UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**ISOLAMENTO E ANÁLISE FUNCIONAL DO GENE QUE CODIFICA
UMA PROTEÍNA SERINA-TREONINA QUINASE QUE MODULA A
EXPRESSÃO DE GENES REGULADOS POR CARBOIDRATOS EM
*TRICHODERMA REESEI***

Euclides Matheucci Júnior
Orientador: Hamza El-Dorry

Tese de Doutorado

São Paulo
Novembro/2000

Ao meu filho Rodrigo Faria
Matheucci.

Agradecimentos

Ao Professor Hamza F. A. El-Dorry, pela orientação, amizade, e aos exemplos de conduta e arrojo científicos.

À minha família Ana Maria e Rodrigo pela compreensão e apoio, e aos meus pais e meu irmão pelo incentivo.

Ao amigo, Professor Flávio Henrique da Silva pelo incentivo, apoio, e pelas boas idéias, muitas das quais incorporadas a este trabalho.

Ao Felipe Chambergo Alcalde e ao Augusto Sávio Peixoto Ramos pela importante colaboração, companheirismo e amizade.

Ao companheiro de laboratório José Ribamar Ferreira Júnior pela inestimável colaboração e pelas conversas descontraídas e produtivas.

Aos queridos colegas Eric Bonaccorssi, Ari José Scattone Ferreira, Daniela Steconi, Sílvia Regina Blanco.

Aos colegas e amigos com os quais compartilhei do laboratório, Dra. Sawsan El-Gogary, Dr. Jorge Alexis Escobar-Vera, Dra. Direce Maria Carraro, Dr. José Carlos Carle Urioste, Dr. Gonçalo Guimarães Pereira, Dr. José Abrahão Neto, Dra. Natalie Cella e Emi Torigoi, pela convivência que trouxe muitas experiências produtivas.

Aos amigos e colegas da Faculdade de Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Santa Casa de São Paulo, especialmente aqueles do Departamento de Ciências Fisiológicas.

Aos amigos e colegas do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos, pelo apoio e incentivo.

À Zilda pela amizade e organização que fez muita diferença na elaboração desta tese.

Ao Wilton José da Rocha Lima, pelo companheirismo.

Aos Professores deste departamento que sempre colaboraram comigo, especialmente ao Professor Roberto Vicente Santelli, Professor Pio Colepicolo, Professor Bayardo B. Torres e Professora Mary Sogayar.

Aos colegas estudantes dos laboratórios vizinhos pelo companheirismo, e colaboração.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, especialmente à Cibele, pela atenção e competência dispensadas.

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Bioquímica, pela atenção e amizade.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	4
PROTEÍNAS SERINA-TREONINA QUINASE: ATIVADA POR AMP (AMPK) E RELACIONADAS A SNF1	6
PROTEÍNA QUINASE ATIVADA POR AMP EM MAMÍFEROS	8
O COMPLEXO SNF1	10
REPRESSÃO POR GLICOSE	12
MECANISMOS DE REPRESSÃO POR GLICOSE	15
O FUNGO FILAMENTOSO <i>T. REESEI</i> : MODELO PARA O ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA REGULADA POR GLICOSE	19
OBJETIVOS	22
MATERIAIS E MÉTODOS	23
REAGENTES	23
MICROORGANISMOS UTILIZADOS E SUA MANIPULAÇÃO	24
MANIPULAÇÃO DE DNA E TÉCNICAS EM GERAL	24
TRANSFORMAÇÃO DOS MICROORGANISMOS	25
ISOLAMENTO DE TRANSFORMANTES ESTÁVEIS DE <i>TRICHODERMA REESEI</i>	27
OLIGONUCLEOTÍDEOS UTILIZADOS	27
BIBLIOTECA GENÔMICA	28
IDENTIFICAÇÃO DO CLONE GENÔMICO DE <i>TrSNF1</i>	29
BIBLIOTECA DE cDNA	30
IDENTIFICAÇÃO DO CLONE DE cDNA CONTENDO <i>TrSNF1</i>	31
DETERMINAÇÃO DO INÍCIO DA TRANSCRIÇÃO DE <i>SNF1</i>	31
CONSTRUÇÃO DOS PLASMÍDEOS PARA COMPLEMENTAÇÃO DE LEVEDURA Δ <i>SNF1</i> (MCY1551)	33
CONSTRUÇÃO DE pTrSNF1	33
CONSTRUÇÃO DE pYSNF	35
CONSTRUÇÃO DE ANTISENSE PARA SNF1	36
PCR DE COLÔNIAS DE BACTÉRIAS	37
ANÁLISE DE GENES REGULADOS POR GLICOSE UTILIZANDO “MACROARRAY”	38
OBTENÇÃO DE cDNA TOTAL DE <i>T. REESEI</i> CRESCIDO EM DIFERENTES FONTES DE CARBONO E MARCAÇÃO DO COM α -P ³² dCTP	39
HIBRIDAÇÃO DOS MACROARRAYS	41
RESULTADOS	42

AMPLIFICAÇÃO DE SEQUÊNCIA DE DNA RELACIONADA A <i>SNF1</i> DE <i>TRICHODERMA REESEI</i>	42
ISOLAMENTO DO CLONE GENÔMICO	48
ISOLAMENTO DO CLONE DE cDNA	51
ORGANIZAÇÃO DO GENE	51
INTRONS	53
SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DE <i>TrSNF1</i>	57
SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDA DE <i>TrSNF1</i>	61
IDENTIFICAÇÃO DO INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO	63
NÚMERO DE CÓPIAS DE <i>TrSNF1</i>	63
ANÁLISE FUNCIONAL DE <i>TrSNF1</i>	63
COMPLEMENTAÇÃO DE <i>S. CEREVISIAE ΔSNF1</i>	66
USO DO <i>TrSNF1</i> -ANTISENSE PARA EXPLORAR A FUNÇÃO DE <i>TrSNF1</i> <i>IN VIVO</i>	66
 DISCUSSÃO	 80
ISOLAMENTO E ORGANIZAÇÃO DO GENE RELACIONADO A <i>SNF1</i>	81
SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS E DE AMINOÁCIDOS DEDUZIDA DE <i>TrSNF1</i>	82
IDENTIFICAÇÃO DO INÍCIO DE TRANSCRIÇÃO	84
ANÁLISE FUNCIONAL DE <i>TrSNF1</i> EM <i>S. CEREVISIAE</i>	84
EFEITO DA EXPRESSÃO DO ANTISENSE DE <i>TrSNF1</i>	85
 BIBLIOGRAFIA	 89
 CURRICULUM VITAE	 104

Abreviaturas

ADR1	gene que codifica o ativador da transcrição do gene álcool desidrogenase 2 em <i>S. cerevisiae</i>
pfu	Unidade formadora de placa de lise
AMP	Monofosfato de Adenosina
AP1	gene que codifica ativador de transcrição ("activator protein")
ATP	Trifosfato de adenosina
pBS SK-	Plasmídio Bluescript™ fornecido pela Stratagene
CBH1	gene celulolítico que codifica celobiohidrolase 1 em <i>T. reesei</i>
CRE1	gene que codifica um repressor de transcrição em <i>T. reesei</i>
CTD	domínio carboxi terminal
dNTP	desoxiribonucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etileno diamino tetraacético
GCN4	gene que codifica para ativador da transcrição em <i>S. cerevisiae</i>
GFT	Fatores gerais de transcrição
IPTG	Isopropil beta-D-tiogalactopiranosídeo
LB	Meio de Cultura descrito por Luria-Bertani
MIG1	gene que codifica para repressor de transcrição em <i>S. cerevisiae</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
PNK	enzima polinucleotídeo quinase
RNA pol II	RNA polimerase II
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SNF1	"sucrose non fermentable" - gene que codifica uma serina treonina quinase em <i>S. cerevisiae</i>
SP1	fator de transcrição ("specific protein 1")
SSN6	gene que codifica para repressor de transcrição em <i>S. cerevisiae</i>
SUC2	gene que codifica para invertase 2 em <i>S. cerevisiae</i>
TAF	fatores associados ao TBP
TBP	proteínas ligadoras de sequência "TATA"
TF	fatores de transcrição
TFTC	"TATA binding protein (TBP) free TAF _{II} 's containing"
TUP1	gene que codifica para repressor de transcrição em <i>S. cerevisiae</i>
UAS	seqüências ativadoras a jusante
URS	seqüências repressoras a jusante

Resumo

O gene *TrSNF1*, homólogo aos membros da subfamília das proteínas serina-treonina quinases ativadas por AMP (*AMPK*) e relacionadas a *SNF1*, foi isolado do fungo filamentoso *trichoderma reesei*. A sequência de aminoácidos putativa possui um domínio de quinase com 42% de identidade e 59% de similaridade com outras proteínas quinases da mesma subfamília. Em *S. cerevisiae* a *SNF1* é essencial para a expressão de genes reprimidos por glicose, em resposta a privação de glicose do meio de cultura. A expressão de *TrSNF1* em levedura mutante para *SNF1*, restaura a função de *SNF1*. A expressão de um antisense de *TrSNF1* em *T. reesei* causa um atraso na expressão do gene regulado por glicose, *CBHI*. Além disso, em experimento utilizando matrizes de DNA foi possível observar uma alteração da tendência global da expressão gênica entre a cepa selvagem e a cepa antisense. A observação da homologia estrutural com proteínas quinase da mesma subfamília, a similaridade funcional com *SNF1* de *S. cerevisiae*, e a alteração no padrão da expressão gênica *in vivo*, sugerem que *TrSNF1* pode estar envolvido na regulação do metabolismo de carboidratos em *T. reesei*.

Abstract

A gene homologue to the members of the AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily, *TrSNF1*, was isolated from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. The predicted protein of 692 amino acids has a kinase domain, that share 42 % identity and 59 % similarity to that of serine/threonine protein kinase of this family. In *Saccharomyces cerevisiae*, the *SNF1* protein kinase is required for expression of glucose repressed genes in response to withdrawal of glucose from the medium. Expression of the *Trichoderma reesei* *SNF1*-related sequence in yeast *SNF1* mutant restores *SNF1* function. The *TrSNF1* antisense expression in *T. reesei* causes a control alteration in the glucose-regulated gene *CBHI*. The observed structural identity with the AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily, and the functional similarity to the yeast *SNF1* suggest that the *TrSNF1* may be involved in the regulation of sugar metabolism in *Trichoderma reesei*.

Introdução

As proteínas quinase desempenham uma importante função regulando e coordenando diferentes aspectos do metabolismo, expressão gênica, crescimento, motilidade, diferenciação e divisão celular. Uma tentativa para organizar as proteínas quinase eucarióticas em diferentes famílias foi realizada baseada na estrutura e características funcionais das mesmas. A utilização da similaridade das seqüências de aminoácidos no domínio catalítico se mostrou excelente para agrupar as proteínas quinase em famílias, as quais estão descritas na página da internet: http://www.sdsc.edu/Kinases/pkr/pkcatalytic/pk_hanks_seq_align_long.html.

Hardie e Hanks, em 1995, já haviam listado cerca de 400 diferentes domínios de proteínas quinase. A análise de similaridade e conservação entre tais domínios possibilitou a identificação de 11 subdomínios no domínio catalítico das proteínas quinase. A similaridade dos subdomínios catalíticos refletiu na similaridade na topologia estrutural, similaridade no mecanismo de regulação e similaridade na especificidade pelo substrato (Johnson et al., 1996; Smith et al., 1997). Baseado neste fato, as proteínas quinase foram agrupadas em cinco famílias. Exemplos de proteínas quinase destas famílias são: proteínas quinase dependentes de nucleotídeos cíclicos, proteínas quinase reguladas por cálcio/calmodulina, proteínas quinase dependentes de ciclinas e proteínas tirosina quinase. A última família engloba as proteínas quinase que não possuem características para enquadrá-las em nenhum dos outros grupos.

A tabela seguinte sintetiza a classificação das proteínas quinase (Hanks and Quinn, 1991):

1) Família AGC	
1.AGC Grupo I	Família de proteínas quinase reguladas por nucleotídeos cíclicos.
2.AGC Grupo II	Família de proteína quinase C, ativada por diacilglicerol/dependente de fosfolípido.
3.AGC Grupo III	Família de proteína quinase relacionada a PKA e PKC.
4.AGC Grupo IV	Família de proteína quinase que fosforila proteínas acopladas a proteína G.
5.AGC Grupo V	Família de proteína quinase de levedura relacionada a AGC.
6.AGC Grupo VI	Família de proteína quinase que fosforilam proteínas ribossomal S6.
7.AGC Grupo VII	Família de proteína quinase de levedura DBF2/20.
8.AGC Grupo VIII	Família de proteína quinase homóloga a PVPK1 em plantas.
9.AGC Grupo Outros	Família de outras proteínas quinase relacionadas a AGC.
2) Família CaMK	
1.CaMK Grupo I	Família de proteína quinase regulada por Ca^{2+} /CaM.
2.CaMK Grupo II	Família de proteínas quinase que incluem KIN1/SNF1/Nim1.
3.CaMK Outros	Família de outras proteínas quinase relacionadas a CaMK.
3) Família CMGC	
1.CMGC Grupo I	Família de proteínas quinase dependentes de ciclinas e relacionadas.
2.CMGC Grupo II	Família de proteínas quinase ERK (MAP).
3.CMGC Grupo III	Família de proteínas quinase do tipo glicogênio sintetase quinase 3 (GSK3).
4.CMGC Grupo IV	Família de proteínas quinase Caseína Quinase II.
5.CMGC Grupo V	Família de proteínas quinase Clk.
6.CMGC Grupo Outras	
4) Família PTK	Proteínas tirosina quinase "convencionais"
1. PTK Grupos I - IX	Proteínas tirosina quinase não transmembrânicas.
2. PTK Grupos IX - XXI	Proteínas tirosina quinase transmembrânicas.
5) Família OPK	
OPK Grupos I - XXIV	Outras proteínas quinase que não se encaixam nos grupos principais.

