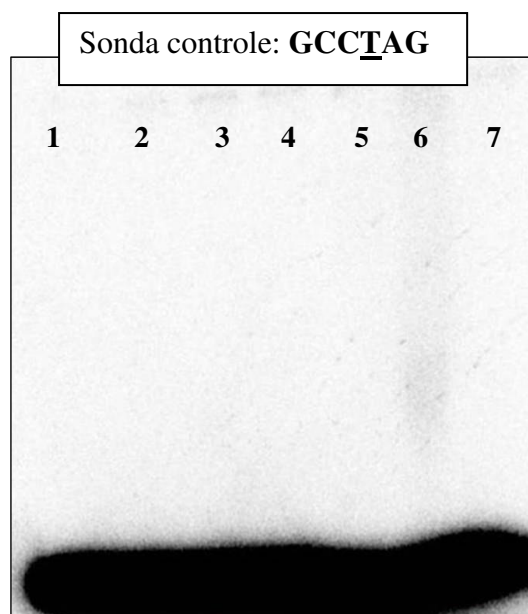


Figura 18b

Figura 18. A Figura 18a, mostra o ensaio de retardo da mobilidade eletroforética das frações de 72KDa (F. 72), 53KDa (F. 53) e 27KDa (F. 27), obtidas após o fracionamento das proteínas de *A. nidulans*, extraídas da linhagem *paba A1*, cultivadas em Meio Mínimo suplementado com 200 μ M de Pi, pH 4,5 (Linhas 2, 3 e 4) ou Meio YAG sem fosfato adicional, pH 4,5 (linhas 5, 6 e 7). A linha 1, demonstrou a eletroforese da sonda livre, na ausência de proteína. A seta indica a altura do gel em que os complexos proteína-DNA foram formados, ocasionando o retardo. A Figura 18b apresenta os mesmos resultados. Porém, na primeira figura a sonda utilizada foi a sonda específica, contendo o consenso para o PacC (GCCAAG), enquanto, na segunda, foi utilizada a sonda controle, mutada (GCCTAG).

As figuras 19 e 20 apresentam o EMSA realizado com frações protéicas extraídas da mesma condição de cultivo: meio YAG, suplementado com alta concentração de fosfato em pH 5, sendo a primeira linhagem, *paba A1* e a segunda, *pabaA1 paB7*. Em ambos os géis, a sonda utilizada foi a sonda específica e, mesmo assim, quando se compara as corridas eletroforéticas das frações 72, 53 e 27 + sonda (linhas 2, 3 e 4), com a corrida eletroforética da sonda livre (linhas 1), pode-se observar que não houve retardo da mobilidade de nenhuma delas.

No caso da figura 19, a ausência do complexo proteína-DNA, demonstrou que, em meio de cultivo “rico”, com alta concentração de fosfato, o microrganismo não ativa a transcrição do fator de transcrição PacC, pois não há necessidade de serem secretadas fosfatases, já que a disponibilidade de fosfato é suficiente. Assim, o fator de transcrição PacC não se apresenta nem na sua forma íntegra, nem processada.

Na figura 20, em todas as frações protéicas, o fator de transcrição também é ausente, já que, o mutante *pabaA1 paB7*, possui uma mutação no gene *paIB*, integrante da cascata de sinalização e ativação do PacC.

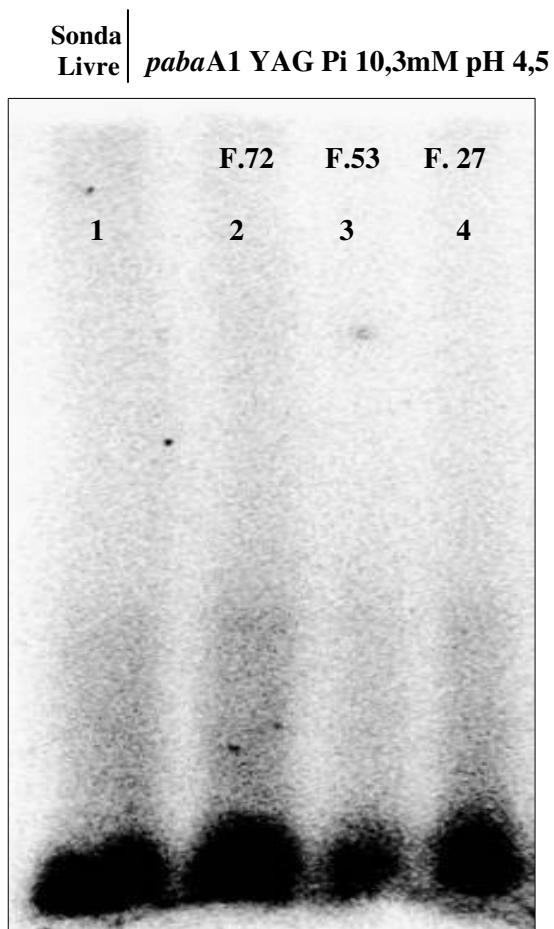


Figura 19. EMSA realizado a partir das frações protéicas de 72KDa (F. 72), 53KDa (F. 53) e 27KDa (F. 27) obtidas após o cultivo da linhagem *pabaA1* em meio YAG, com alto fosfato, em pH 4,5. A linha 1 apresenta a eletroforese da sonda livre.

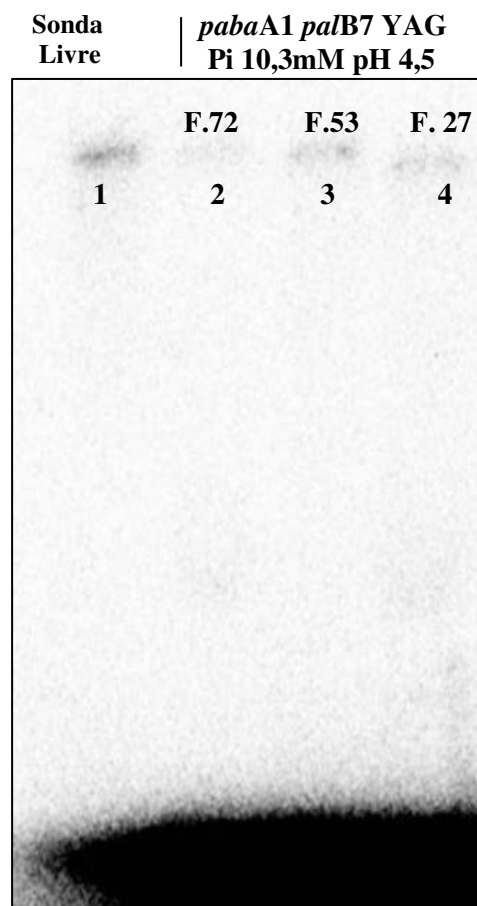


Figura 20. EMSA realizado a partir das frações protéicas de 72KDa (F. 72), 53KDa (F. 53) e 27KDa (F. 27) obtidas após o cultivo da linhagem *pabaA1 palB7* em meio YAG, com alto fosfato, em pH 4,5. A linha 1 apresenta a eletroforese da sonda livre.

As figuras 21, 22 e 23 apresentam ensaio das frações protéicas, obtidas das proteínas extraídas do microrganismo *N. crassa*, utilizando sua linhagem selvagem 74A (figura 12) e a linhagem *pacC^{ko}* (figura 23). Na figura 23, os mesmo ensaios foram apresentados, porém, utilizando-se a sonda mutada.

Na figura 21, observa-se o retardo da mobilidade em todas as frações, quando se compara as linhas 2, 3 e 4 com a corrida da sonda livre (linha 1). Já na figura 22, apesar da sonda específica ser utilizada, nenhum retardo foi ocasionado, já que a linhagem que questão tem o gene *pacC* nocauteado.