Diferentes mecanismos de controle da atividade das proteínas quinase têm sido relatados (Johnson et al. 1996), por exemplo:

- A) Controle por subunidades adicionais ou domínios que funcionam em resposta a segundos mensageiros (por ex., AMP cíclico, cálcio, diacil glicerol);
- B) Controle por subunidades adicionais com nível de expressão regulado pelo estado funcional da célula (por ex., proteínas quinase dependentes de ciclinas);
- C) Controle por subunidades adicionais ou domínios que identificam substratos ou a localização celular (por ex., domínios SH2 e SH3);
- D) Controle por domínios que inibem a atividade de quinase por um processo autoregulatório (por ex., quinase da cadeia leve da miosina);
- E) Controle por fosforilação/desfosforilação, onde há fosforilação de resíduos específicos de treonina, serina ou tirosina, que podem estar localizados na extremidade N-terminal ou C-terminal das enzimas.

Proteínas Serina-Treonina quinase: ativada por AMP (AMPK) e relacionadas a SNF1

Proteína quinase ativada por AMP de mamíferos (AMPK) e SNF1 de levedura são componentes centrais de cascatas de quinase altamente conservadas entre animais, fungos e plantas (Carlson, 1998). Tais enzimas são classificadas dentro da família de proteínas quinase reguladas por Cálcio/Calmodulina, tendo como substratos resíduos de serina e treonina de proteínas alvo (Hanks & Quinn, 1991).

A cascata da proteína quinase dependente de AMP atua como um sensor que monitora os níveis celulares de AMP e ATP, desde que ela é ativada pelo aumento da razão AMP: ATP (Stapleton et al., 1996). Uma vez ativada, a enzima desliga as vias anabólicas que consomem ATP e liga as vias catabólicas produtoras de ATP, como por exemplo,

a oxidação dos ácidos graxos (Forretz et al., 1998). A proteína serina-treonina quinase de levedura denominada SNF1 (de "Sucrose Non-Fermenting", que será discutida em detalhes posteriormente) é ativada em resposta ao estresse causado pela privação de glicose (Carlson et al., 1984). Neste caso, o sinal intracelular ainda não foi identificado. O complexo SNF1 atua primariamente induzindo a expressão de genes necessários à degradação de substratos alternativos (p. ex.: sacarose) que geram glicose, provavelmente através da fosforilação de fatores de transcrição (Nehhlin e Ronne, 1990). Proteínas quinase relacionadas a SNF1 também foram encontradas em plantas superiores e estão envolvidas na resposta a estresses nutricionais e do ambiente (Toroser et al., 2000; Ohba et al., 2000; Sudegen et al., 1999 a,b).

Os membros da subfamília das proteínas quinase ativadas por AMP/ relacionadas a SNF1 são componentes importantes nas cascatas de quinase altamente conservadas, que parecem estar presentes em todas as células eucarióticas. Desde que os alvos destas enzimas são muitos e variados, elas foram descobertas e redescobertas várias vezes, em diferentes organismos, por diferentes abordagens. Somente após a clonagem e o seqüenciamento do DNA destas enzimas é que foi possível agrupá-las em famílias de proteínas quinase de acordo com a sua estrutura. AMPK foi descoberta utilizando técnicas bioquímicas, enquanto SNF1 foi identificado inicialmente por abordagem genética. A síntese dos conhecimentos genéticos e bioquímicos daquelas proteínas quinase, de mamíferos e de leveduras, foi importante para identificar proteínas quinase semelhantes em plantas. Atualmente é possível identificar semelhanças na regulação e funções fisiológicas da subfamília das proteínas quinase: AMPK/SNF1.

Proteína quinase ativada por AMP em mamíferos

A descoberta de AMPK foi realizada de maneira independente por dois grupos em 1973 (Beg et al., 1973; Carlson & Kim, 1973). Em 1973, Beg e cols. descreveram o isolamento parcial de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), uma enzima regulatória chave na biossíntese de colesterol, a qual é inativada de maneira tempo-dependente quando incubada com MgATP e a fração citoplasmática (Beg et al., 1973). O mesmo fenômeno foi observado em microsomos de fibroblastos humanos quando foram apresentadas evidências de que tanto ATP quanto ADP são necessários para a função de HMG-CoA redutase (Brown et al., 1975). Posteriormente, foi demonstrado que a inativação de HMG-CoA redutase estava relacionada à sua fosforilação, e o fator citossólico foi denominado HMG-CoA redutase quinase (Keith et al., 1979; Beg et al., 1978). Carlson e Kim, ainda em 1973, descreveram a purificação parcial de acetil-CoA carboxilase de fígado de rato, uma enzima regulatória da biossíntese dos ácidos graxos, a qual é fosforilada e inativada por uma proteína quinase contaminante da preparação (Carlson & Kim, 1973). A proteína quinase que afetava a atividade de HMG-CoA redutase e de acetil-CoA carboxilase foi bem caracterizada somente em 1980 quando foi mostrado que a inativação de acetil-CoA carboxilase era estimulada por 5'AMP (Yeh et al., 1980).

Em 1985, Ferrer e colaboradores descobriram que a inativação de HMG-CoA redutase de fígado de rato também é estimulada por 5'AMP (Ferrer et al. 1995). Carling et al., em 1987, purificaram parcialmente uma proteína quinase de fígado de rato, a qual foi denominada de proteína quinase-3 de acetil-CoA carboxilase (ACK3), que fosforila e inativa acetil-CoA carboxilase. Esta proteína quinase é

ativada por AMP, sugerindo que seria a mesma observada por Yeh e colaboradores, em 1980. Além disso, ACK3 também inativa HMG-CoA redutase, e ambas são reguladas por fosforilação e AMP (Carling et al., 1987). Posteriormente, foi demonstrado que as proteínas quinase HMG-CoA redutase e acetil-CoA carboxilase co-purificam de fígado de rato e que correspondem a apenas uma proteína (Carling et al., 1989). A proteína quinase passou a ser denominada proteína quinase dependente de AMP (Hardie et al., 1989).

AMPK foi purificada até a homogeneidade, e a preparação continha quantidades estequiométricas de três polipeptídios de 63, 38 e 35 kDa (Davies et al., 1994). Davies, em 1994, propôs ainda que aqueles polipeptídios representavam componentes de um complexo heterotrimérico e passou a denominá-los de α (63 kDa) β (38kDa) e γ (35 kDa). A clonagem dos genes de cada uma das subunidades foi realizada, iniciando pela subunidade catalítica (Carling et al., 1994;Gao et al., 1995), e depois pelas não catalíticas (Stapleton et al. 1994;Gao et al., 1996). O cDNA da subunidade α codifica uma proteína putativa de 62 kDa, com identidade de 47% com a seqüência de aminoácidos de SNF1, e contém um domínio típico de proteína quinase serina-treonina em sua porção N-terminal. A similaridade entre α -AMPK e SNF1 é maior no segmento N-terminal catalítica do que no segmento C-terminal regulatória.

AMPK é ativada por fosforilação, através da atividade de uma proteína quinase denominada AMPKK (Weekes et al., 1994). Foi determinado que o principal resíduo de AMPK fosforilado por AMPKK é a treonina-172, localizada no "segmento de ativação", que por sua vez é situado entre as seqüências conservadas Asp-Phe-Gly (DFG) e Ala-Pro-Glu (APE), requeridas por várias proteínas quinase para sua própria ativação por fosforilação (Johnson et al., 1996). A figura

abaixo mostra o alinhamento dos segmentos de ativação, onde os segmentos DFG e APE estão em negrito e o resíduo de treonina fosforilado esta em negrito e grifado:

α -AMPK (rato)	DFGLSNMMSDGEFLR <u>T</u> SCGSPNYA APE
SNF1 (levedura)	DFGLSNIMTDGNFLK <u>T</u> SCGSPNYA APE
RKIN1 (Centeio)	DFGLSNVMHDGHFLK <u>T</u> SCGSLNYA APE

O complexo SNF1

A glicose é a fonte de carbono preferencial em *S. cerevisiae*, bem como para outras células eucarióticas, e a expressão de genes necessários para o metabolismo de fontes alternativas de carbono é reprimida por glicose. A desrepressão destes genes é essencial para a resposta celular à limitação de glicose. A função de SNF1 é necessária para a transcrição de genes reprimidos por glicose. Conseqüentemente, mutante de *snf1* não expressa genes reprimidos por glicose, tais como *SUC2* (invertase) , *CYC1* (citocromo C oxidase) e *COX6* (subunidade VI da enzima citocromo oxidase), na ausência de glicose (Neighborn and Carlson, 1984; Wright and Poyton, 1990). Também a atividade de SNF1 é necessária para a via gliconeogênica (Gancedo, 1998).

SNF1 de *S. cerevisiae* codifica para uma proteína de 633 resíduos de aminoácidos, com um domínio N-terminal característico de proteína quinase serina/treonina. SNF1 de *S. cerevisiae* possui uma característica na extremidade N-terminal que não é compartilhada entre seus homólogos: treze histidinas consecutivas, não essenciais para a função da proteína (Estruch et al., 1992). É interessante notar

que tal segmento natural rico em histidinas facilita a purificação da proteína por cromatografia utilizando níquel (Ni^{2+}) como quelante.

Foram clonados e caracterizados diferentes genes relacionados a *SNF1* de *S. cerevisiae* em plantas. De uma biblioteca de cDNA de endosperma de centeio foi isolado um clone denominado *RKIN1*, cuja seqüência putativa de aminoácidos codifica para uma proteína serina-treonina quinase homóloga a *SNF1* de *S. cerevisiae*, com uma similaridade de 66,9% (Alderson et al., 1991). Para verificar a função de *RKIN1*, foi construído um plasmídeo contendo o promotor de fosfoglicerato quinase (PGK) de levedura, controlando a expressão de *RKIN1*. Este plasmídeo foi usado para complementar com sucesso uma cepa mutante de *snf-1* em *S. cerevisiae*, revertendo a mutação, propiciando a cepa mutante crescer em etanol e glicerol (Alderson et al., 1991).

Em *Arabidopsis thaliana* foi clonado um cDNA derivado do gene denominado *AKin10*, que codifica para uma serina-treonina quinase, com identidade de 55% com o domínio catalítico de *SNF1* de *S. cerevisiae* (Le Guen et al., 1992). Além disso, foram clonados outros genes relacionados a *SNF1* de *S. cerevisiae* em tabaco (NPK5 – Muranaka et al., 1994), dois genes de arroz (OSK1 e OSK5 – Makoto et al., 1998), cevada (BKIN2 – Hannappel, 1995), batata (PKIN1 – Man et al., 1997), entre outros.

Em fungos filamentosos foi identificado um único gene relacionado a *SNF1* de *S. cerevisiae*, *ccSNF1* de *Cochliobolus carbonum* (Tonukari et al., 2000). O gene *ccSNF1* foi isolado através da amplificação por PCR, utilizando oligonucleotídeos degenerados baseados em regiões conservadas de *SNF1* de *S. cerevisiae* (Celenza e Carlson, 1984), Tabaco (Muranaka et al., 1994) e *C. glabrata* (Petter et al., 1996). A

função de *ccSNF1* foi analisada complementando uma cepa de *S. cerevisiae* mutante para *SNF1*, com um plasmídeo contendo o gene de *C. carbonum* controlado pelo promotor constitutivo de álcool desidrogenase (*ADH*). *Cochliobolus carbonum* é um patógeno de milho, o qual sintetiza e secreta pectinases, xilanases, celulases, endoglucanases, exoglucanases, proteases, xilosidases, arabinosidase e outros genes que degradam a parede celular e outras estruturas do milho (Tonukari et al., 2000), sendo a causa primária de sua patogenicidade. O rompimento de *ccSNF1* foi realizado pela reposição do gene alvo pelo gene de higromicina-B fosfotransferase (*HPH*). A cepa transformada $\Delta CCSNF1$ apresentou uma redução de 50% a 95% do crescimento em meios de cultura compostos por fontes de carbono alternativas, tais como xilano, pectina e parede celular de milho purificada (Tonukari et al., 2000). Enquanto o crescimento em glicose, frutose ou sacarose foi normal, os transcritos de beta-1,3-glucanase, pectinase e xilanases foram reduzidos em 53%, 24% e 65%, respectivamente, na cepa transformada.

Repressão por Glicose

A regulação da expressão gênica em eucariotos é um evento fundamental para o controle de atividades fisiológicas das mais distintas, tais como a diferenciação celular, crescimento, replicação, controle do metabolismo, etc.

O controle da expressão gênica através da repressão por glicose é um importante exemplo dos mecanismos envolvidos na regulação da transcrição. A repressão por glicose é extensivamente estudada em *S. cerevisiae* (Ronne, 1995), e muitos modelos de regulação da transcrição mediada por glicose são provenientes de estudos

utilizando este modelo experimental (Hardie et al., 1998, Ebbole, 1998).

O controle da expressão gênica regulada por glicose é motivo de intensos estudos. A glicose é a fonte de carbono preferencial da maioria dos organismos vivos, e na presença de glicose são reprimidos os genes responsáveis pelo catabolismo de fontes de carbono alternativas. Como foi sugerido por Ronne, em 1995, a expressão “repressão por glicose” será utilizada neste trabalho ao invés do termo “repressão catabólica”, desde que este último implica que catabólitos estão envolvidos no mecanismo de repressão, fato este que ainda não está bem estabelecido. Estudos têm demonstrado que a repressão por glicose é um mecanismo conservado através da evolução, estando presente desde bactérias até mamíferos.

A sinalização da disponibilidade de glicose ainda não está clara. Aparentemente a fosforilação/desfosforilação de proteínas é a chave para a compreensão de como a glicose modula a expressão gênica. Diferentes modelos têm sido propostos para esta finalidade. Na figura 1 esquematizei um modelo adaptado de Cereghino & Scheffler, 1996, com a inserção de dados obtidos por Özcan et al., em 1998 e Randez-Gil, et al., 1998 (a, b). Neste modelo, a glicose é importada do meio extracelular por um transportador de hexoses HXT (Özcan & Johnston, 1995), o qual é regulado pelos genes *GRR1* e *RGT1* (Flick & Johnston, 1991). As proteínas SNF3 e RGT2 atuam como sensores de glicose (Lafuente et al., 2000). As extremidades carboxi-terminais de SNF3 e RGT2 possuem sítios putativos de fosforilação por caseína quinase, bem como para ligação de nucleotídeos, sendo que a cauda carboxi-terminal de SNF3 é suficiente para gerar o sinal de presença de glicose (Özcan et al., 1998). A glicose é fosforilada por uma hexoquinase que seria ativada pelo sinal de SNF3/RGT2. Além disso,

o sinal produzido por SNF3/RGT2 parece ativar um sistema que incluiria as proteínas REG1 e GLC7 (Erickson & Johnston, 1993). A proteína fosfatase tipo 1, GLC7 (Hisamoto et al., 1994) complexada com o regulador REG1 (Ludin et al., 1998) é ativada por fosforilação. Dombek e colaboradores, em 1999, apresentaram resultados experimentais sugerindo que o complexo REG1-GLC7 atue no citoplasma desfosforilando, inativando e conseqüentemente enviando a proteína serina-treonina quinase SNF1 para o núcleo. A proteína SNF1 é considerada a proteína quinase chave no mecanismo de repressão por glicose; ela recebe o sinal, é desfosforilada e influencia ativadores de transcrição como SIP4 (Lesage et al., 1996), e repressores de transcrição como MIG1 (Smith et al., 1999).

FIGURA 1: PROPOSTA PARA O MECANISMO DE SINALIZAÇÃO DA EXPRESSÃO DE GENES REGULADOS POR GLICOSE. SNF3 E RGT2 SERIAM OS SENSORES DA DISPONIBILIDADE DE GLICOSE, QUE ENVIARIAM SINAL PARA REG1-GLC7, QUE DESFOSFORILAM SNF1, FAZENDO COM QUE OCORRA A REPRESSÃO POR GLICOSE.

Um panorama geral a respeito de ativadores, repressores e elementos intermediários envolvidos na repressão por glicose em eucariotos esta exemplificado a seguir. Tais exemplos referem-se basicamente a *S. cerevisiae*, a não ser que seja especificado no texto.

Mecanismos de Repressão por Glicose

O mais importante repressor de transcrição envolvido na repressão por glicose, MIG1, foi identificado pesquisando genes que desligam a expressão do gene *GAL1* (Nehlin & Ronne, 1990). Esta ligação requer uma sequência 5' (G/C)(C/T)GGGG 3' flanqueada na extremidade 5' por uma sequência rica em A-T (Lundin, Nehlin & Ronne, 1994). Foi demonstrado que os 24 resíduos de aminoácidos da cauda carboxi-terminal de MIG1 fusionados com um domínio de ligação ao DNA é suficiente para exercer a repressão (Östling, Carlberg & Ronne, 1996). Experimentos utilizando um gene repórter controlado pela UAS do promotor de *CYC1*, contendo apenas um sítio de ligação de MIG1, mostraram que a deleção de *MIG1* reduz mas não é capaz de eliminar a repressão catabólica por glicose, o que só ocorre pela eliminação de *MIG1* e *MIG2* (Wu & Trumbly, 1998).

Para que MIG1 exerça sua atividade repressora parece ser necessária a interação com SSN6 e TUP1 (Treitel & Carlson, 1995).

Em fungos filamentosos foram descritas proteínas repressoras envolvidas na repressão por glicose. Em *T. reesei* foi identificado um gene responsável pela expressão da proteína CRE1, um repressor por glicose com domínio de ligação ao DNA tipo C₂H₂ "zinc finger". No mutante Rut C-30 de *T. Reesei* *CRE1* está truncado. Neste mutante a expressão de genes responsáveis pela degradação de celulose, sistema reprimido por glicose, está parcialmente livre da repressão por glicose (Ilmém et al., 1996). O fungo filamentoso *Sclerotinia sclerotiorum* possui uma proteína denominada CRE1, a qual complementa a mutação do repressor CREA em *A. Nidulans*. Entretanto, apesar de possuir similaridades consideráveis com *MIG1*, o gene *CRE1* de *S. Sclerotiurom* não complementa o mutante para *mig1*. Entretanto, assim como MIG1, CRE1 também tem a sua

regulação baseada na localização celular, a qual é mediada por fosforilação (Vautard-Mey, Cotton & Fevre). A semelhança estrutural e funcional entre repressores por glicose em fungos filamentosos, os quais são diferentes de MIG1, sugerem um mecanismo particular de controle de transcrição em fungos filamentosos.

SNF1 forma um complexo com SNF4 (CAT3) e depende dessa associação para realizar plenamente a fosforilação de seus substratos (Jiang & Carlson 1996). A proteína repressora, em *S. cerevisiae*, MIG1, tem estrutura típica de "zinc finger", e atua fisiologicamente como substrato para SNF1 (Ronne, 1995, Treitel, et al., 1998). Na presença de glicose MIG1 está desfosforilado e se liga a elementos específicos em promotores de genes responsáveis pela utilização de fontes de carbono alternativas reprimindo a transcrição daqueles genes; na ausência de glicose SNF1 é ativado (figura 2) e fosforila MIG1 que se desliga dos promotores, mudando sua localização do núcleo para o citoplasma (DeVit, et al 1997).

A atividade quinase de SNF1 é essencial para modificar a localização celular do repressor MIG1. Na ausência de glicose SNF1 fosforila MIG1 em quatro posições diferentes: Ser-222, Ser-278, Ser-311 e Ser-381 (Smith et al., 1999) , alterando sua localização do núcleo para o citoplasma celular (DeVitt & Johnston, 1999), figura 3.

Figura 2: O complexo da proteína serina-treonina quinase SNF1 está ativo na ausência de glicose, quando o domínio regulatório (RD) libera o domínio catalítico (KD) que se autofosforila. SNF1 está presente tanto no núcleo quanto no citoplasma. Quando ativado, SNF1 fosforila o repressor de transcrição MIG1 que é exportado para o citoplasma e libera a transcrição de genes controlados por glicose. BrB = "bridging protein", com a função de fazer a ligação entre SnF4.

Modificado de Carlson, 1998

Figura 3: Controle da transcrição por glicose via proteína quinase SNF1. O complexo SNF1 está inativo na presença de glicose, e o domínio regulatório (RD) auto-inibe o domínio catalítico (KD) de SNF1. Em baixa glicose a auto-inibição cede e a subunidade ativadora, SNF4, se liga ao domínio regulatório, resultando na mudança do complexo para a forma ativa de serina-treonina quinase. O complexo MIG1/SSN6/TUP1 interage e reprime a atividade de genes reprimidos por glicose. Quando SNF1 está ativo, fosforila MIG1 levando a exportação do mesmo para o citoplasma. Além disso, SNF1 fosforila os ativadores de transcrição SIP4 e CAT8.

Além de atuar regulando a transcrição através da associação com ativadores, foi demonstrado em levedura que SNF1 atua diretamente sobre a holoenzima RNA Pol. II. A holoenzima RNA Pol. II de levedura contém proteínas denominadas SRB/MED, associadas ao domínio carboxi-terminal (Koleske and Young, 1994), as quais são mediadoras da ativação transcricional (Jiang, et al. 1998). Em levedura, a proteína quinase SNF1 estimula a transcrição gênica resposta a privação de glicose, interagindo diretamente com as subunidades SRB/MED da (Kuchim et. Al., 2000).

O fungo filamentoso *T. reesei*: modelo para o estudo da expressão gênica regulada por glicose

O gênero *Trichoderma* compreende fungos filamentosos de importância econômica de ocorrência ubíqua habitando diferentes tipos de solo (Montenecourt e Eveleigh, 1977). Estes organismos são hiper-produtores de hidrolases de polissacarídeos de plantas como as celulasas (Eriksson et al., 1990). As enzimas produzidas por *Trichoderma* são utilizadas no tratamento de fibras celulósicas na indústria têxtil, na indústria de alimentos e na indústria de polpa de celulose e papel (Godfrey, 1996). Devido a sua alta capacidade de sintetizar e secretar celulasas (Durant et al., 1988), mutantes de *Trichoderma* têm sido utilizados para produção de proteínas heterólogas (Nyyssönen et al., 1993). Além disso, diversas espécies de *Trichoderma* são micoparasitas usadas como agentes de controle biológico de fungos patogênicos de plantas (Chet, 1987).

Devido à sua importância em muitos processos biotecnológicos, as espécies de *Trichoderma* são objeto de intensas pesquisas básicas. Por exemplo, *Trichoderma reesei* é usado como sistema modelo no estudo da expressão de celulasas e xilanases. Têm sido descritos: o

mecanismo de indução dos transcritos de celulasas por celulose (El-Gogary et al., 1998; Torigo et al., 1996; Carle-Urioste et al., 1997), o mecanismo de repressão (Abrahão-Neto et al., 1995), as seqüências de DNA envolvidas na indução/repressão dos genes de celulasas e xilanases (Henrique-Silva et al., 1996; Ilmen et al., 1996; Zeilinger, 1996; Carraro et al., 1998; Saloheimo et al., 2000) e a estrutura tridimensional das celulasas (Rouvinen et al., 1994; Divne et al., 1994).

Análise da transcrição do gene de celobiohidrolase I (*CBH1*) utilizando β -glucuronidase (GUS), como gene repórter, identificou um segmento de 169 pb localizadas de -72 a -241 (relativos ao "TATA box") que são responsáveis pela expressão induzida por celulose. Esta região de 169 pb foi denominada UARcb1 ("upstream activating region of *CBH1* gene"). A deleção desta região do promotor aboliu a atividade induzida por celulose, mas, no entanto, não teve efeito sobre atividade basal do gene *CBH1*. A região responsável por esta atividade é de 72 pb, a qual foi denominada BERcb1 ("basal expression region of *CBH1* gene"). Portanto, o estudo deste promotor concluiu que esse é composto de duas regiões regulatórias – a basal (BERcb1-72pb) e a induzida (UARcb1-169pb) (Henrique-Silva et al., 1996).

O promotor *CBH1* apresenta 16 sítios putativos de ligação do repressor CRE I, homólogo de MIG1 de *S. cerevisiae*, o primeiro regulador clonado do sistema celulolítico (Ilmén et al., 1996b; Takashima et al., 1996). Estes sítios se localizam a montante de UARcb1.

Estes dados evidenciam que a expressão de *CBH1* é regulada por elementos *cis* que controlam a expressão basal, induzida por celulose e reprimida por glicose.

Carraro et al., em 1998, publicaram evidências de que o promotor de *CBH1* responde a *SNF1*. Utilizando um sistema heterólogo, o promotor de *CBH1* de *T. reesei* não pôde ser desreprimido em uma cepa deletada de *SNF1* em células de *S. cerevisiae*.

Foi demonstrado, no fungo filamentoso *T. reesei*, que o estágio fisiológico da mitocôndria influencia a transcrição de genes nucleares. Além de serem reprimidos por glicose, os transcritos de *EGL1* e *CBH1*, foram reprimidos quando submetidos a baixas concentrações de oxigênio ou por agentes que dissipam o gradiente de prótons da membrana mitocondrial interna, e também com outros que bloqueiam o transporte de elétrons na cadeia respiratória (Abrahão Neto et al., 1995). Estes resultados mostram a correlação da atividade mitocondrial e repressão por glicose, indicando que possivelmente a repressão está ligada a atividade respiratória.

A expressão de genes nucleares regulados por sinais mitocondriais provavelmente auxiliam no ajuste da célula quanto à produção de energia para diferentes necessidades (Poyton e Dagsgaard, 2000). Além disso, evidências sugerem que a mitocôndria pode se comunicar com o núcleo interferindo no nível de transcritos de genes nucleares, dependendo da função respiratória da organela (Abrahão Neto et al., 1995).

OBJETIVOS

- Isolamento do gene que codifica para uma proteína serina-treonina quinase, ortóloga a *SNF1* de *S. cerevisiae*, em *T. reesei*.
- Caracterização estrutural do gene *TrSNF1*;
- Caracterização funcional de *TrSNF1*;
- Tentativa de identificar genes alvo regulados por TrSNF1.

MATERIAIS E MÉTODOS

Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A): Da marca Merck S/A Indústrias Químicas. Da Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA, foram adquiridos SDS (Lauril-sulfato de sódio), persulfato de amônio, β -mercaptoetanol, Ficoll 40, DNA de esperma de Salmão, glioxal, Tween-80, Agarose, Azul de Bromofenol, Xilenocianol e aminoácidos.

Meio de cultura para levedura "yeast nitrogen base" sem aminoácidos e sulfato de amônio foram adquiridos da DIFCO, USA. Resinas de gel filtração e purificação de DNA tipo SEPHACRIL (200, 300 e 400) e poli dIdC fita dupla foram obtidas da Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suécia.

Meios de cultura para bactérias e PDA (DIFCO, USA); Soforose foi obtida da Serva, USA; polietileno Glicol 6000 (Fluka); Avicel PH101 (Forlab do Brasil); resinas de gel filtração e purificação de DNA tipo SEPHACRIL (200, 300 e 400) foram adquiridas da Amersham Pharmacia, Uppsala, Suécia; Acrilamida, Bis-acrilamida, ditioneitol (DTT) e resina aniônica AG1-X8 (200-400 mesh) procedentes da Bio-Rad laboratories, Richmond, CA, USA. As enzimas de restrição e modificadoras de ácidos nucleicos foram obtidas da Pharmacia, Boehringer Mannheim, Biolabs e da Gibco-BRL. Isótopos e membranas Hybond-N foram adquiridos da Amersham International, Inglaterra. Kits para sequenciamento de DNA utilizando radioisótopo foram do tipo "SEQUENASE" procedentes da USB, kits para sequenciamento de DNA utilizando o seqüenciador automático foram obtidos da Perkin Elmer USA; Kits para marcação de DNA ("Random

primers"), da Gibco-BRL e Boehringer Mannheim. Kits para amplificação de DNA foram adquiridos da Perkin Elmer e da Gibco-BRL. O aparato de seqüenciamento manual de DNA utilizado é da marca Bio-Rad; o aparato de seqüenciamento automático de DNA utilizado é da marca Applied Biosystems modelo ABI 377, Filmes de Raios-X de marca KODAK, X-OMAT XK-1. Os oligonucleotídeos utilizados foram sintetizados pela Operon Technologies Inc., USA.