A figura 22, utilizada como controle da sonda específica, foi feita com a sonda mutada (controle). Assim, nenhum retardo foi observado; nem para as frações (linhas 2-7) e nem para os extratos protéicos totais (linhas 8 e 9).

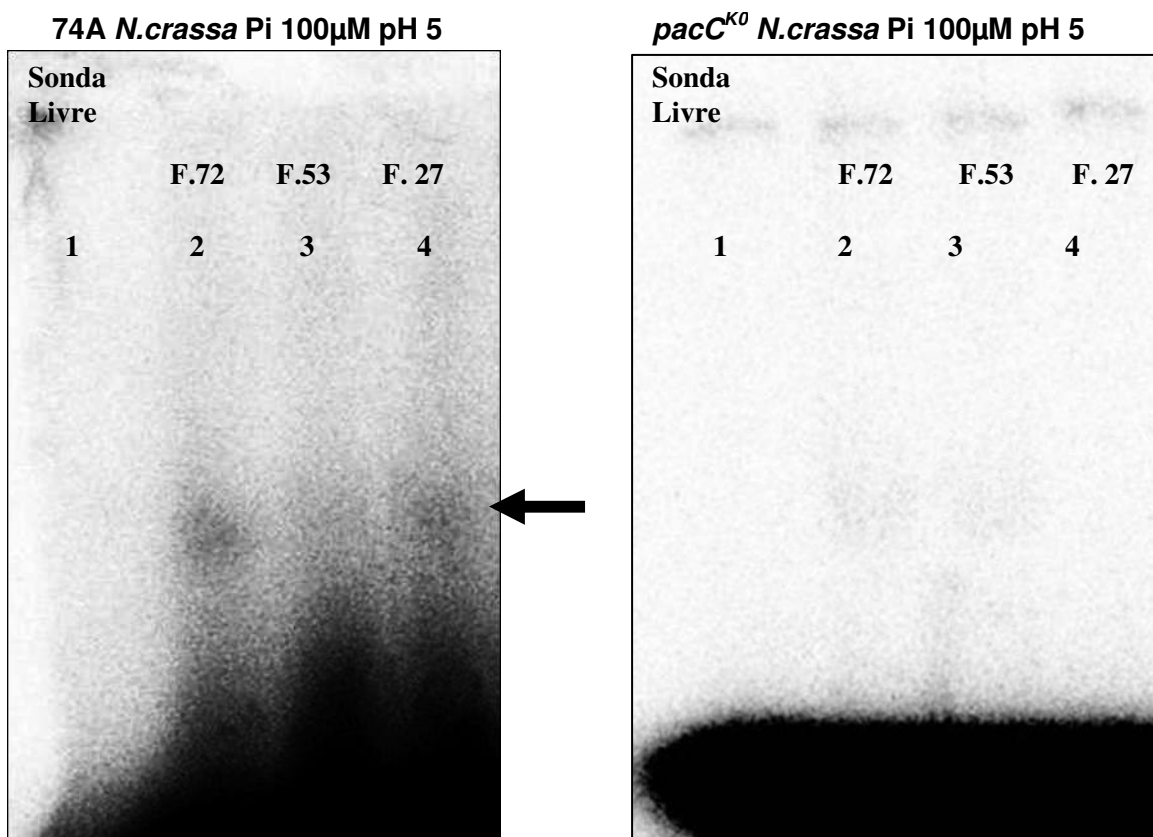


Figura 21. EMSA realizado a partir das frações protéicas de 72 (F.72), 53 (F, 53) e 27 (F. 27) KDa, extraídas da linhagem 74A da *N. crassa*, cultivada em meio líquido de Fries, sob baixo fosfato, em pH 5. A seta indica o retardo da mobilidade observado em todas as frações.

Figura 22. EMSA realizado a partir das frações protéicas de 72 (F.72), 53 (F, 53) e 27 (F. 27) KDa, extraídas da linhagem *pacCK0* da *N. crassa*, cultivada em meio líquido de Fries, sob baixo fosfato, em pH 5 Não observamos nenhum complexo proteína-DNA formado.

Sonda controle: GCCTAG

74A *N.crassa*
Pi 100µM pH 5

pacC^{K0} *N.crassa*
Pi 100µM pH 5

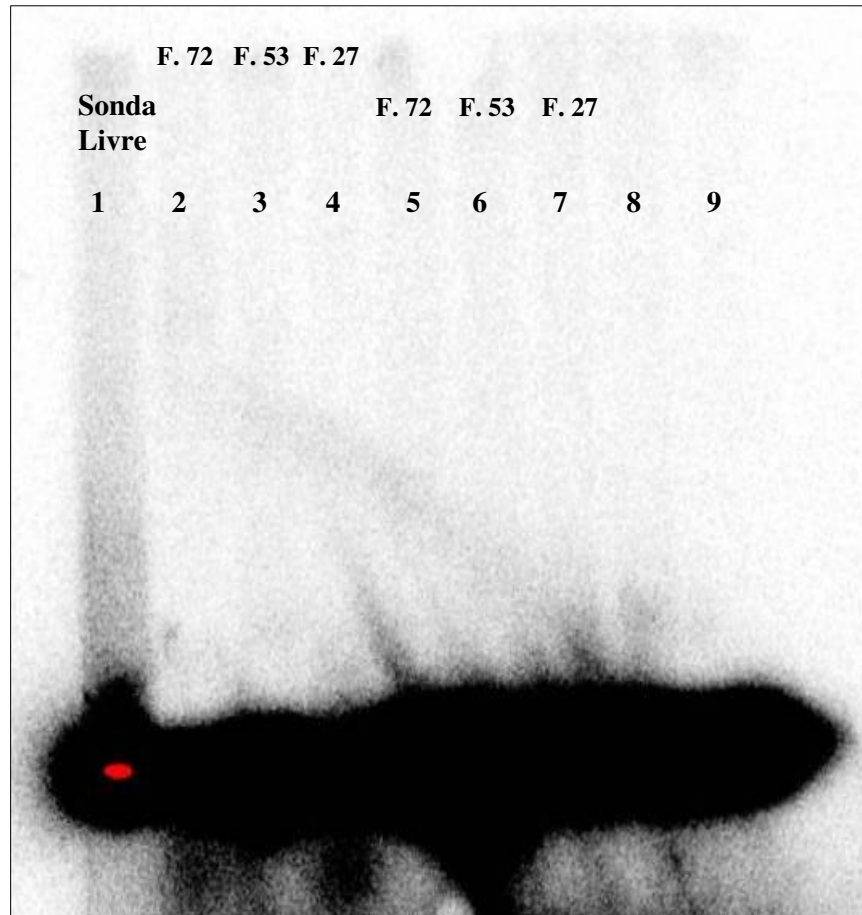


Figura 23. EMSA realizado em *N. crassa*, a partir das frações protéicas de 72 (F.72), 53 (F, 53) e 27 (F. 27) KDa, extraídas da linhagem 74A (linhas 2, 3 e 4) e *pacC*^{K0} (linhas 5, 6 e 7); bem como dos extratos protéicos totais (linhas 8 e 9), não cromatografados. Nesse caso, a sonda utilizada foi a sonda controle (GCCTAG), para validação das especificidade da sonda original.

4. Regulação da Expressão do gene *pacC* e atividade da fosfatase ácida em *N. crassa*

Os *Northern*s para a verificação da expressão do gene *pacC* na linhagem selvagem de *N.crassa* em pH 5 tamponado, de acordo com diferentes fontes de carbono durante seu cultivo, estão apresentados na figura 24. Além

disso, cada meio de cultivo, antes da extração do RNA nessas condições, teve sua atividade enzimática da fosfatase ácida determinada, as quais estão apresentadas na tabela 3.