Microorganismos utilizados e sua manipulação

A cepa de *Trichoderma reesei* QM9414, derivada de QM6a (Montenecourt e Eveleigh, 1979) foi utilizada em todos os experimentos (proveniente da coleção da ATCC, número 26921).

As bactérias utilizadas foram:

- Para propagação de plasmídeos: *E. coli* JM109 e DH10B
- Para infecção com bacteriófagos Lambda Dash: *E. coli* DL538
- Para infecção com bacteriófagos Lambda ZAP: *E. coli* SOLR

A preparação de células competentes foi realizada conforme o protocolo proposto pelo fabricante (Stratagene).

A levedura utilizada nos experimentos foi *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem selvagem W303-1A (*MAT a*, rho+, *ade2-1*, *trp1-1*, *his3-1,15*, *leu2-3,112*, *ura3-1*) e mutante para *snf* MCY1551 (*MAT ura3-52 ade2-101 leu2::His3 SNF1A*).

Manipulação de DNA e técnicas em geral

Digestão de DNA com enzimas de restrição; transferência e hibridização ("Southern" e "Northern"); modificação de extremidades e marcação com material radioativo; eletroforese de DNA e RNA;

isolamento de DNA; preparação de DNA plasmidial utilizando lisozima e aquecimento; preparação de géis; ligação de DNA; marcação com material radioativo, identificação de colônias recombinantes com utilização de X-GAL-IPTG ou por hibridização e outras técnicas corriqueiramente utilizadas em biologia molecular, foram feitas segundo descrito por Sambrook et al., (1989).

DNA e RNA de fungo foram preparado como descrito em El-Gogary et al., 1989.

Para amplificação de DNA ou RNA utilizamos Kits GeneAmp (Perkin Elmer), seguindo instruções do fornecedor e adaptando temperaturas e ciclos de acordo com a temperatura de "melting" (T_m) dos iniciadores utilizados.

Transformação dos microorganismos

Transformações de bactérias DH10B foram realizadas por eletroporação como indicado pelo fabricante do aparelho de eletroporação (Gene-Pulser apparatus a 25mF, a 2,5kV e Pulser Controller 200, com cubeta de eletroporação de 0,2 cm – Biorad).

Transformações de leveduras foram realizadas segundo Dohmen et al (1991): Crescemos as células de levedura em YPD até uma OD_{600} entre 0,6 e 1,0, centrifugamos e lavamos em 0,5 volume de uma solução de sorbitol 1M, 10 mM Bicina-NaOH (pH 8,35), etileno glicol 3%, DMSO 5% e ressuspendemos em 0,02 volumes da mesma solução. Alíquotas de 200 μ l das células foram armazenadas em tubos de microcentrífuga de 1,8 mL, a -70°C até o momento da transformação. Para a transformação das células de levedura

adicionamos de 5 µg de DNA plasmidial e 50 µg de DNA do timo de bezerro à suspensão de células, incubando-se a 37°C por 5 minutos sob agitação (300 rpm). Após adição de 1,4 ml de solução de PEG 1000 4%, Bicina-NaOH 0,2 M, incubaram-se as células por 1h, a 30 °C. Lavaram-se as leveduras com 1,6 ml de NaCl 0,15 M, Bicina-NaOH 10 mM (pH 8,35), ressuspendemos as células em 100 µl do mesmo tampão, e plaqueamos em meio YNB-Leu.

A transformação de *T. reesei* foi realizada por biobalística. Nesta técnica, placas de PDA são inoculadas com 10⁷ esporos, que após 6 horas são bombardeadas por micropartículas de tungstênio M5, carregando 10µg de DNA exógeno, sob uma pressão de 1.400 psi. Após o bombardeamento, as placas são incubadas por 7h, à 30°C, e então cobertas com igual volume (em relação ao meio de cultura original) de PDA, contendo 200 µg/ml de higromicina. Colônias de transformantes são visualizadas após 3-4 dias.

Desde que o plasmídio construído para a transformação não possui marca de seleção, foi utilizado um plasmídio para a co-transformação. Como plasmídeo selecionador na co-transformação utilizei pCSN43, que contém o gene *hph* sob controle do promotor do gene *TrpC* de *Aspergillus nidulans*. Este plasmídeo contém, também, o terminador de *TrpC* (Cullen et al., 1987). Isto foi necessário nos casos de transformação com os plasmídeos pYsnf e PJNSnf que não carregam nenhuma marca seletiva para uso no fungo. A eficiência da dupla transformação foi confirmada por “southern blot”.

A transformação do fungo *T. reesei* foi realizada no Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da Unicamp.

Isolamento de transformantes estáveis de *Trichoderma reesei*

Para isolamento de transformantes estáveis, as células foram transformadas, plaqueadas em meio PDA com sorbitol 1,2 M, como estabilizador osmótico, contendo 100 µg/ml de higromicina.

Após aparecimento das colônias transformantes, ou seja, colônias capazes de crescer em meio com higromicina, as mesmas foram isoladas (parte do ágar era retirado) e replaqueadas em meio PDA com higromicina. Este procedimento foi repetido por três vezes e, no último plaqueamento, aguardamos a esporulação das células transformantes.

Após a esporulação, os esporos foram recolhidos e contados. Plaqueamos os esporos em PDA-Higromicina com diluições dos esporos, até a obtenção de placas com uma única colônia. Esta, agora, podia ser cultivada em meio sem o antibiótico, sendo considerada um transformante estável.

Oligonucleotídeos Utilizados

Neste trabalho foram utilizados oligonucleotídeos (Tabela II) em diferentes experimentos tais como: amplificação de segmentos de DNA e de RNA, iniciadores na síntese de cDNA, sondas. A síntese deste oligonucleotídeos foi realizada pela Operon Technologies, Inc (Alameda, CA, USA).

Tabela II

Nome	seqüência (5' → 3')
1,7 445	GAT CTT GGT GAC GTA CGG AC
1,7-507	GAC CTG TCT GCA TTC TGT CC
140	TAC TAA CTG CCT TCG AGA CC
260	GAA CAA GCT TGG CGC ATC CC
274	AAC GGA AAC GGA CTG GTG AC
313	AAT CCG CTG CTC CGT CTT GG
353	TCA GCA AAT GCA GCG AAT CC
364	AGG GCT CCT TTG GCA AGG TG
418	AGT GAG GAT TCA AAC GAC GC
511	TCG TCA ATC GTC ATG CGC TG
528	GCA GCG CAT GAC GAT TGA CG
i1fSNFHind	ATC ATC AAG CTT TAT ACC GTC ATC AAG ACT CCG TCC GAA ATC
i1rSNFHind	GGT ATA AAG CTT GAT GAT GTG CGG GTG CCG GAC GAG
i2fSNFNhe	AAG CTC ATG CTA GCG AAC AGC GCG TCC CCT CGT CCG TAC GTC ACC AAG ATC GG
Int1	ACC AGG AAG AAG CTC ATC AGC CGC G
int2	GGG TAG CCT GCC GAC GAG AAG GAC G
SNF IX:	GGAATTC RWA NAG NAN NAC NCC GCA NNN CCA
SNF VI:	GGAATTC GTB CAY CGN GAY CTB AAG CCN GAG AAC
SNF VIII:	GGAATTC CTC NGG NGC NGC RTA GTT NGG NNN NCC RCA
SNF1060:	CNA CYT CNG GNC CNG CRT ANA GYT TNC CG
SNF562/I:	GTN AAR ACN CTN GGN GAR GGN TCN TTY GG
snf-anti3	GAC TCC CCG CGG CAC TTC GTT ATG CAG CTT CTC CTG
snf-anti5	AAT CGC GGA TCC CAG GAC AAG ACC AAG ACG GAG CAG
snf-f1-eco	CCG GAA TTC GCG CCC ACC GCC ATG GCG CGA GCC
snf-f2-eco	CCG GAA TTC ATG GTG CTC GAG TAC GCA GGC GGC GAG
snfi1-437	ACC AGG AAG AAG CTC ATC AGC CGC G
snfi1-969	GGG TAG CCT GCC GAC GAG AAG GAC G
snfi2-1330	GGC AAA GAC GAC GTG GAG GAG GCT C
snfi2-1980	TCG TAG CCT TCG TCG CGG AGA TGG G
snf-r1-kpn	CGG GGT ACC AAC CTA GTC GGC CTC GGC CAG CTG C
snf-r2-kpn	CGG GGT ACC TTA CGG AGT AAC GGG GTC ATG GCC GGT

Oligonucleotídeos empregados na elaboração deste trabalho.

Biblioteca Genômica

Construí uma biblioteca genômica em Labda Dash II (Stratagene) com insertos de aproximadamente 20 kb (Matheucci Jr. et al., 1995). Os segmentos genômicos de *T. reesei* foram clonados em *BamHI*. O título atual da biblioteca foi estimado em $2,4 \times 10^{34}$ pfu/ μ L.

Placas de lise foram obtidas pela infecção de 400 μ L de *E. coli* cepa DL538 competentes (protocolo idêntico a *E. coli* SOLR F-) com 1 μ L

dos bacteriófagos. A infecção foi incubada a 37°C por 15 minutos, misturada a LB top agarose a 55°C, e plaqueada sobre uma placa de Petri (135 mm) de LB ágar contendo ampicilina. A placa foi incubada por 15 horas, a 37°C.

Identificação do clone genômico de *TrSNF1*

Membranas de náilon Hybond N (Amersham-Pharmacia) foram colocadas sobre placas de lise obtidas após a infecção de *E. coli* DL538 pela biblioteca genômica e analisadas conforme instruções do fabricante.

A varredura da biblioteca foi feita pela hibridação com sonda radioativa, conforme Sambrook et al., 1989. A sonda utilizada foi um fragmento de DNA, amplificado por PCR, denominado pR5C. O fragmento foi marcado com [α P³²] dCTP, utilizando o kit "Random Primer" (Life Technologies). A hibridação ocorreu durante 14 horas em um tampão de 0,5M Na₂HPO₄, pH 7,2 e 7% SDS com 2,2 X 10⁷ cpm, em 20 mL da sonda marcada. Foram realizadas as seguintes lavagens da membrana hibridada com a sonda: 3 lavagens de 5 minutos com 2 X SSC e 0,1% SDS; uma lavagem de 10 minutos em 2 X SSC e 0,1% SDS; 3 lavagens de 5 minutos em 0,1 X SSC e 0,1 % SDS. A membrana foi exposta a um filme de raios-X por 5 horas antes da revelação do mesmo.

Foram isoladas 6 placas de lise, onde um pequeno fragmento circular (3-5 mm de diâmetro) do meio sólido no qual cresceram as placas de lise foi isolado, colocado em um tubo de 1,8 mL e incubado durante a noite a 4°C em 500 μ L de SM (NaCl 5,8g; MgSO₄-7 H₂O 2g; Tris·Cl, pH 7,5, 1 M 50 ml; água para completar 1 L), centrifugar e recuperar o sobrenadante contendo aproximadamente de 10⁷ a 10⁸ pfu em 0,2

mL. Os bacteriófagos derivados dos clones isolados foram utilizados para uma segunda análise da biblioteca, confirmando que tais clones contêm SNF1. Isolei duas placas de lise (clone 46/1 A e 32/1 A), extraí partículas de fagos, infectei *E. coli* suficiente para obter cinco placas de Petri (135 mm) confluentes. Tais placas de cultura (135 mm) foram cobertas com 15 mL de solução SM para eluição dos bacteriófagos e o DNA foi extraído utilizando "Lambda Purification Kit" conforme instruções do fabricante (Stratagene).

O DNA obtido do fago correspondente ao clone 46/1 A foi clivado com *BamHI* e os fragmentos submetidos a "Southern Blot" utilizando a sonda original derivada de pR5C. O experimento revelou a hibridação de uma banda única de 2,1 kb, que foi isolada do gel (GeneClean) e clonada em pBS, gerando o plasmídeo pEMJ2,1.

Biblioteca de cDNA

Foi construída uma biblioteca de cDNA a partir de mRNA obtido de micélio de *T. reesei* crescido em **glicerol**. A construção da biblioteca foi realizada pelo colega Felipe Chambergo Alcalde (estudante de Doutorado), em vetor Lambda Zap II.

A obtenção de clones contendo plasmídeos (pBluescript SK) com cDNA's de *T. reesei* como inserto (sítio 5' *EcoRI* e 3' *XhoI*) foi feita pela infecção de *E. coli* SOLR-(F') com a biblioteca de excisão em massa (*mass excision*), ou seja a biblioteca adicionada de um bacteriófago (*helper phage*) que possibilita a geração do plasmídeo pBluescript (SK) contendo cópias do cDNA no sítio de múltiplas clonagens (sítios de *EcoRI* e *XhoI*).

A obtenção de células de *E. coli*, SOLR (F-) competentes foi feita conforme instruções da Stratagene.

Identificação do clone de cDNA contendo *TrSNF1*

A varredura das colônias de *E. coli* infectadas pela biblioteca de cDNA de excisão em massa foi realizada conforme instruções do fabricante da membrana de náilon Hybond-N (Amersham-Pharmacia). A sonda utilizada foi um segmento de DNA de 2,1 kb (*BamHI* – *BamHI*), isolado a partir da biblioteca genômica. O fragmento de 2,1 Kb foi marcado com [α P³²] dCTP, utilizando o kit "Random Primer" (Life Technologies).

As placas de cultura foram mantidas em geladeira até a identificação da colônia recombinante, quando a mesma foi selecionada e crescida em meio líquido LB-ampicilina, a 37°C, durante a noite. A partir da cultura da colônia recombinante foi isolado o plasmídeo pTR4082, utilizando o kit de preparação média de plasmídeos CONCERT (Gibco-BRL).

Determinação do início da transcrição de *SNF1*

Para determinação do início da transcrição padronizamos uma técnica específica, derivada de Sambrook e colaboradores (1989).

Um iniciador de 20 mer (oligonucleotídeo 313) que hibrida com o mRNA de SNF1, entre as posições +31 e +50 em relação ao ATG iniciador (5' TTA GGC GAC GAG GCA GAA CC 3'), foi marcado com [γ P³²] dATP:

Reação de Marcação do Oligonucleotídeo:

- 11 μL água, 2 μL Tampão 10 X PNK (promega), 1 μL Oligonucleotídeo 313 (10 pMoles), 5 μL $\gamma^{32}\text{P}$ [dATP], 1,5 μL PNK (promega)
- incubar por 1 hora a 37°C
- precipitar com 2 μL de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e 60 μL de etanol absoluto
- incubar 15 minutos em gelo seco/etanol
- centrifugar 15 minutos a 16.000 g
- descartar o sobrenadante e lavar o precipitado com 200 μL de etanol 70%
- centrifugar 4 minutos a 16.000g
- descartar o sobrenadante
- secar o precipitado à temperatura ambiente
- ressuspender o precipitado em 10 μL de água

Reação de hibridação e Extensão:

- 2 μL de RNA Total (6 μg), 10 μL do oligonucleotídeo 313 marcado, 2 μL de água
- incubar a 70°C por 10 minutos
- reservar em gelo
- adicionar : 4 μL do tampão "first strand" (Life Technologies), 2 μL de ditionitroitol 0,1M, 1 μL de dNTP 10 mM
- misturar e incubar 10 minutos, a 42°C
- adicionar 1,5 μL de Super Script II (Life Technologies)
- incubar 1 hora, a 42°C.
- precipitar a reação com 0,1 volumes de acetato de sódio 3 M, pH 5,2 e etanol
- centrifugar 15 minutos a 16.000g

- lavar com etanol 70%
- centrifugar 4 minutos a 16.000g
- secar à temperatura ambiente
- ressuspender o precipitado em 5 μ L de água

Eletroforese:

Para a eletroforese utilizamos um aparato de seqüenciamento com gel de poliacrilamida 5%, contendo 8M de uréia. Para a aplicação foram misturados: 5 μ L da reação de extensão com 4 μ L do tampão de corrida (95% formamida, 20 mM EDTA, 0,05% de azul de bromofenol e 0,05% de xileno cianol), aquecido à 80°C, por 5 minutos e aplicado 3 μ L. A eletroforese foi realizada a 1250 V e 38W por 2 horas e 30 minutos. Antes da aplicação das amostras foi feita uma pré-corrida por 30 minutos para o aquecimento da placa. Como padrão de tamanho da banda correspondente ao início de transcrição utilizamos o seqüenciamento do DNA de M13mp18 com o oligonucleotídeo -40 (5'GTT TTC CCA GTC ACG AC 3') conforme instruções no kit Sequenase 2.0 (USB).

Construção dos plasmídeos para complementação de Levedura Δ SNF1 (MCY1551)

Construção de pTrSNF1

O plasmídeo pJN40 foi cedido gentilmente pela Profa. Dra. Carla Columbano de Oliveira. Este plasmídeo contém o promotor de cobre metalotioneína e a marca de seleção URA3/AMP^R, podendo ser propagado em bactéria ou levedura (Geitz e Sugino, 1988).

Desde que o maior segmento de cDNA obtido a partir da biblioteca foi de um sítio de *NheI*, imediatamente anterior ao segundo intron, tornou-se necessário retirar o intron 1 artificialmente, antes de clonar o gene em pJN40.

Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos para amplificar segmentos referentes aos exons I e II.

O exon I foi amplificado com os oligonucleotídeos snf-f1-eco e i1rSNF Hind, resultando na amplificação de um segmento flanqueado pelos sítios de restrição para *EcoRI* na extremidade 5' e *HindIII* na extremidade 3'. Sendo que o sítio de *EcoRI* foi adicionado artificialmente através do oligonucleotídeo e o sítio de *HindII* foi criado a partir da alteração de uma base (+248) na seqüência de AAG CTG para AAG CTT, sem que houvesse a alteração do aminoácido codificado (CTG ou CTT codificam para Leucina).

O fragmento referente ao exon II foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos i1fSNF-Hind e 418. Neste caso foi necessário inserir um sítio para clivagem com Hind III na extremidade 3' do segmento.

Os fragmentos um e dois foram clivados com *HindIII*, ligados e amplificados com os oligonucleotídeos snf-f1-eco e 418. O produto da amplificação, com cerca de 1450 pb denominado "e1+e2", bem como o plasmídeo pTr4082, foram clivados inicialmente com *NheI* e depois com *EcoRI*. O fragmento e o plasmídeo clivados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8%, excisados do gel e purificados com o kit Qiaquick (Qiagen). Foi então realizada a ligação do plasmídeo pTr4082 e o segmento de DNA contendo parte da seqüência codificadora de *TrSNF1* sem o intron 1. Cerca de 600 ng do segmento "e1+e2" e 50 ng do plasmídeo clivado foram ligados a

16°C, por 16 horas, em um volume final de 70 µL, utilizando T4 DNA ligase, conforme instruções do fabricante (Gibco-BRL). A reação de ligação foi precipitada com 0,1 volume de acetato de amônio 10M e 2,5 volumes de etanol, centrifugado e o precipitado lavado com etanol 70%, novamente centrifugado, o precipitado foi então seco a temperatura ambiente e ressuspendido em um volume de 10µL. Três microlitros da reação foram utilizados para transformar bactérias DH10B por eletroporação. As bactérias eletroporadas foram espalhadas em três placas de Petri contendo LB-ágar-amplicilina e incubadas durante a noite a 37°C. A identificação das colônias transformante foi feita por PCR de colônias de bactérias descrito adiante.

Identificado o clone recombinante, isolamos o plasmídeo pSpliceSNF e clivamos com *EcoRI* e *KpnI*, resultado em um fragmento de DNA contendo toda a seqüência codificadora de *TrSNF1*, sem os introns. Este fragmento foi isolado em gel de agarose, purificado com Qiaquick (Qiagen) e ligado ao plasmídeo pJN40 clivado com as mesmas enzimas. O resultado é um plasmídeo contendo o promotor de cobre metalotioneína de levedura, controlando o gene SNF1 de *T. reesei*.

Construção de pYSnf

Construí também o plasmídeo pYSnf contendo *SNF1* de *S. cerevisiae* sob o controle do promotor de cobre metalotioneína. O gene *SNF1* de *S. cerevisiae* foi amplificado com os oligonucleotídeos SNF FORWARD E SNF REVERSE, nos quais foram inseridos sítios de restrição para *EcoRI* e *PstI*, respectivamente. O segmento de 1,8 kb amplificado e pJN40 foram clivados com *EcoRI* e *PstI*; pJN40 clivado foi desfosforilado com CIAP (Calf Intestinal Alkalyne Phosphatase, Life Technologies), conforme instruções do fabricante. Os segmentos de

DNA de pJN40 e *SNF1* de *S. cerevisiae* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose “low melting”, e as bandas correspondentes recortadas e seu DNA recuperado com o kit Qiaquick (Qiagen). Os segmentos de DNA foram ligados com T4 DNA ligase (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. A reação de ligação foi precipitada com 0,1 volume de acetato de amônio 10M e 2,5 volumes de etanol, centrifugado e o precipitado lavado com etanol 70%, novamente centrifugado, e seco à temperatura ambiente. O precipitado foi ressuspensionado em 10 µL de água, e 2 µL utilizados para transformar bactérias por eletroporação. Analisamos por eletroforese em gel de agarose as colônias transformadas amplificadas por PCR, e posteriormente clivadas com as enzimas de restrição *EcoRI* e *PstI*.

Os plasmídeos pJNSnf e pYSnf foram utilizados para transformar *S. cerevisiae*, cepa MCY 1551 de acordo com Dohmen et al (1991).

Construção de antisense para SNF1

Isolei um segmento de 967 pb, a partir da amplificação, por PCR, de DNA genômico de *T. reesei*, utilizando os oligonucleotídeos snf anti5 e snf anti3. Os oligonucleotídeos utilizados contêm sítios artificiais para:

- snf anti 5: *Bam HI*;
- snf anti 3: *SacII*

Após a reação de PCR, a mesma foi purificada em coluna de sefacril S-300 (Amersham-Pharmacia) e o segmento amplificado clivado com as *BamHI* e *Sac II*.

Utilizei um plasmídeo (pFla) cedido pelo Dr. Flávio Henrique da Silva, que contém o promotor do gene de *CBH1* que foi clivado com *SacII* e *BamHI*, e o fragmento de *SNF1* foi inserido. Note que o segmento de *SNF1*, agora sob controle de expressão do promotor de *CBH1*, foi inserido invertido para que transcreva um RNA antissense. O terminador de triptofano foi obtido clivando o plasmídeo pCSN40 (Henrique-Silva et al., 1998) com *BamHI*, e isolando este segmento de 630 pb do gel de agarose (Qiaquick – Qiagen). O plasmídeo contendo o promotor de *CBHI* controlando o segmento antissense de *snfI* foi clivado com *Bam HI* e o terminador inserido, este plasmídeo foi denominado pAnti-snf. Para analisar qual colônia bacteriana continha a construção com o segmento antissense de *snf-1* e o terminador, fizemos PCR de colônias utilizando primers específicos.

PCR de Colônias de Bactérias

Muitas vezes utilizamos plasmídeos que contêm apenas uma marca de seleção que impede uma análise rápida no sentido de verificar a presença de um inserto. Para contornar este problema recorri a uma técnica onde se coletam colônias de bactérias transformadas com um palito de madeira estéril inoculando estas colônias individuais em uma placa contendo 96 recipientes ("96 well cell culture Cluster" da Corning Inc.) contendo 100 µL de LB em cada um. Após inocular a colônia em um recipiente, o mesmo palito é usado para inocular a bactéria em uma placa de Petri onde cada colônia é numerada conforme a posição do inóculo na placa com as culturas. As culturas são crescidas durante a noite a 37°C. É preparado um mix de reação de PCR contendo os oligonucleotídeos adequados para amplificar a construção a ser analisada e 15µL da reação de PCR é adicionada a cada um dos 96 recipientes em uma placa de amplificação por PCR. Um replicador de colônias (Boeckel) é inserido na placa de cultura e

imediatamente na placa de amplificação. O PCR é realizado com o seguinte programa:

1X: 96°C, 5 min.;

30X: 94°C, 1 min.

Temp. de anelamento, 1 min.

72°C, 1 min.

1X: 72°C, 10 min.

Após a amplificação, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TBE 1X. A análise dos transformantes de pAntiSnf foi feita pela amplificação de colônias bacterianas por PCR, utilizando os oligonucleotídeos 511 e "reverse primer". Os transformantes contendo o segmento de *SNF1* e o terminador produzem, por amplificação com os oligonucleotídeos indicados, um segmento de 1,1 kb .

Outra maneira de se realizar esta técnica quando poucos transformantes serão analisados é a seguinte: a colônia transformante é coletada com um palito estéril e transferida para um tubo Eppendorf contendo 20 µL de água, a mesma colônia é inoculada em placa de Petri contendo o meio de cultura adequado. A solução contendo as bactérias é aquecida a 94°C por 10 minutos, centrifugada brevemente, e 2µL do sobrenadante são utilizados para a reação de amplificação, conforme protocolo acima.

Análise de genes regulados por glicose utilizando "Macroarray"

O projeto de EST's de *T. reesei* desenvolvido no laboratório pelo colega Felipe Chambergo Alcalde proporcionou o isolamento de diferentes EST's do fungo. Cada um destes segmentos de cDNA está

clonado em pBluescript (Stratagene), flanqueado pelas seqüências complementares aos oligonucleotídeos: "SK" e "T7". Estes primers foram utilizados para amplificar 1248 seqüências de *T. reesei*, em placas com 96 tubos, em um volume final de 50 µL.

Treze placas com capacidade para 96 clones cada uma foram suficientes para acomodar todos os estás isolados de *T. reesei*.

Para desnaturar o DNA adicionamos NaOH em cada reação para uma concentração final de 0,4 N, e aquecemos a 96°C, por 10 minutos.

Utilizando um equipamento da Life Technologies (The Convertible™), transferimos por vácuo o resultado da amplificação desnaturada de cada placa com 96 reações para 3 membranas (triplicatas) de náilon ZetaProbe (BioRad). Após a transferência do DNA para cada placa adicionamos 150µL de NaOH 0,4 N a cada poço, para assegurar a desnaturação do DNA aderido à membrana. Cada uma das membranas foi lavada brevemente em 2X SSC, secas à temperatura ambiente e o DNA fixado pela exposição das membranas à temperatura de 80°C por 3 horas.

Estas 13 membranas em triplicata, totalizando 39 foram separadas para hibridação com cDNA do fungo crescido em diferentes condições.

Obtenção de cDNA Total de *T. reesei* crescido em diferentes fontes de Carbono e Marcação do com α -P³² dCTP

Utilizamos a cepa selvagem QM9414, bem como o transformante contendo o antisense: panti1.

Procedemos ao crescimento do fungo conforme descrito. Então adicionamos a fonte de carbono apropriada para cada cultura de 200 mL:

Cepa	Meio Mínimo + 1% de Avicel	Meio Mínimo + 1% de Avicel + 2% Glicose
QM 9414	+	+
Anti1	+	não realizado

Para as culturas em avicel e glicose, retiramos aliquotas de 50 mL com 0 horas, 13 horas, 19 horas e 25 horas.

Cada uma das alíquotas teve o RNA total extraído por ultracentrifugação em gradiente de cloreto de cério, conforme Sambrock et al. 1989.