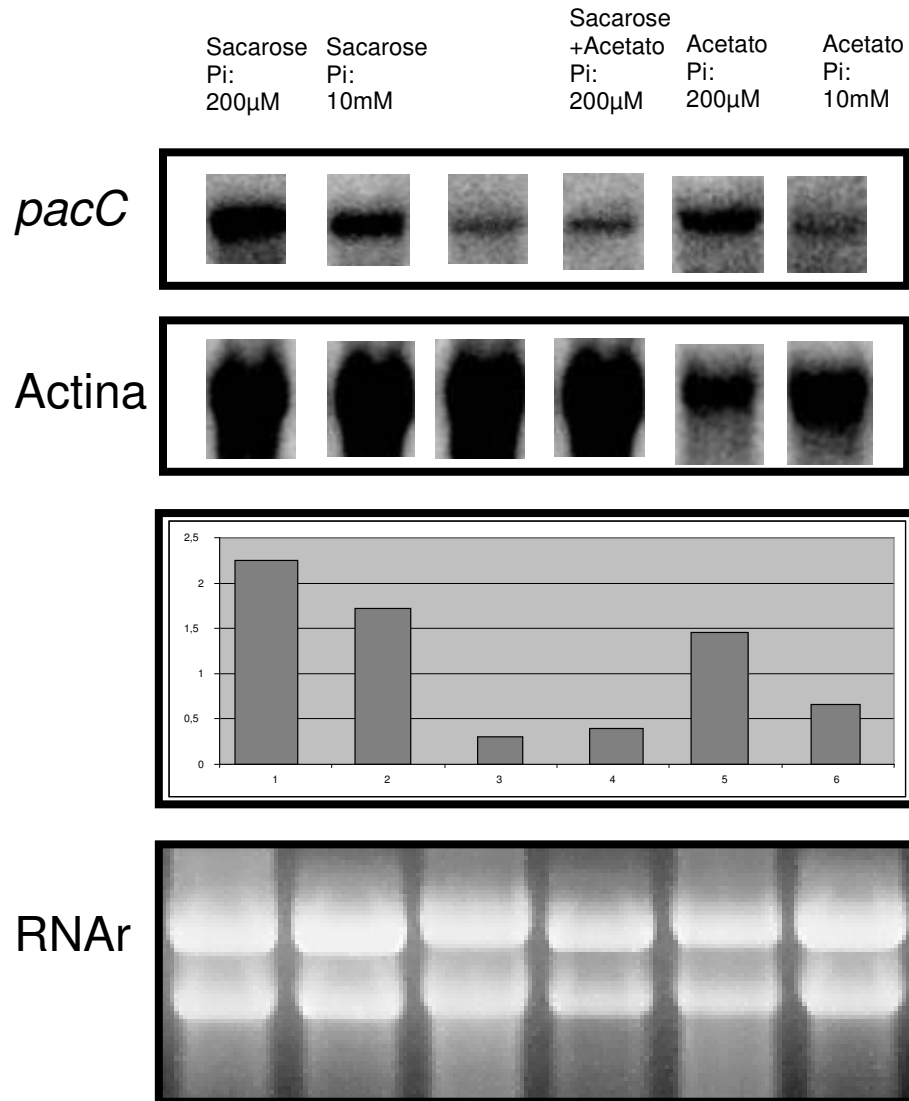


Figura 24. Northern blot feito com o RNA extraído da linhagem selvagem (74A) de *Neurospora crassa*, após seu cultivo em pH 5, suplementado com baixa (200µM) ou alta (10mM) concentração de fosfato, utilizando como fonte de carbono, apenas acetato de sódio ou sacarose; ou acetato de sódio + sacarose. Utilizou-se o gene *pacC* como sonda; e a actina como gene normalizador das concentrações de RNA extraído, e como base para a quantificação dos diferentes níveis de expressão do gene *pacC*, apresentados no gráfico. As subunidades 28S e 18S (aprox. 4.8 e 1.9 kb) do RNA ribossomal, estão apresentadas também.

Tabela 3. Determinação da atividade enzimática da fosfatase ácida secretada pela linhagem 74A de *N. crassa* nos diferentes meios de cultivo.

Meio de cultivo	Rendimento Micelial Seco (mg)	Unidades Totais¹/min	Unidades Totais¹/hora	Atividade micelial específica²
Acetato; Pi alto	~ 0,3	0,4	24,6	80
Acetato; Pi alto	~ 1	0,4	22,2	24
Sacarose e Acetato; Pi alto	50	0,2	11,1	0,24
Sacarose e Acetato; Pi baixo	~ 9	0,3	17,6	2
Sacarose; Pi alto	375	0,2	13,5	0,03
Sacarose; Pi baixo	154	1,9	112,2	0,74

1 - A unidade total é a unidade enzimática/ml de meio x volume do meio dosado, por minuto ou por hora.

2- A atividade micelial específica é a quantidade de unidades totais/mg de micélio seco. Os meios de cultivo tiveram sua fonte de carbono e disponibilidade de fosfato inorgânico variados. O pH utilizado foi 5.

Pode-se observar que as fontes de carbono utilizadas, bem como a disponibilidade de fosfato, influenciaram na expressão do gene *pacC* e na atividade enzimática da fosfatase ácida em *N. crassa*.

A primeira leitura que o fungo faz para ativar ou não as fosfatases, no meio em que é cultivado, é a disponibilidade de fosfato que lhe é oferecido. Sob altas concentrações de Pi, independente do pH ambiente, o fungo não tem suas fosfatases ativadas (Nosawa *et al*, 2002). Sob baixas concentrações de Pi, a *N. crassa* secreta as fosfatases alcalina e ácida sendo, porém, a última de maior atividade enzimática em pH ácido.

Na tabela 3, quando se compara Unidades Totais de enzima, bem como atividade enzimática específica micelial, das condições de baixa

concentração de fosfato com alta concentração de fosfato, verifica-se que a fosfatase ácida é sempre mais ativa em baixa concentração de fosfato. Assim, em pH ácido e baixo Pi, o fator que interferiu na quantidade de unidades totais enzimáticas, secretadas no meio de cultivo, por minuto, foi a fonte de carbono utilizada. Nessas condições, a maior atividade da enzima foi observada quando o fungo foi cultivado em sacarose como única fonte de carbono. Essa atividade foi diminuída quando apenas o acetato foi utilizado. Houve ainda, uma diminuição mais intensa da atividade da fosfatase ácida, quando o meio de cultivo utilizado foi suplementado com acetato de sódio e sacarose.

A análise dos valores para a atividade específica micelial em baixa concentração de fosfato, mostrou que o valor encontrado para o meio de cultivo contendo apenas acetato é o maior, seguido do meio de cultivo contendo sacarose+acetato e apenas sacarose. Esse resultado é explicado porque o rendimento micelial seco após o cultivo da *N. crassa* em acetato de sódio como única fonte de carbono é muito baixo (apenas 0,3 mg), quando comparado ao rendimento micelial após o cultivo em sacarose (154 mg). Isso resulta numa proporção de Unidades totais/ mg de micélio muito grande a favor do acetato de sódio.

Em relação ao gene *pacC*, os seus níveis de expressão, em pH ácido, foram maiores quando o fungo foi cultivado em sacarose como única fonte de carbono, em baixas concentrações de fosfato. Aumentando o fosfato no meio, mantendo a mesma fonte de carbono (sacarose 44mM), a expressão do gene *pacC* diminuiu.

Quando acetato de sódio e sacarose foram adicionados nesses dois meios de cultivo houve uma diminuição da expressão do gene *pacC*, tanto em alta concentração de fosfato como em baixo fosfato. Essa diminuição foi menos intensa no meio de cultivo suplementado com alta concentração de fosfato. Esse resultado já era esperado, pois o fosfato inibe a expressão do gene *pacC* (Nahas *et al.* 1982).