Sondas complexas foram preparadas a partir do RNA total, com um excesso de oligo dT com a finalidade de saturar as caudas poli(A) e assegurar que a transcrição reversa das sondas não contivessem longas seqüências poli T (Miyamoto et al, 1994). Alíquotas de 25 µg de RNA total mais 8µg de oligo d(T) foram misturadas, aquecidas a 70°C e resfriadas progressivamente até 43°C, para o anelamento do oligo d(T) com as caudas poli (A). Sondas complexas foram então preparadas em 25 µL. Simultaneamente foi feita a transcrição reversa e a marcação por 1 hora a 43°C, na presença de 50µCi de [P32]dCTP, 5µM dCTP, 0,8mM de cada dATP, dTTP e dGTP, e 200U da Transcriptase Reversa Superscript (Life Technologies). O RNA foi removido tratando-se a reação a 68°C por 30 minutos com 1 µL de SDS a 1%, 1 µL de EDTA 0,5M, 3 µL de NaOH 3M. Após o tratamento a reação foi neutralizada com 10µL de Tris-HCl 1M, pH 7,5, mais 3µL de HCl 2N (Bernard et al., 1996). Os nucleotídeos não incorporados foram removidos em coluna de sefacril microspin S-300 (Amerham-Pharmacia).

Hibridação dos Macroarrays

As membranas foram preparadas em triplicatas de maneira que fossem hibridadas com cDNA's extraídos de *T. reesei* crescido em diferentes condições: QM9414 (selvagem) crescido 25 horas em avicel; QM9414 crescido 25 horas em avicel+glicose; e o clone antisense 1 crescido 25 horas em avicel+glicose.

As membranas foram divididas em três grupos, colocadas em sacos plásticos e pré-hibridadas com 30 mL de uma solução: 0,5M de Fosfato de Sódio, pH 7,2 contendo 7% de SDS, por 2 horas a 55°C. A seguir, a solução de pré-hibridação foi descartada e substituída pelo mesmo volume de uma solução idêntica, pré-aquecida a 55°C, contendo as respectivas sondas complexas marcadas radioativamente.

Resultados

Amplificação de seqüência de DNA relacionada a *SNF1* de *Trichoderma reesei*

A estrutura das proteínas quinase da subfamília ativadas por AMP e relacionadas a SNF1 é homóloga, no que se refere ao domínio catalítico. Foram identificados 11 subdomínios catalíticos para os diferentes grupos de proteínas quinase (Hanks e Quinn, 1991), os quais possuem regiões internas de maior ou menor homologia (figura 4A). Para isolar um gene potencialmente relacionado a *SNF1* em *T. reesei*, nós desenhamos oligonucleotídeos degenerados baseados no alinhamento de seqüências de subdomínios dentro do domínio catalítico de diferentes proteínas quinase: *S. cereale* = RKIN1 (Alderson et al., 1991), *S. cerevisiae* = SNF1 (Celenza e Carlson, 1986), e *Ratus norvegicus* – alpha AMPK (Carling et al., 1994; Gao et al., 1995). Além disso, também foram utilizados na escolha das seqüências de aminoácidos mais conservados proteínas quinase da família CaMK, Grupo II: *S. cerevisiae* - KIN1 e KIN2 (Levin et al., 1987), *Schizosaccharomyces pombe* - KIN+ (Levin et al., 1990), *H. sapiens* - KP78 (submissão direta GenBank, número de acesso gi: 189511), *Arabidopsis thaliana* - AKIN10 (Le Guen et al., 1992), *Hordeum vulgare* - BKIN12 (submissão direta GenBank, número de acesso gi:100610), *Triticum aestivum* - WPK4 (Sano e Youssefian, 1994), *Schizosaccharomyces pombe* - NIM1+ (Feilotter et al., 1991), *S. cerevisiae* - YKL453 (Pallier et al., 1993), *S. cerevisiae* - YCL24 (submissão direta GenBank, número de acesso gi: 83147).

Verificamos que os segmentos de aminoácidos com maior conservação dentro dos 11 subdomínios catalíticos estão localizados dentro dos subdomínios VI, VIII e XI, onde foram escolhidos

Figura 4 : Para amplificar por PCR e isolar um segmento do gene homólogo a *SNF1* em *T. reesei*, foram desenhados oligonucleotídeos degenerados.

A) representação dos onze subdomínios catalíticos conservados das proteínas quinase da subfamília CaMk – grupo II (Hanks and Quinn. , 1991) e localização dos oligonucleotídeos degenerados nos segmentos mais conservados. Os números dentro das caixas dizem respeito ao número de resíduos de aminoácidos de cada segmento.; B) Foram desenhados os oligonucleotídeos degenerados snf VI, snf IX e snf1060 baseados na seqüência dos aminoácidos conservados nos segmentos VI, VIII, e IX de proteínas quinase homólogas a *SNF-1* de *A. thaliana* (*RKIN1*), *S. cerevisiae* (*SNF1*) e de *M. musculus* (*AMPK*). Note as seqüências de aminoácidos consensos escolhidas para a elaboração dos respectivos oligonucleotídeos; C) seqüência dos oligonucleotídeos degenerados, onde: N= A, C, G e T , R=A e G ,Y= T e C , B= C, G e T ,W= A e T .

segmentos específicos (Figura 4B). Baseado em uma tabela de utilização de códons de *T. reesei*, construída a partir da análise de 42 genes constantes no GenBank, totalizando 18.575 códons, conforme tabela III.

Tabela III: Utilização de códons em *T. reesei*.

COD	f(‰)	COD	f(‰)	COD	f(‰)	COD	f(‰)
UUU	13.1	UCU	12.9	UAU	9.0	UGU	3.7
UUC	22.7	UCC	21.4	UAC	27.8	UGC	12.9
UUA	0.5	UCA	7.0	UAA	1.0	UGA	0.5
UUG	7.0	UCG	18.4	UAG	0.8	UGG	16.6
CUU	9.8	CCU	15.1	CAU	4.2	CGU	6.5
CUC	28.2	CCC	25.6	CAC	18.2	CGC	14.9
CUA	1.9	CCA	6.6	CAA	8.6	CGA	6.2
CUG	25.7	CCG	13.1	CAG	34.1	CGG	4.8
AUU	15.3	ACU	13.2	AAU	9.9	AGU	3.9
AUC	29.8	ACC	29.0	AAC	42.5	AGC	22.2
AUA	1.7	ACA	6.9	AAA	3.6	AGA	2.7
AUG	17.2	ACG	20.1	AAG	40.4	AGG	5.2
GUU	11.8	GCU	19.1	GAU	15.5	GGU	15.0
GUC	35.2	GCC	45.6	GAC	39.0	GGC	53.4
GUA	2.5	GCA	10.5	GAA	7.2	GGA	12.8
GUG	13.9	GCG	15.0	GAG	33.5	GGG	8.0

(extraído de: <http://www.kazusa.or.jp/>)

Onde: COD = códon; f(‰) = frequência do códon por mil.

Para desenhar os oligonucleotídeos degenerados utilizamos a seguinte notação: N = A, C, G ou T; M = A, C; S = C, G; R = A, G; Y = C, T; W = A, T; K = G, T; B = não A; D = não C; H = não G; V = não T.

Assim, foram desenhados oligonucleotídeos degenerados de acordo com seqüências de aminoácidos altamente conservadas, presentes nos subdomínios VI, VIII e XI (figura 4C).

A degeneração dos oligonucleotídeos pode ser medida de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Degeneração} = (X)(X_1)(X_2)....$$

onde: X = número de degenerações* em cada uma das posições multiplicada pelo número de degenerações da posição seguinte.

Portanto, o número de degenerações reflete quantos nucleotídeos são designados por uma letra específica, por exemplo, a letra N significa qualquer um dos quatro nucleotídeos, então $N = 4$.

Utilizando a fórmula acima verificamos a degeneração de cada um dos oligonucleotídeos desenhados:

SNF VI: $5,76 \cdot 10^2$

SNF VII:I $6,55 \cdot 10^4$

SNF IX: $1,31 \cdot 10^5$

SNF1060: $3,27 \cdot 10^4$

A amplificação da seqüência genômica de *T. reesei* com os oligonucleotídeos descritos foi realizada diversas vezes com diferentes condições e programas do termociclador. A reação que apresentou melhores resultados foi realizada num total de 50 μL : 100 ng de DNA genômico; 10 μM de cada oligonucleotídeo; 1X tampão de

reação (Life Technologies); 1,5 mM de $MgCl_2$, 5 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies) (figura 5B).

O programa do termociclador foi o seguinte:

- 1X: 94°C, 7 min;
- 3X: 94 °C, 2 min; 37 °C, 2 min; 72 °C, 2 min;
- 27X: 39 °C, 1 min; 72 °C, 1 min 30 seg; 94 °C, 1 min;
- 1X: 72 °C, 10 min.

Entretanto, apesar da padronização das condições de amplificação, ainda assim foram amplificados muitos segmentos de DNA (figura 5A). Apenas através do tamanho do segmento de DNA amplificado, seria impossível identificar um fragmento com certeza, que correspondesse a *SNF1*. Assim, resolvemos utilizar como sonda o oligonucleotídeo degenerado snfVIII, que hibridaria em uma seqüência interna de segmentos amplificados com snfVI/snfIX e snfVI/snf1060, em um experimento de transferência de "Southern". O experimento de amplificação foi repetido com os oligonucleotídeos snfVI/snfIX e snfVI/snf1060 e o resultado da eletroforese em gel de agarose (figura 5A) transferido para membrana de náilon (Zeta Probe), utilizando a técnica de transferência alcalina. O oligonucleotídeo snfVIII foi marcado na extremidade 5' com γ P^{32} [ATP] e hibridado com a membrana contendo os fragmentos amplificados (figura 5B). Desde que os segmentos amplificados contém a seqüência de snfVIII (figura 5C), foi possível identificar duas bandas únicas do tamanho esperado na autoradiografia. O fragmento amplificado a partir dos oligonucleotídeos snfVI e snf1060 foi isolado do gel, clonado em pMosBlue e seqüenciado. Foram obtidos sete clones diferentes, dos quais dois não possuíam inserto, quatro possuíam insertos homólogos a proteínas quinase de outras subfamílias que não *SNF1*, e um clone com inserto homólogo a *SNF1*.

Figura 5: Isolamento do segmento de DNA correspondente ao gene homólogo a *SNF1* em *T. reesei*. A) Os oligonucleotídeos snfVI/snfIX (1) e snfVI/snf1060, foram utilizados para amplificar o DNA genômico de *T. reesei*, e os segmentos amplificados foram separados em gel de agarose. B) Os fragmentos amplificados em "A" foram transferidos do gel de agarose para uma membrana de náilon e hibridados com o oligonucleotídeo degenerado snfVIII marcado com radioisótopo. C) esquema mostrando a posição dos oligonucleotídeos degenerados e os tamanhos dos fragmentos amplificados.

O clone de interesse possui um fragmento de 198 pb correspondente a região 5' de *SNF1*, e mostrou 71% e 95% de identidade, ao nível de nucleotídeo e aminoácidos, respectivamente com *SNF1* de *S. cerevisiae*. Este plasmídeo foi denominado pR5C.

Isolamento do clone genômico

Para validar o segmento de DNA clonado em pR5C, utilizamos o mesmo como sonda marcado com P^{32} , para identificar a presença de DNA complementar no genoma de *T. reesei*. DNA genômico do fungo foi clivado com a enzima de restrição *BamHI*, submetido a eletroforese em gel de agarose (figura 6A), transferido para membrana de náilon Zeta Probe (Bio-Rad), conforme consta em material e métodos. O resultado do experimento foi à identificação de uma banda única de aproximadamente 2 kb (figura 6B), confirmando a presença de um DNA correspondente a *SNF1* em *T. reesei*.

A mesma sonda utilizada no "Southern Blot" foi empregada para analisar uma biblioteca genômica (Lambda Dash^{II} - Stratagene). Após duas varreduras com sucessivos plaqueamentos dos clones positivos isolados (figura 6C), o clone 46A foi escolhido por produzir um fragmento de restrição com *BamHI* de aproximadamente 2 kb reconhecido pela sonda de pR5C (figura 7 A e B). O fragmento de DNA de 2,1 kb foi isolado do gel (figura 7C) e clonado em pBluescript, produzindo o plasmídeo denominado pEMJ 2,1. Este clone foi seqüenciado inicialmente utilizando os primers "M13" e "reverse primer" de pBluescript. O seqüenciamento completo do clone foi realizado utilizando sete primers ("forward": 364, 528, 140 e 260; "reverse": 313, 511, 418) em 29 reações de seqüenciamento, com o sistema "Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction" - no

Figura 6 : Utilização de seqüência de DNA isolada a partir da amplificação com oligonucleotídeos degenerados, pR5C, como sonda. A) 10 μ g de DNA genômico de *T. reesei* foi clivado com BamHI e separado em gel de agarose, onde: 1 = marcador de tamanho de DNA (ladder 1 kb) e 2 = DNA genômico clivado com *Bam*HI. B) Autoradiografia mostrando uma banda única de 2,1 kb reconhecida pela sonda pR5C, no genoma de *T. reesei* clivado com *Bam*HI. C) Autoradiografia da segunda varredura de uma biblioteca de genômica (Lambda Dash) de *T. reesei*, utilizando a sonda pR5C. As setas apontam clones recombinantes.

Figura 7 : Isolamento de uma banda de 2,1 kb correspondente ao gene homólogo a *SNF1* em *T. reesei*. A) Digestão do fago lambda 46A com *BamHI*, cujos fragmentos foram separados em gel de agarose. B) Autoradiografia mostrando uma banda única de 2,1 kb reconhecida pela sonda pR5C. C) Eletroforese em gel de agarose mostrando a banda de 2,1 kb isolada.

aparelho modelo ABI 377 (Applied Biosystems), conforme descrito em material e métodos.

O seqüenciamento completo de pEMJ 2,1 compreendeu um segmento de 2.097 pb, incluindo parte região 5' não traduzida e grande parte da seqüência codificadora, faltando 338 pb para o códon de terminação de tradução TAG.