Nos cultivos feitos com acetato de sódio como única fonte de carbono, a expressão do gene *pacC* foi maior sob baixa concentração de fosfato. Além disso, os níveis de expressão do gene foram inferiores aos níveis encontrados após o cultivo do fungo em sacarose, e superiores aos níveis encontrados após o cultivo em acetato de sódio e sacarose.

Por esses resultados, pode-se inferir que tanto a atividade da fosfatase ácida, como a expressão do gene *pacC* são inibidas na presença do acetato de sódio, em pH ácido.

Era esperado que, na presença de apenas acetato de sódio como fonte de carbono, os níveis de expressão do *pacC* e a atividade enzimática da fosfatase ácida, fossem inferiores aos valores resultantes após o cultivo do fungo em sacarose e acetato. Porém, isso não ocorreu porque como foi observado, o rendimento micelial do meio de cultivo contendo apenas acetato de sódio como fonte de carbono é muito baixo (0,3mg), nos levando a crer que a expressão gênica e a atividade enzimática são conidiais, e não miceliais como nas outras duas condições em que, na presença da sacarose, tem-se a expressão gênica e a secreção da fosfatase ácida a partir do micélio do fungo.

5. Regulação da Expressão de HSPs em *N. crassa*

Os *Northern*s realizados para o estudo das HSPs em *N. crassa*, mostraram a variação da expressão de 3 genes que codificam para HSP70 nas linhagens selvagem (74A) e *pacC*^{KO} (figuras 25 e 26). Os *Northern*s foram feitos a partir do crescimento do fungo sob condições fisiológicas e após o choque térmico.

Observando a figura 25, nota-se uma maior abundância de transcritos do gene NCU 09602 em alta concentração de fosfato e pH 5. Após uma hora de choque térmico, a expressão gênica aumentou sob baixas e altas concentrações de fosfato, em condições de pH ácido ou alcalino. Após duas horas de choque térmico, houve uma diminuição na expressão gênica. Similarmente ao NCU 09602, o gene NCU 08693 apresentou mais transcritos em alta concentração de Pi e pH 5. A transcrição do gene NCU 08693 aumentou após uma hora de choque térmico. Igualmente ao gene NCU 09602, a expressão gênica do gene NCU 08693 diminuiu em todas as condições analisadas, após duas horas de choque térmico. Adicionalmente, a expressão de transcritos do gene NCU 01499 apresentou-se menos em condições de baixas concentrações de fosfato. Além disso, foi verificado que sob alta concentração de fosfato, a expressão da HSP foi maior em pH 7,8 do que em

5. Assim, pela figura 25, a disponibilidade de Pi regulou negativamente a expressão dos genes NCU09602 e NCU08693 antes do stress térmico, demonstrando que o meio de cultivo mais “rico” e, portanto, menos estressante para a sobrevivência do fungo, diminui a expressão de HSPs.

Na figura 26, a expressão dos genes NCU 09602 e NCU 08693 no mutante *pacC^{KO}* foi silenciada em todas as condições avaliadas. Em contraste, a expressão do gene NCU 01499 não apresentou diferença na linhagem selvagem ou mutante (*pacC^{KO}*). Porém, foi observado que a expressão dessa HSP foi significativamente maior em pH alcalino ou após duas horas de choque térmico.

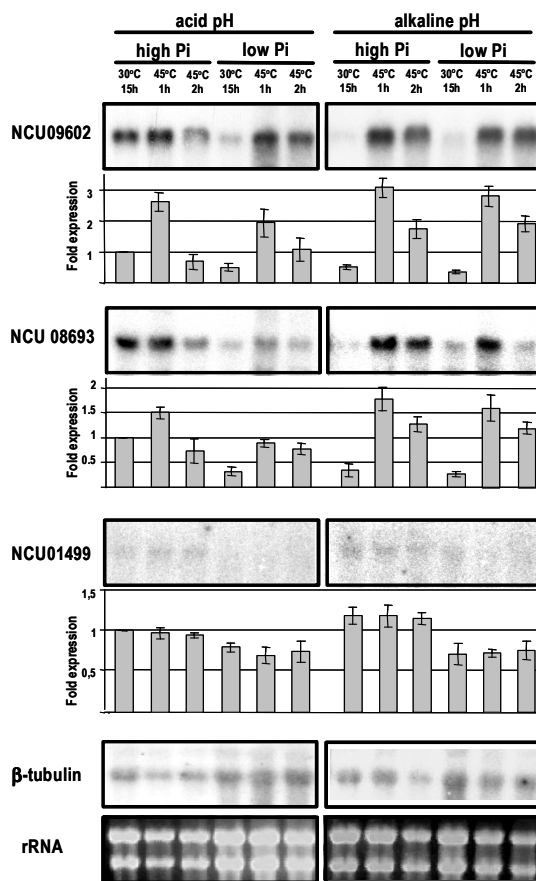


Figura 25. Análise da expressão gênica das HSPs 1, 2 e 3 na linhagem selvagem da *N. crassa*, em pH ácido e alcalino, sob baixo e alto fosfato. A β -tubulina foi utilizada como gene normalizador.

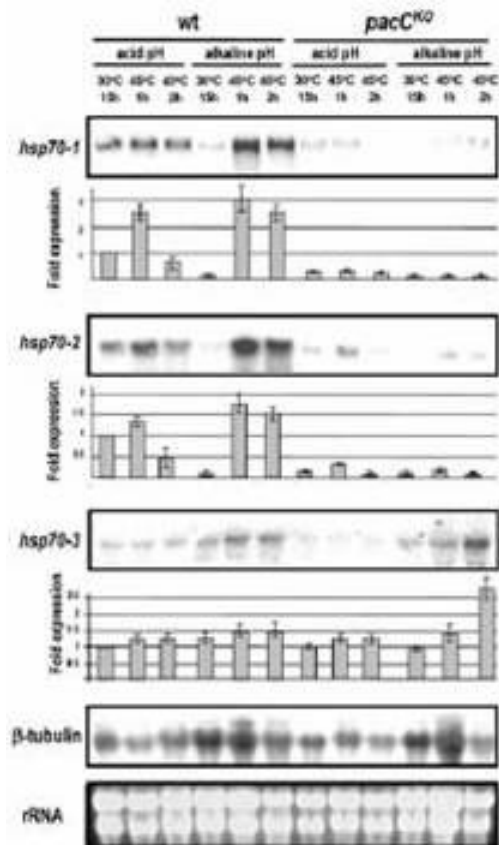


Figura 26. Análise da expressão gênica das HSPs 1, 2 e 3 na linhagem selvagem e *pacC^{KO}* da *N. crassa*, em pH ácido e alcalino, sob baixo fosfato. A β -tubulina foi utilizada como gene normalizador.

A diminuição da expressão das HSPs 1 e 2 na linhagem *pacC*^{KO} em ambos os pHs, mostrou que essas proteínas de choque térmico são reguladas pelo gene *pacC*, em pH alcalino e ácido, comprovando mais uma vez a funcionalidade do fator de transcrição PACC em pH ácido.

O estudo de meios de cultivo que regulam a expressão de HSPs em fungos é importante não só para provar mais uma vez a influência do meio de cultivo na regulação da expressão gênica; mas também porque as HSPs são proteínas existentes em organismos desde procariotos até eucariotos superiores (Mayer *et al*, 2005). Assim, com essas informações, pode-se entender melhor os mecanismos de regulação da expressão de chaperonas, bem como as situações que aumentam sua expressão, desde as bactérias, até, possivelmente, seres humanos.

CONCLUSÕES

V. CONCLUSÕES

Os perfis cromatográficos dos extratos protéicos obtidos das linhagens de *A. nidulans* e *N. crassa* mostraram-se dependentes da composição do meio de cultivo. Também foi observado que as linhagens de *A. nidulans* e *N. crassa*, portadoras respectivamente das mutações *palB7* e *pacC^{ko}*, tiveram seus perfis cromatográficos alterados quando comparados às linhagens controle.

Os géis de EMSA mostraram que nos cultivos em meio mínimo, com baixas concentrações de fosfato, o fator de transcrição PacC estava presente tanto no extrato protéico bruto, como nas frações protéicas correspondentes às massas moleculares de 72, 53 e 27 kDa, confirmando o processamento do PacC de *A. nidulans* em pH ácido. Além disso, foi mostrado nos ensaios de *Northern blot* que a transcrição do gene *pacC* é dependente da fonte de carbono utilizada e dos níveis de fosfato no meio.

Também foi observado que a transcrição de algumas HSPs é regulada em função da composição do meio de cultivo utilizado. Além disso, ficou demonstrado que o gene *pacC* regula a expressão de HSPs tanto em pH alcalino como em pH ácido.

O modelo proposto inicialmente para a sinalização pelo pH defende esse processamento apenas em pH alcalino. Tal premissa não está incorreta já que, nas condições de cultivo em que o modelo foi proposto, o PacC não é processado proteoliticamente. Porém, pode-se adicionar a esse modelo que, o PacC não é processado em pH ácido, se o meio de cultivo for rico, e as concentrações de fosfato, altas. Por outro lado, se essas condições são variadas, o fungo sensoria a necessidade de processar esse fator e ativar outros genes para seu melhor crescimento. Considerando os nossos resultados e os da literatura, verifica-se que a ativação fisiológica de PacC é um processo no qual as condições experimentais são essenciais para gerar uma determinada resposta.

Dessa forma, contribuições feitas no avanço do entendimento da funcionalidade do fator de transcrição PacC em pH ácido, bem como a influência dos nutrientes na secreção da fosfatase ácida, nos indicam que os mecanismos moleculares envolvidos na expressão gênica da adaptabilidade ao

pH ambiente em fungos é, sem sobra de dúvidas, uma questão ainda não totalmente resolvida. Assim, as condições experimentais utilizadas, contextualizadas com os eventos moleculares envolvidos na regulação do pH em *A. nidulans*, nos ajudam no entendimento dos eventos moleculares em resposta ao pH ambiente.

REFERÊNCIAS

VI. REFERÊNCIAS

Arst, HN Jr; Bignell, E; Tilburn, J (1994). Two new genes involved in signalling ambient pH in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Genetics and Genomics**. 245: 787-790.

Arst, HN Jr; Peñalva MA (2003). pH regulation in *Aspergillus* and parallels with higher eukaryotic regulatory systems. **Trends in Genetics**. 19 (4): 224-231.

Bevilacqua, A; Ceriani, M. C.; Capaccioli, S.; Nicolin, A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. **Journal of Cellular Physiology**. 195 (3):356-72.

Borkovich, KA; Alex, LA; Yarden, O et al. (2004) Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiology and Molecular Biology**. Rev., 68: 1-108.

Boer, P; STEYN, P. (1966) Isolation and purification of an acid phosphatase from bakers yeast. **Biochimica et Biophysica Acta**. 128: 400-402.

Caddick, MX; Brownlee, AG; Arst, HN Jr (1986). Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. **Molecular Genetics and Genomics**. 203: 346-353.

Cernila, B; Cresnar, B; and Breskvar, K (2003). Molecular characterization of genes encoding cytosolic Hsp70 in the zygomycete fungus *Rhizopus nigricans*. **Cell Stress Chaperones**. 8:317-28.

Cove, DJ (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochimica et Biophysica Acta**. 113 (1):51-56.

Crocken, B; Nick, JF (1963) Utilization of L-a-glycerophosphorylcholine by a lecithin-deficient strain of *Neurospora crassa*. **Canadian Journal of Microbiology**. 9: 689-696.

Denison, SH (2000). pH regulation of gene expression in fungi. **Fungal Genetics Biology**. 29: 61-71.

Dibenedetto, G; Cozzani, I (1975). Nonspecific acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. Purification and physical chemical properties. **Biochemistry**. 14(13): 2847-2852.

Díez, E; Álvaro, J; Espeso, EA; Rainbow, L; Suárez, T; Tilburn J; Arst, HNJ and Peñalva, MA (2002). Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. **The EMBO Journal**. 21: 1350–1359

Dorn, G (1965a) Genetic analysis of the phosphatases in *Aspergillus nidulans*. **Genetics Research**. 10:13-26.

Dorn, G (1965b) Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. **Science** 150:1183-1184.

Espeso, EA; Tilburn, J; Arst, HN Jr; Peñalva, MA (1993). pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene. **EMBO Journal**. 12: 3947-3956.

Espeso, EA; Roncal, T; Díez, E; Rainbow, L; Bignell, E; Álvaro, J; Suárez, T; Denison, SH; Tilburn, J; Arst, NH Jr; Peñalva, MA (2000). On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. **EMBO Journal**. 19(4): 719–728.

Fenton, WA; Horwich, AL (2003) Chaperonin-mediated protein folding: fate of substrate polypeptide. **Quarterly Reviews of Biophysics**. 36(2): 229-256, 2003.

Freitas, JS.; Silva, EM; Rossi, A. (2007) Identification of nutrient-dependent changes in extracellular pH and acid phosphatase secretion in *Aspergillus nidulans*. **Genetic Molecular Research**. 6: 721-9.

Fried, M e Crothers, D. M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. **Nucleic Acids Research.** 23: 6505-6525.

Froehlich, AC; Noh, B; Vierstra, RD; Loros, J; Dunlap, JC (2005). Genetic and molecular analysis of Phytochromes from the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Eukaryot Cell.** vol. 4(12):2140-52

Galagan, JE.; Calvo, SE; Borkovich, KA; Selker, EU; Read, ND; Jaffe, D; FitzHugh, W; Ma, LJ; Smirnov, S; Purcell, S; et al. (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature.** 422: 859-868.

Gander, JE and Janovec, S (1984). Regulation of metabolism in *Penicillium charlesii* by inorganic acids: role of L-tartaric acid. **Current Top Cell Regulation.** 24: 99-109.

Garner, MM; Revzin, A (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. **Nucleic Acids Research.** 13: 3047-3060.

Georg, RC.; Gomes, SL (2006). Comparative expression analysis of members of the Hsp70 family in the chytridiomycete *Blastocladiella emersonii*. **Gene.** 386: 24-34.

Gething, MJ (1997). Protein folding. The difference with prokaryotes. **Nature.** 388: 329-331.

Gething, MJ; Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. **Nature.** 355: 33-45.

Häfker, T; Techel, D; Muschner, S; Reimann, M; Li, Y; Monnerjahn, C; Rensing, L (1998). Molecular analysis of a glucose-regulated gene (*grp78*) of *Neurospora crassa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*: 1397: 21-26

Han, SW; Michelin, MA; Barbosa, JE; Rossi, A. (1994) Purification and constitutive excretion of acid phosphatase in *Neurospora crassa*. *Phytochemistry*, 35: 1131-1135.

Hartl, FU; Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular Chaperones in the Cytosol: from Nascent Chain to Folded Protein. *Science*. Vol. 295. no. 5561, pp. 1852 - 1858

Heinonen, JK; Reijo J. Lahti, RJ (2004). A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase. *Analytical Biochemistry*. 113: 2: 313-317.

Herranz, S; Rodriguez, JM; Bussink, HJ; Sanchez-Ferrero, JC; Arst, HN Jr; Penalva, MA; and Vincent, O. (2005). Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proceedings of National Academy of Sciences*. USA. 102, 12141–12146.