Isolamento do clone de cDNA

Desde que uma biblioteca de cDNA estava à disposição, e que nosso objetivo imediato era o de isolar a porção 3' do gene, que geralmente esta presente em bibliotecas de cDNA; e estabelecer a presença e a posição de introns, decidimos isolar um clone de cDNA do gene em questão. O clone de cDNA foi isolado pela varredura de uma biblioteca de cDNA (lambda ZAP II), com o fragmento de clone pEMJ 2,1kb como sonda (figura 8). A vantagem deste sistema de clonagem é a possibilidade de obtenção do clone já em pBluescript. A partir do isolamento da colônia de *E. coli* recombinante (figura 8) obtivemos um segmento de cDNA de 1.917 pb, que tem a sua extremidade 3' em junção com a posição 1380 do clone genômico e sobreposição com a seqüência codificadora, a região 3' não traduzida, até a cauda poliA. Este segmento de cDNA clonado em pBluescript foi denominado de pTr4082.

Organização do gene

O clone genômico isolado anteriormente, denominado pEMJ2,1, com uma extensão de 2.097 pb, contido entre sítios de *Bam*HI, compreende um segmento da seqüência 5' não codificadora e a maior

Figura 8: Isolamento do clone de cDNA do gene homólogo a *SNF1* em *T. reesei*. Autoradiografia mostrando as colônias de bactérias recombinantes, reconhecidas pela sonda pEMJ2,1. Neste experimento de hibridação foram utilizadas colônias de *E. coli* recombinantes, derivadas de uma biblioteca de cDNA de *T. reesei* construída em Lambda ZAP II (Stratagene).

parte da seqüência codificadora do gene. Este clone termina a 338 nucleotídeos do sinal de término de tradução do gene. Posteriormente, foi isolado um clone de cDNA, denominado pTr4082, que compreende toda a seqüência 3' não traduzida, sobrepondo o clone pEMJ2,1, e terminando 1.136 nucleotídeos antes do códon TAG, como mostra a figura 9. Denominamos este gene de *T. reesei*, homólogo a *SNF1*, de *TrSNF1*.

Introns

Devido à abordagem utilizada para o seqüenciamento de *TrSNF1*, só foi possível identificar positivamente dois introns (II e III, vide figura 9), pela comparação entre as seqüências genômica e de cDNA. Entretanto, a análise computacional da seqüência genômica, utilizando o programa disponível no seguinte endereço: www-hgc.lbl.gov/cgi-bin/splice.pl indicou a presença de um terceiro intron na região 5' do gene. Este intron seria iniciado na posição 528 e terminaria na posição 589, a partir do primeiro nucleotídeo seqüenciado.

Para confirmar a presença de tal intron na posição indicada pelo programa, utilizamos a seguinte abordagem: amplificamos por PCR a região putativa para o intron, a partir de DNA genômico e de cDNA, utilizando os oligonucleotídeos int1 e int2, localizados nas posições 433 e 989 a partir do primeiro nucleotídeo seqüenciado. Através desta abordagem obtivemos a amplificação de um segmento de 556 pb a partir do DNA genômico e de 495 pb a partir do cDNA, evidenciando a presença de um intron de 61 pb, o que corroborou com a predição feita pelo software (figura 10).

Figura 9: Esquema do gene *TrSNF1* de *T. reesei*, onde: as linhas largas representam os exons e as linhas finas os introns, numerados com algarismos romanos; as setas identificadas por números mostram as posições de oligonucleotídeos utilizados no seqüenciamento do gene; pEMJ2.1 representa o segmento isolado a partir da biblioteca genômica e pTR4082 o segmento isolado a partir da biblioteca de cDNA. Note que existe sobreposição do clone genômico e de cDNA.

Figura 10: Identificação do intron I no gene *TrSNF1*. Eletroforese em gel de agarose de produtos de amplificação, por PCR, do segmento de SNF-1 de *T. reesei* na região do intron 1 com os oligonucleotídeos 437-969. A) Representação de segmento do gene *TrSNF1*, mostrando o primeiro e segundo exons interrompidos por um intron. As setas numeradas indicam a posição dos iniciadores utilizados para amplificação por PCR do DNA genômico e do cDNA de *T. reesei*. Os números acima e abaixo da seta dupla indicam o tamanho dos fragmentos amplificados a partir do DNA e do cDNA, respectivamente. B) eletroforese em gel de agarose 1,5% dos segmentos amplificados, onde: M=ladder 1kb; 1G=amplificação do DNA genômico da região do intron 1; 1C=amplificação do cDNA da região do intron 1.

Foi possível verificar a presença de três introns com 62, 175 e 83 pb, todos eles flanqueados por seqüências de “splicing” 5’GT 3’ e 5’AG 3’, nas extremidades 5’ e 3’ do intron, respectivamente.

Além disso, a seqüência de aminoácidos codificada pelo cDNA putativo produz uma proteína com similaridade na estrutura primária e terciária com outras proteínas quinase da mesma família. As estruturas primárias da proteína putativa e da seqüência de cDNA foram comparadas com bancos de dados, utilizando o programa Blastx e Blastn, respectivamente. Na tabela abaixo estão mostrados os resultados de comparações entre as seqüências putativas de cDNA e proteína de TrSNF1 com homólogos de *C. carbonum*, *D. melanogaster*, *C. glabrata*, *S. cerevisiae* e *S. sclerotiorum*.

código genbank/embl identificação do organismo	blastn (nt X nt) “e value” - identidade	blastx (nt X Prot.) “e value” - identidade
gb AF159253.1 AF159253 <i>Cochliobolus carbonum</i>	2e-32 81% *(218/266)	e-176 57% (356/616)
gb AF020310.1 AF020310 <i>Drosophila melanogaster</i>	3e-12 83% (107/128)	2e-98 43% (203/469)
gb L78130.1 YSASN1B <i>Candida glabrata</i>	5e-05 92% (94/116)	e-131 46% (290/626)
gb M13971.1 YSCSNF1 <i>S.cerevisiae</i>	0.047 91% (32/35)	e-128 43% (274/631)
emb CAB40826.1 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	8e-23 76% (159/209)	0,0 66% (419/633)

*entre parenteses estão o número de nucleotídeos comparados e que possuem identidade entre TrSNF e seus ortólogos.

Para a comparação da estrutura terciária foi necessária uma modelagem computacional da proteína, realizada através do programa presente no seguinte endereço na internet:

<http://www.expasy.ch/spdbv/> (Peitsch, 1995, 1996; Guex et al., 1997).

Após a modelagem da proteína a partir do cDNA putativo, utilizamos outro recurso da internet para comparar a estrutura com estruturas de proteínas conhecidas (figura 11). Esta ferramenta está disponível no endereço <http://www.rcsb.org/pdb/index.html> (Guex et al., 1997). As análises de similaridade estrutural mostraram uma identidade estrutural de 36,3% entre a proteína putativa TrSNF1 e a subunidade catalítica de AMPK de *B. bovis* (Hidaka et al., 1984).

Seqüência de nucleotídeos de TrSNF1

A partir do seqüenciamento dos clones genômico e de cDNA, acima descritos, bem como a identificação dos introns permitiu estabelecer a seqüência do gene com algum detalhe (figura 12). Para estabelecer um critério de numeração dos nucleotídeos, passaremos a denominar o primeiro nucleotídeo da seqüência, a partir do sítio de *BamHI*, pelo número 1 e assim por diante.

Obtivemos uma seqüência de 3.297 nucleotídeos, incluindo:

- Promotor: contendo um "TATA Box" putativo;
- Dois códons ATG, de início de tradução, na mesma fase de leitura;
- Três introns;
- Códon de terminação TAG;
- região 3' não traduzida contendo 744 nt.

O promotor contém uma seqüência consenso para "TATA Box", entre os nucleotídeos 74 e 80, conforme indicado pelo software localizado na internet: www-hgc.lbl.gov/cgi-bin/splice.pl. O primeiro códon ATG está localizado na posição 136, e o segundo códon ATG se inicia na

Figura 11: Comparação entre a estrutura tridimensional da subunidade *alpha* da proteína quinase dependente de AMP (α -AMPK) de *B. bovis* (Hidaka et al., 1984) e a estrutura tridimensional da proteína putativa TrSNF1 de *T. reesei*. Acima estão mostradas duas imagens de cada uma das estruturas terciárias das proteínas em questão. A estrutura primária de TrSNF1 foi deduzida a partir do seqüenciamento de nucleotídeos. A modelagem da estrutura tridimensional de TrSNF1, bem como a comparação da estrutura 3D com outras proteínas foram realizadas através das ferramantas de internet descritas no texto. Foi encontrada uma similaridade de 36,3% entre as estruturas acima descritas.

10 20 30 40 50 60 70 80 90
 GAGAGTCTAA TCACGAATCG AATTATCCAT CATCCTTGCC TTATCTCTCG GCGAGCCATC CTTCGGCGGC TGAATATATAA GTCCCTCTCC
 100 110 120 130 140 150 160 170 180
 CCCTCCCAGC GAGCGCGGTC CCAGCCCAGC CTCGTGCCGC TCGCCATGGT CCCTCGAGGC TTCGACGATG AGGAGCTGAC CATCTCCATG
 190 200 210 220 230 240 250 260 270
 TCGTCCACCC ACGTCCGGCG TCACCAGCAG CAGCAGCAGC AGCCGCCGCC TCAGACCCAG CCGCAGCAGG GCGACGCTGC TCGGAATGCG
 280 290 300 310 320 330 340 350 360
 CCCACCGCCA TGGCGCGAGC CGACCAGCCG CAGGACAAGA CCAAGACGGA GCAGCGGATT GCGCCTTACA CCGTCGTCCG GACCTTGGGC
 370 380 390 400 410 420 430 440 450
 GAGGGCTCCT TTGGCAAGGT GCGGCTGGCC ATCCACAACG GCACCGGCCA GAAGGTCGCC CTCAAGATCA TCACCAGGAA GAAGCTCATC
 460 470 480 490 500 510 520 530 540
 AGCCGCGACA TGCCCGGTCT CGTCGAGCGC GAGATTGAGT ACCTGCAGCT GCTGCGGCAC CCGCACATCA TCAAGCTgta cgctggttcc
 550 560 570 580 590 600 610 620 630
 tcgccaattc ctgttacgct agggcttctg actctaaacg ttcgagcagc TATACCGTCA TCAAGACTCC GTCCGAAATC ATCATGGTGC
 640 650 660 670 680 690 700 710 720
 TCGAGTACGC AGGCGGCGAG CTCCTCGACT ACATCGTCCA GAACGGCCGC ATGAAGGAGG CAGAGGCACG CCGCTTCTTC CAGCAGATGA
 730 740 750 760 770 780 790 800 810
 TCTGTGCCGT TGAGTACTGC CACCGCCACA AGATCGTCCA CCGCGACCTG AAGCCAGAGA ACCTGCTGCT GGACGAGAAC CTCAACGTCA
 820 830 840 850 860 870 880 890 900
 AGATTGCCGA CTTTGGCCTG AGCAACATCA TGACCGACGG CAACTTCCTC AAGACGAGCT GCGGCAGCCC CAACTACGCC GCCCCGAGG
 910 920 930 940 950 960 970 980 990
 TCATTGGCGG GAAGCTCTAC GCCGGCTCCG AGGTCGACGT ATGGAGCTGC GGCGTCATCC TCTACGTCTT TCTCGTCGGC AGGCTACCCCT
 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 TTGACGACGA GCACATCCCC AGCCTCTTCG CCAAGATTGC AAGGGGCACC TACAGCATGC CGCAGTGGAT GCCTCCGGGC GCGGCCGCCT
 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170
 TGATCAAGGG CATGCTGGTG GTCAATCCCC TGCAGCGCAT GACGATTGAC GAGATCAGGG CCGATCCGTG GTTCAACACC GACTTGCCCG
 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 CGTACCTGCA GCCTCCCGTC GAGGAGTTTT TCAACACCGG CGTCGATCCC AACAAAGGCAA TCAAGAAGAG TGATATTGCG CCCAATGCTC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350
 CCGAAAAGGT GCAGGAGAAG CTGCATAACG AAGTGACCGA AAAGATTAGC AAGACCATGG GCTATGGCAA AGACGACGTG GAGGAGGCTC
 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TTCAGTCTGA TGAGCCTTCC GCTATCAAGG ATGCCATACAT GATTGTTTGA GAAAACAAGC TCATGCTAGC GAACAgtagg tccacaccct
 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530
 ggcttttccg ttcttttccc tccccctttt ettgccaccg gtttgtgacc aagccagcca aatactaact gccttcgaga cccagagcgc
 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 ggcctcactg gggacgaagg cagtccatg atgagtatat etttacacg atccgccatt tcgccaggag GCGCGTCCCC TCGTCCGTAC
 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710
 GTCACCAAGA TCGGCATTCT ACCCAGCAGT CTTCTGCTCCT ACCACAAGGA TTACATGGAG AGGGAAAAGA ACGGGACCGG CCATGACCCC
 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 GTTACTCCGG CCATCACCAT CAACGACGAG CTGCCCCTCA CTCGCACTGA GGTGAAAAA GAGGAGGCGG CCGCTCGTTT GAATCCTCAC
 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890
 TCCCGCAGTG CTCTGCTCTT GGACGAGTCC AGCAAACGCC CGCAGGGCAT GACACCCATC ACCGCCCCAG TCAAGAAAGCC CAAGCCTGTG
 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 CGCTGGCAAT TTGGCATAAG ATCTCGCAAT GCGCCATGGG AGGCTCTCCT TTGCATCCAC AAGGCCCTGA ACAAGCTTGG CGCATCCCAT
 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070
 CTCCGCGACG AAGGCTACGA TGAGGCGCAA CGCAGAGGGG TCGAAGATGC CACAAGCCGC GATAGCAGCT TCGCAAACGG CGCCCCATTAA

```

2080      2090      2100      2110      2120      2130      2140      2150      2160
GAAAGAGATC CGAACGGGCA TGACAAGGAT CCCACGAAGA GGGTATAAGC TGCCTGCAGA TCCGTGGCAT ATCCAGGGTC AGATGGCCAT

      2170      2180      2190      2200      2210      2220      2230      2240      2250
CAACAAGtaa gtctcgaact ggtcgttttg tcacataggt tcgccctttg aaggtttatc attctaacga tcgggtccaa acaaatagGC

      2260      2270      2280      2290      2300      2310      2320      2330      2340
ATGCAAGCAG GGGCGGATCG TCGAGATGAG CTCGGGTTCC AAAGCCGGAT CTCCCGACAG CTTTCGTCTAC ACTCGCGGAG ATGCGGCCCTC

      2350      2360      2370      2380      2390      2400      2410      2420      2430
ACGCAAGGAC TTTGTGCGCT TGCATATGGA CATCCAAATC TATGAGATGG AGCAGGGGGT CTATCTCGTG GACTTCAAGT GTCGGGGCTA

      2440      2450      2460      2470      2480      2490      2500      2510      2520
CGAGACCCAG GACGGAAGGC TGCCTCAGGA GAAGGAGGTC ACCAGTCCGT TTTCCGTTCCT GGACCGGGCC GCCAAACTGA TTATGCAGCT

      2530      2540      2550      2560      2570      2580      2590      2600      2610
GGCCGAGGCC GACTAGgttc gcccgggatt cgtgcattt gctgagcggc tttggccctc tgggtcgagg accagcaagt tgctttctgg

      2620      2630      2640      2650      2660      2670      2680      2690      2700
ctgaaggctc tctccactgg tgtcctcgcg aggaccaagg atgtgtgatc tggtcgagga atatccgaag gtctcgtctc cctcatatt

      2710      2720      2730      2740      2750      2760      2770      2780      2790
cccgacggtt tgagcttcat ggttcacttg agttgtactt ttcttcgctc ttgtcttttc cctccattt cttcacctct aatcccttga

      2800      2810      2820      2830      2840      2850      2860      2870      2880
actccgaaat gggtagccct gcaacaatag gaagtctctt ccattcttgc ttggccattc accctctgca tcttctctc ctatattctc

      2890      2900      2910      2920      2930      2940      2950      2960      2970
tcgtcctttc acacattgtg ctttgatagt atgttttctc tcattgtgtt cttggagggg ggtgggcgtc aaatctgggt ttagaatctt

      2980      2990      3000      3010      3020      3030      3040      3050      3060
cgcgtggttg cgcagcgttt attgtcagcg ccgagcgggg gggttggatg ggcattggaa gtgtaaaact ttgggcggaa ggataccggt

      3070      3080      3090      3100      3110      3120      3130      3140      3150
gagccgatgg gcatgagctg ggtctgttct tgacggattg aatgagtcaa aaacgttgca aaacgttgaa caacagacaa agaggagggga

      3160      3170      3180      3190      3200      3210      3220      3230      3240
ctgctgccgt tgcgcaagct gggggggttc tcattctcgt tcagctcttt tgtgtttgct gaagctgcga gaaggaaaga tgatgggtcac

      3250      3260      3270      3280      3290
cataggtaca tatattaatg tgtaacattt ttttttctgt aaaaaaaaaa aaaaaaaa