Itzhaki, RF; Gill, DM (1964). A microbiuret method for estimating proteins. *Analytical Biochemistry*. 9; 401-410.

Kaldi, K; Gonzalez, BH; Brunner, M (2005). Transcriptional regulation of the *Neurospora* circadian clock gene *wc-1* affects the phase of circadian output", *EMBO Reports*.

Kapoor, S; Wakasugui, T; Deno, H; Suguira, M. (1994). An *atpE* specific promoter within the coding region of *atpB* gene in tobacco chloroplast DNA. *Current Genetics*. 26: 263-268.

Khandjian, EW (1990). Acidic extracellular environment induces only a subset of heat-shock proteins in primary mouse kidney cell cultures. **Biochemistry and Cell Biology**, 68: 804-7.

Kohler, S; Foulongne, V; Ouahrani-Bettache, S; Bourg, G; Teyssier, J; Ramuz, M; Liautard, JP (2002). The analysis of the intramacrophagic virulome of *Brucella suis* deciphers the environment encountered by the pathogen inside the macrophage host cell. **Proceedings of National Academy of Sciences. U S A**, 99: 15711-6.

Kobayashi, H; Suzuki, T; Kinoshita, N; Unemoto, T (1984). Amplification of the *Streptococcus faecalis* proton-translocating ATPase by a decrease in cytoplasmic pH. **Journal of Bacteriology**. 158:1157-1160.

Kumamoto, CA (2008). Molecular mechanisms of mechanosensing and their roles in fungal contact sensing. **Nature Reviews Microbiology** 6, 667-673

Laemmli, UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685.

Lahiri, DK; Ge, YW (2000). Electrophoretic mobility shift assay for the detection of specific DNA-protein complex in nuclear extracts from the cultured cells and frozen autopsy human brain tissue. **Brain Research protocols** 5, 256-265.

Lamb, T M.; Xu, W.; Diamond, A.; Mitchell, A. P. (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. **Journal of Biological Chemistry**. 276: 1850-1856.

Li, M; Martin, SJ; Bruno, VM; Mitchell, AP; Davis, DA (2004). *Candida albicans* Rim13p, a protease required for Rim101p processing at acidic and alkaline pHs. **Eukaryotic Cell**. Jun;3(3):741-51.

Maccheroni, Jr W; May, GS; Martinez-Rossi, NM; Rossi, A (1997). The sequence of palF, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. **Gene** 194:163-167

Mager, WH; De Kruijff, AJ (1995). Stress-induced transcriptional activation. **Microbiology Reviews**. 59: 506-31.

Martinelli, SD (1994). *Aspergillus nidulans* as an experimental organism. In *Aspergillus: 50 years on*. Edited by Martinelli SD & Kinghorn JR. Amsterdam: **Elsevier Science BV**. 33-58.

Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. **Cellular Molecular Life Science**. 62, 670–684.

McLaughlin, SH; Smith, HW; Jacksom, SE (2002). Stimulation of the Weak ATPase Activity of Human Hsp90 by a Client Protein. **Journal of Molecular Biology**. 315, 787-798.

Metzenberg, RL; Chia, W (1979). Genetic control of phosphorus assimilation in *Neurospora crassa*: dose-dependent dominance and recessiveness in constitutive mutants. **Genetics**. 93: 625-43.

Mingot, JM; Tilburn, J; Diez, E; et al. (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. **Molecular and Cellular Biology**. 19(2): 1390-1400.

Mouillon, JM.; Persson, BL (2005). Inhibition of the protein kinase A alters the degradation of the high-affinity phosphate transporter Pho84 in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**. 48: 226-34.

Nahas, E; Terenzi, HF; Rossi, A (1982). Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2) and alkaline

phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. **Journal of General Microbiology**. 128: 2017-2021.

Nishimura, RN; Dwyer, BE; Cole, R; de Vellis, J; Picard, K (1989). Induction of the major inducible 68-kDa heat-shock protein after rapid changes of extracellular pH in cultured rat astrocytes. **Experimental Cell Research**. 180: 276-80.

Nozawa, SR; Thedei Jr, G; Crott, LSP; Barbosa, JE; Rossi, A (2002). The synthesis of Pi-repressible alkaline phosphatase do not appear to be regulated by ambient pH in filamentous mould *Neurospora crassa*. **Brazilian Journal of Microbiology**. 33: 92-95.

Nozawa, SR; Ferreira-Nozawa, MS; Martinez-Rossi, NM; Rossi, A (2003a). The pH-induced glycosylation of secreted phosphatases is mediated in *Aspergillus nidulans* by the regulatory gene pacC-dependent pathway. **Fungal Genetics and Biology**. 39: 286-295.

Nozawa, SR; May, GS; Martinez-Rossi, NM; Ferreira-Nozawa, MS; Coutinho-Netto, J; Maccheroni, WJr; Rossi, A (2003b). Mutation in a calpain-like protease affects the posttranslational mannosylation of phosphatases in *Aspergillus nidulans*. **Fungal Genetics and Biology**. 38: 220-7.

Odss, FC; Hierholzer, JC (1973). Purification and properties of a glycoprotein acid phosphatase from *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**. 114(1):257-266.

Orejas, M; Espeso, EA; Tilburn, J; Sarkar, S; Arst, HN Jr; Peñalva, MA (1995). Activation of the *Aspergillus* PacC transcription factor in response to alkaline ambient pH requires proteolysis of the carboxy-terminal moiety. **Gene Dev**, 9: 1622-1632.

Palma, MS; Han, SW; Rossi, A. (1989) Dissociation and catalytic activity of phosphate-repressible alkaline phosphatase from *Neurospora crassa*. **Phytochemistry**, 28: 3281-3284.

Paytan, A.; McLaughlin, K. (2007) The oceanic phosphorus cycle. **Chemistry Review**. 107: 563-576.

Peleg Y, Aramayo R, Kang S, Hall JG, Metzenberg RL. NUC-2, a component of the phosphate-regulated signal transduction pathway in *Neurospora crassa*, is an ankyrin repeat protein. **Molecular Genetics and Genomics**. 1996 Oct 28;252(6):709-16.

Peñalva, M. A.; Arst, H. N. Jr. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. **Microbiology and Molecular Biology Review**. 66:426-46.

Peñalva, M. A.; Tilburn, J.; Bignell, E.; Arst, H. N. Jr. (2008) Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. **Trends of Microbiology**. 16: 291-300.

Peñas MM, Hervás-Aguilar A, Múnera-Huertas T, Reoyo E, Peñalva MA, Arst HN Jr, Tilburn J (2007). Further characterization of the signaling proteolysis step in the *Aspergillus nidulans* pH signal transduction pathway. **Eukaryot Cell** DOI:10.1128/EC.00047-07.

Pérez-esteban B; Orejas, M; Gómez-Pardo, E; Peñalva, MA (1993). Molecular characterization of a fungal secondary metabolism promoter: transcription of the *Aspergillus nidulans* isopenicillin N synthetase gene is modulated by upstream negative elements. **Molecular Microbiology**. 9: 881-895.

Rensing, L; Monnerjahn, C.; Meyer, U (1998). Differential stress gene expression during the development of *Neurospora crassa* and other fungi. **FEMS Microbiology Letters**. 168: 159-66.

Rossi, A; Menezes, LC; Pudles, J (1975). Yeast Hexokinase A. Succinylation and properties of the Active subunit. **European Journal of Biochemistry**. 59: 423-432.

Ruscher, K; Reuter, M; Kupper, D; Trendelenburg, G; Dirnagl, U; Meisel, A (2000). A fluorescence based non-radioactive electrophoretic mobility shift assay. **Journal of Biotechnology**: 78: 2: 163-170.

Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual, 2nd edn, **Cold Spring Harbor Laboratory Press**. Cold Spring Harbor, (1989)

Silva, EM (2008) Regulação da expressão gênica pelo pH no fungo filamentososo *Aspergillus nidulans*: funcionalidade do gene *palA*. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina; Universidade de São Paulo, 99 f. **Tese de Doutorado em Bioquímica**.

Tanzer, MM; Arst, HN; Skalchunes, AR; Coffin, M; Darveaux, BA; Heiniger, RW; Shuster, JR (2003). Global nutritional profiling for mutant and chemical mode-of-action analysis in filamentous fungi. **Function of Integration**. Genomics, 3: 160-170.

Thedei Jr, G; Nozawa, SR; Simões, AL; Rossi, A (1998). Gene *pho-2* codes for the multiple active forms of the Pi-repressible alkaline phosphatase in the mold *Neurospora crassa*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 13: 609-611.

Tian, C; Kasuga, T; Sachs, MS; Glass, NL (2007). Transcriptional profiling of cross pathway control in *Neurospora crassa* and comparative analysis of the Gcn4 and CPC1 regulons. **Eukaryotic Cell**. 1018–1029.

Tilburn, J; Sarkar, S; Widdick, DA; Espeso, EA; Orejas, M; Mungroo, J; Peñalva, MA; Arst, HN Jr (1995). The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription

factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. **EMBO Journal**. 14: 779-90.

Trimble, RB; Maley, F; Watorek, W (1981). Subunit structure and carbohydrate composition of the extracellular acid phosphatase of *Rhodotorula glutinis*. **Journal of Biological Chemistry**. 256 (19):10037-10043.

Vetchinova, AS; Akopov, SB; Chernov, IP; Nikolaev, LG; Sverdlov, EG (2006) Two-dimensional electrophoretic mobility shift assay: Identification and mapping of transcription factor CTCF target sequences within FXVD5-COX7A1 region of human chromosome 19. **Analytical Biochemistry**. 354: 85-93.

Vogel, HJ (1956). A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bull**. t3: 42-43

Wu, D; Dou, X; Hashmi, SB; Osmani, SA (2004). The Pho80-like cyclin of *Aspergillus nidulans* regulates development independently of its role in phosphate acquisition. **Journal of Biological Chemistry**. 279: 37693-703.

<http://www.fgsc.net/Neurospora/sectionB2.htm>, último acesso: 2009.

<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan>, último acesso: 2007.

<http://www.ebi.ac.uk/emboss/align/index.html>, último acesso: 2007.

APÊNDICE

Apêndice I – Soluções e meios de cultivo

Meios de cultivo e soluções para *A. nidulans*

1. Solução de sais (Cove, 1966)

Nitrato de sódio	300 g
Cloreto de sódio	26,0 g
Sulfato de magnésio heptahidratado	26,0 g
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

Foi adicionado 1 mL de clorofórmio e a solução foi mantida em frasco a 4° C.

2. Solução de traços de elementos (Cove, 1966)

Borato de sódio decahidratado	400 mg
Sulfato de cobre pentahidratado	400 mg
Sulfato de ferro heptahidratado	532 mg
Sulfato de manganês monohidratado	292 mg
Molibdato de sódio bihidrtado	800 mg
Sulfato de zinco heptahidratado	8 mg
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

A solução foi mantida em frasco a 4° C.

3. Solução de vitaminas (Cove, 1966)

Biotina	1,0 mg
Ácido p-aminobenzóico	25 mg
Ácido fólico	25 mg
Piridoxina HCl	50 mg

Tiamina	50 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Pantotenato de cálcio	100 mg
Cloreto de colina	100 mg
Riboflavina	100 mg
Mesoinositol	200 mg
Água destilada (q.s.p)	1000 mL

A solução foi mantida em frasco escuro a 4° C.

4. Tween 80 (0,01%)

Tween 80	0,05 mL
Cloreto de sódio	4,5 g
Água destilada (q.s.p.)	500 mL

A solução foi autoclavada a 1,3 atm de pressão a 120°C por 20 min.

Meios de cultivo e soluções para *N. crassa*

1. Meio Sólido de Vogel

Vogel 50X	20ml
Sacarose	15g
Biotina	100µl
Elementos Traços	50µl
Ágar	15g
Água destilada (q.s.p.)	1000ml

Dissolver o ágar em parte da água num *erlenmeyer*, com a ajuda do microondas. Juntar os outros componentes e distribuir a solução em *erlenmeyers* menores, cada um com 30ml da mesma.

Autoclavar e deixar polimerizar inclinados.

Obs: Para o repique do mutante *pacC^{K0}*, foi adicionado o antibiótico hiyromicina na concentração de 450µg/ ml de meio Vogel.

1.1. Vogel 50X

Citrato de Sódio Pentahidratado	15g
KH ₂ PO ₄	25g
NH ₄ NO ₃	10g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,5g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

Adicionar 3 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano e estocar no refrigerador.

2. Fries 10X

Citrato de Sódio	5g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5g
NH ₄ NO ₃	1g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1g
KOH	0,4g
Água destilada (q.s.p.)	1000ml

Estocar no refrigerador.

3. Estoque de Biotina

Biotina	5mg
Etanol 50%	100ml

Estocar no refrigerador e renovar a cada 6 meses.

4. Solução Traços de Elementos

Ácido cítrico monohidratado	5g
ZnSO ₄ – 7H ₂ O	5g
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·6H ₂ O	1g
CuSO ₄ – 5H ₂ O	0,25g
MnSO ₄ – 1H ₂ O	0,05g
H ₃ BO ₃	0,05g
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,05g
Clorofórmio	1ml
Água destilada (q.s.p.)	qsp 100ml

Adicionar 3 mL de clorofórmio como agente antimicrobiano e estocar no refrigerador.

5. Meio *Fries* Líquido para *Neurospora crassa* (Crocken & Nick, 1963)

pH 5,0

Alto Pi com sacarose

Fonte de carbono: sacarose

Pi saturante (10mM)

<i>Fries</i> 10X	100ml
Sacarose	15g
Biotina	200µl
Elementos Traços	100µl
Fosfato de Potássio	1,36g
Citrato de Sódio	14,7g

Água destilada (q.s.p.) qsp 1000ml

Alto Pi com acetato de sódio

Pi saturante (10mM)

Fonte de carbono: acetato de sódio

<i>Fries</i> 10X	10ml
Acetato de Sódio	0,59g
Biotina	20µl
Elementos Traços	10µl
Fosfato de Potássio	0,15g
Citrato de Sódio	1,47g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

Alto Pi com sacarose e acetato de sódio

Pi saturante (10mM)

Fonte de carbono: acetato de sódio e sacarose

<i>Fries</i> 10X	10ml
Acetato de Sódio	0,59g
Sacarose	1,5g
Biotina	20µl
Elementos Traços	10µl
Fosfato de Potássio	0,15g
Citrato de Sódio	1,47g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

Baixo Pi com sacarose

Pi limitante (200µM)

Fonte de carbono: sacarose

<i>Fries</i> 10X	10ml
------------------	------

Sacarose	1,5g
Biotina	20µl
Elementos Traços	10µl
Fosfato de Potássio	0,0015g
Citrato de Sódio	1,47g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

Baixo Pi com acetato de sódio

Pi limitante (200µM)

Fonte de carbono: acetato de sódio

<i>Fries</i> 10X	10ml
Acetato de Sódio	0,59g
Biotina	20µl
Elementos Traços	10µl
Fosfato de Potássio	0,0015g
Citrato de Sódio	1,47g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

Baixo Pi com sacarose e acetato de sódio

Pi limitante (200µM)

Fonte de carbono: sacarose e acetato de sódio

<i>Fries</i> 10X	10ml
Acetato de Sódio	0,59g
Sacarose	1,5g
Biotina	20µl
Elementos Traços	10µl
Fosfato de Potássio	0,0015g
Citrato de Sódio	1,47g
Água destilada (q.s.p.)	100ml

O pH dos meios foi ajustado para 5 e os meios foram autoclavados a 1,3 atm de pressão a 120°C por 20 minutos.

Apêndice II

RNA: Eletroforese e Soluções

1. Gel para RNA (Sambrook *et al.*, 1989)

Para o preparo de gel para RNA, a agarose foi dissolvida em água tratada com DEPC 0,1% (v/v), e em seguida, fundida. Quando a temperatura atingiu aproximadamente 60°C, os seguintes reagentes foram adicionados:

Formaldeído	20 ml
Agarose 1,5% (m/v) fundida	70 ml
Tampão MOPS 5X	22 ml
Água tratada com DEPC (q.s.p.)	100 ml

1.1. Tampão de migração 5X

MOPS pH 7,0	0,1 M
Acetato de sódio	40 mM
EDTA pH 8,0	5 mM

Esse tampão foi preparado com água livre de RNase (tratada com DEPC) e mantido em frasco escuro a temperatura ambiente.

1.2. 10X “gel loading buffer”

0,25% azul de bromofenol
0,25% xilenocianol
1mM EDTA (pH 8,0)

50% glycerol
Brometo de etídeo (1 µg/µL)

1.3. Preparo das amostras

Em um *ependorf* de 1,5 mL, foram adicionados 10-15 µg de RNA, 2 µL de tampão de corrida 5X, 3,5 µL de formaldeído, 10 µL de formamida e 1X “gel loading buffer”. As amostras foram desnaturadas a 65°C por 15 min e resfriadas rapidamente em gelo. A seguir, foram aplicadas em gel e submetidas à eletroforese por 4V/cm em tampão de corrida 1X.

Apêndice III

DNA: Eletroforese e Soluções

Soluções para Extração do DNA genômico

1. Solução de Lise (pH 8)

Tris HCl 1M pH 8	0,5ml
EDTA 0,5M	1 ml
SDS 10% pH 7,2	3ml
2-mercaptoetanol	0,1ml
Água destilada (q.s.p.)	10ml

2. Sevage

Clorofórmio	9ml
Álcool Isoamílico	375µl

3. Fenol – Clorofórmio (a solução deve estar gelada)

Fenol	5ml
Clorofórmio	4,8ml
Hidroxiquilona	0,1%

4. Acetato de sódio 3M pH 8

Acetato de Sódio	2,46 g
Água destilada (q.s.p.)	10ml

5. Gel para DNA

Para a visualização da qualidade e integridade de amostras de DNA, géis de agarose 1% (m/v) foram preparados em tampão Tris-Acetato com EDTA (TAE; 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). As amostras foram aplicadas em gel e submetidas à eletroforese por 4V/cm em tampão de corrida TAE 1X.

5.1. Tampão TAE 50x

Tris base	242 g
Ácido acético	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml
Água destilada (q.s.p.)	1000 ml

5.2. Gel “loading buffer” para DNA

0,25% azul de bromofenol
0,25% xilenocianol
40% sacarose em água

Brometo de etídeo (1 µg/µL)

O loading deve ser armazenado a 4º C.

Apêndice IV

Proteínas: extração e eletroforese

1. Tampão de Lise

100mM Hepes – KOH pH 7,5	5ml
KCl 1M	1ml
MgCl ₂	1ml
EDTA 50mM pH 8	40µl
DTT 1M	10µl
Glicerol	2ml
PMSF 100mM	200µl
Pepstatina 1mg/ml	4µl
Leupeptina 21mM	0,6µl
Água destilada (q.s.p.)	20ml

2. Tampão de Diálise (500 ml)

100mM Hepes – KOH pH 7,5	100ml
MgSO ₄	1,23g
EDTA 50mM pH 8	10ml
DTT 1M	250µl
Glicerol	50ml
Água destilada (q.s.p.)	500ml

3. Eletroforese de proteínas em SDS

O gel de poliacrilamida 12,5% consiste em: acrilamida/bisacrilamida, Tris-HCl 0,5 M pH 8,8; Tris-HCl 2 M pH 6,8; SDS 0,1%, Temed 2%, persulfato de amônio 1% e água (q.s.p).

Como tampão de corrida, foi utilizado 25 mM Tris HCl , 192 mM glicina, 3,5 mM SDS, ajustados para pH 8,3.

4. Coloração do Gel

Corante coomassie blue (1L)

Coomassie blue	2,5g
Metanol	450ml
Ácido acético glacial	100ml
Água Milli-Q	450ml

Descorante (1L)

Metanol	450ml
Ácido acético glacial	100ml
Água Milli-Q	450ml

Apêndice V

EMSA: Eletroforese e Soluções

1. Tampão de Ligação (500 ml)

100mM Hepes – KOH pH 7,5	100ml
MgSO ₄	1,23g

EDTA 50mM pH 8	10ml
DTT 1M	250µl
Glicerol	50ml
Água destilada (q.s.p)	500ml

2. Gel de poliacrilamida 10% (Sambrook, 1989)

Acrilamida/Bisacrilamida 30%	3,2ml
Tampão TBE 5X	2ml
Temed	6µl
Persulfato de amônio	100mg
Água destilada (q.s.p.)	10ml

3. Tampão TBE 5x

Tris base	54 g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20 ml
Água destilada (q.s.p.)	1000 ml

A polimerização dos géis foi feita em cuba apropriada entre placas de vidro (10x10 cm) separadas por espaçadores de 1 mm. A corrida foi efetuada em tampão Tris-Borato com EDTA 1X, com aplicação de corrente elétrica contínua de 20 mA/placa por 5-6 h.

Apêndice VI – PCR

Primers

Nome	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')
<i>Actina Foward</i>	ACACCTTCTCCACCACCG
<i>Actina Reverse</i>	CGTTGCCGATGGTGATGAC
<i>PacC Foward</i>	CTGAGTGCAATGAGCGTTT
<i>PacC Reverse</i>	CATAGAAACCGGAGGGAG
<i>HSP NCU01499 Foward</i>	TTTAATCTGCCATACTCCCG
<i>HSP NCU01499 Reverse</i>	TTCTTGACGTGCTCCTCAAA
<i>HSP NCU09602 Foward</i>	TGGCTCCAACGACAACGA
<i>HSP NCU09602 Reverse</i>	CATGAATGAATTGTCTTCATC
<i>HSP NCU08363 Foward</i>	AGCTTGAACCTCTTCGACAA
<i>HSP NCU08363 Reverse</i>	AGATTTTTTATTGTAAACCC

Fragmento de 360 pb, retirado do gene *pacC* de *N. crassa*, utilizado como sonda para realização dos *Northern*s:

CTGAGTGCAATGAGCGTTTCACTAGCGCCGAGGTGCTTTACGAACACATTT
GCGAGAAGCACGTTGGTTCGCAAGAGCACCAACAACCTTAACCTCACATGC
CAGTGGAACTCGTGCCGCACCACCACGGTGAAGCGCGATCACATTA
GCTGATGTCCGTGTTTACGTTCCCCTGAAGCCGCACAAGTGCGATTTCTGCG
GCAAGTGCTTCAAGCGCCCTCAGGATCTCAAGAAGCATGTCAAGACTCAT
GCCGACGACTCGGTTCTGGTGGGTGCTCTCCTCAGGACCAAACGGTG
GCATGAATGGCGCTTACAGAGCTCAGGCTCCAGTTCACAAGGCTCCCTCC
GGTTTCTATG.

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[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](#)