```

Figura 12: Sequência de nucleotídeos do gene *TrSNF1* deduzido a partir do seqüenciamento dos clones genômico pEMJ2,1 e de cDNA p4082. Na figura estão mostrados: "TATA Box" = nucleotídeos "TATAAA" grifados; primeiro códon de início de tradução = nucleotídeos "ATG" grifados (posição 136); segundo códon de início de tradução = nucleotídeos "ATG" grifados (posição 279); Os nucleotídeos em letras minúsculas referem-se aos três introns que se iniciam nas posições 527, 1425 e 2167; códon de terminação = nucleotídeos "TAG" grifados (posição 2333); e os nucleotídeos em letras minúsculas grifadas referem-se a extremidade 3' não traduzida do gene.

posição 280, produzindo fases abertas de leitura de 2.081 e 1936 nt, respectivamente.

Seqüência de aminoácidos deduzida de TrSNF1

A seqüência de aminoácidos de TrSNF1 pode ser de 692 ou 645 aminoácidos, a partir do primeiro ou segundo códon ATG, respectivamente. Desde que ambos os inícios de tradução estão na mesma janela de leitura, podemos observar na figura 13 a estrutura primária putativa de TrSNF1, alinhada com proteínas homólogas de *S. cerevisiae*, *A. thaliana* e *R. norvegicus*. Claramente podemos notar a identidade entre segmentos de aminoácidos no domínio catalítico das várias proteínas quinase comparadas.

Em *S. cerevisiae*, existe uma seqüência de 13 histidinas em *tandem*, que não estão presentes nas outras proteínas homólogas a SNF1. Entretanto, TrSNF1 apresenta 6 glutaminas em *tandem* exatamente na mesma região do gene onde estão localizadas as histidinas de *S. cerevisiae*. A função destas seqüências é desconhecida.

O alinhamento das seqüências primárias das proteínas mostrou uma importante conservação dos resíduos localizados no segmento de ativação, que contém o resíduo de treonina importante para a ativação da enzima (Johnson et al., 1996). Além disso, esta demonstrado que os segmentos utilizados para a construção dos oligonucleotídeos degenerados também são altamente conservados (figura 13).

```

Tr : --MVPRCFDDEELTISMSSTHYRRHQQQQQPPPTQPPQCDAAANAPTAMARADQPDKTKTEQRGAYTVVRTLGECSFGKVLRLAHNGTGQKVALKI : 98
Sc : ---MSSNNNTNTAPANANSSHHHHHHHHHH---HHCHGGSNS---T-LNNPKSSLADGAHIGNYQIVKTLGEGSFGKVKLAYHTTTGQKVALKI : 85
At : -----MDCSGTG-----SRSGVESILPNYKLGRTLGCSFGKVKLAYHTTTGQKVALKI : 49
Rat : -----MVIMSEFSAVP-----SGTGQG-----QQKPLRGFYDVERTLGRGNFAVVKLARHRVTRTQVAIKI : 57

Tr : LTRKKLISRDMAGLVERETEYLQLLRHPHIILKLYTVIKTPSETIMVLEYAG-GELFDYIVQNGRMKPAEARFFQOMTCAVEYCHRRKIVHRDLKPENLL : 197
Sc : LNKVLAQSDMQGRTEREISYLRLLRHPHIILKLYDVVSKDEIIMVLEYAG-NELFDYIVQDKMSQEARFFQOITISAVEYCHRRKIVHRDLKPENLL : 184
At : LNRKKIKNMEEKVRREIKILRLFMHPHIILRYEVIETPTDIYLVMEYVNSGELFDYIVEKGRLODEARNFFQOITISGVEYCHRRNMVHRDLKPENLL : 149
Rat : LDKTRLDSNLEK-LYREVQLMKLLNHPNIIKLYQVMEKDMLYIVTEFAKNGEMFDYLTSGHLSNEARQKFWOITISAVEYCHNHHIVHRDLKTEENLL : 156

Tr : LDENLVNKIADFGLSNIMTDGNFLKTSKSGSENYAAPEVIGSKLYAGSEVDVWSCGVILYVLLVGRLPFDDEHIPSFAKIACTYSMEQWMPGAAALIK : 297
Sc : LDEHLNVKIADFGLSNIMTDGNFLKTSKSGSENYAAPEVISGKLYAGSEVDVWSCGVILYVLLVGRLPFDDEHIPSFAKIACTYSMEQWMPGAAALIK : 284
At : LDKCNVNIADFGLSNIMRDGHFLKTSKSGSENYAAPEVISGKLYAGSEVDVWSCGVILYVLLVGRLPFDDEHIPSFAKIACTYSMEQWMPGAAALIK : 249
Rat : LDSNMDIKLADFGFNGFYKPEGLSTCVGSPPYAAPEVFEGKRYEGPOLDVWSLGVVLYVLCGSLPFDGPNLPTLRQRVLEGRFRIEFFMSQDCETLIR : 256

Tr : GMLVNVFVQRTIDEIRADPWNTDLPAYLQPPVEEFFN---TGVDPNKAIKKSDIAPNAPEKVKELHNEVTEKISKTMGVGKDDVEEALQSDPS-- : 391
Sc : RMLIVNPLNRISIHETMQDDWFKVDLPEYLLPDLKPH---EENENNDSSKKGSSPDNDE---IDDLNVNLSSTMGVEKDEIYESLESSEDTPA : 375
At : RMLVVDPMKRVTIPEIRQHPWFQAHLPRYLAVP-----PP-DTVQQA---IDDEILQEVIN-MGSDRNHLIESLRNRTON-- : 321
Rat : RMLVVDPAKRITIAQIRQHRMMAQADPTLLQDDPAFDMQGYTSNLGDYNEQVLGIMQALGIDRQRTIESLQNSSYNHFAALYLLERLKEHRSAPSSR : 356

Tr : --AIKDAYMIVRENKMLLANSA-SPRPYVTKIG-ILPSSLPAYHKDYMERKNGTGHPD-----VTPAITIN----- : 454
Sc : FNEIRDAYMLIKENKSLIKDMK-ANKSVSDELDTFLSQSPPTFQQQSKSHQKSQVDHETAK-----QHARRMASAITQQR----- : 449
At : --DGTVTYYLLDNR-----FRASSGYLG---AEF---QETMEGTFRMHFAES-----VASPVSHR----- : 369
Rat : PTPAPTRQQLRSSDLSSLEVPQEILPCDFRPSLLCPQQAALQSVLQAEIDCDLHSSSLPQLFLDNTNCSGVFRHRSISPSSLDTAISEEARQGPSL : 456

Tr : -----DELVTREVEKEEAAARLN---PHSR---SALRLDESSKRPQ-GMTGITAPVKK-----PKPVRWQFGIRSRNAPWEALLCHKA : 528
Sc : -----TYHQSFPMDQYKEEDSTVSLPTSL-PQIH---RANMLAQGSPAAS-KISPLVT-KK-----SK-TRWHFGIRSRSYPLDVMGEVIA : 525
At : -----LP-----GLMEYQGVGLRS---QYEVER-----K---WALGLQSRAPREIMTEVLKA : 411
Rat : EEEQEVQEPLEGGSTGRRHTLAEVSTHFSPLNPPCIIVSSSATASPEGTSSDSCLFSASEGPAGLGSGLATPGLLGTSPPVRLASPFGLGSQSATPVLQT : 556

Tr : LNKLGASHLRDEGYDEAQRGVEDATSRDSSFANGAPLERDPNGHDKDPTKRYKLPADPWHIQVRWPS---TSMQAGADRDELGSKAGSPDSFVYTRGD : 625
Sc : LKNLGA-----EWAK-----PSEED-----LWTIKLRW-----KYDIGNKTNT----- : 558
At : LQDLNV-----CWKK-----IGHY-----NMKCRWVP---N-----SSADGMLSNS----- : 444
Rat : QAGLGTAVLPVVSFQEGRRASDTSLTQGLKAFRQQLRKNARTKGLG-LNKIKGLARQVCQSSVTPRGGMSTFHTPAPSSGLQCCTTSNREGSLLLEV : 655

Tr : -AASRKDFVALHMDIQIY--EMEQQVYLVDFKCSG-----YEQDGR-----LLEEKEVT-----S : 673
Sc : --NEKIPDLMKMVIQLF--QIETNNYLVDFKFDG-----WESSYGDDTTV-----SNISEDEMSTF-----S : 611
At : -MHDNNYFGDESSIIENE--AAVSPNVVKFEIQL-----YKRRDDK-----YLLDLQRVQG-----P : 494
Rat : LHQQRLLQLQHSSSTAASSGCQGPQLSPVPYVLPACDSLLVSGIPLLPPLLLQACMSPVASAAHLMDTHLHISAGPVALPTGPLPQCLTRLSPGCDPA : 755

Tr : PFPFLDRAA--KLIMOLAEAD----- : 692
Sc : AYPFLHLTT--KLIMBLAVNSQSN----- : 633
At : QFLFLDLCA--AFLAQLRVL----- : 512
Rat : GLPQGDCEMEDLTSGORGTFFVLVQ----- : 779

```

Figura 13: Comparação da sequência protéica de: Tr) *TrSNF1* de *T. reesei*; *SNF1* de *S. cerevisiae*; At) *RKIN* de *A. thaliana* e Mm) *AMPK* de *Mus musculus*. As seqüências de aminoácidos das quatro proteínas estão alinhadas e os domínios catalíticos destacados. O resíduo de treonina, apontado pela seta vertical, está localizado no segmento de ativação (Johnson et al., 1996), e é posicionado entre os motivos Asp-Phe-Gly (DFG) e Ala-Pro-Glu (APE), os quais estão indicados sob as setas horizontais. Os aminoácidos conservados selecionados para o desenho dos oligonucleotídeos degenerados estão indicadas por linhas horizontais abaixo das respectivas seqüências. O alinhamento foi feito utilizando o programa ClustalW, com os parâmetros padrão do programa

Identificação do início de transcrição

O início de transcrição de *TrSNF1* foi estabelecido. Na figura 14 estão mostrados os dois inícios de transcrição, que foram identificados utilizando uma modificação de técnicas de extensão de primer, conforme consta em material e métodos. Foram encontrados dois inícios de transcrição 49 pb e 18 pb a jusante do primeiro e segundo códons de início de tradução, respectivamente.

Número de cópias de *TrSNF1*

A identificação do número de cópias de *TrSNF1* foi realizada através de um experimento de "Southern Blot", e foi possível demonstrar que o gene está presente em cópia única no genoma de *T. reesei* (figura 15).

Além disso, foi possível observar outras bandas mais fracas, certamente devido a sonda utilizada, a qual reconhece um segmento localizado na porção N-terminal, conservada entre diferentes proteínas quinase.

Análise funcional de *TrSNF1*

Para identificar a função fisiológica de *TrSNF1*, utilizamos duas abordagens: a complementação de um mutante de *S. cerevisiae*, cujo gene *SNF1* é deletado; e a construção de uma cepa de *T. reesei* expressando um antisense para *TrSNF1*. Nos subtítulos a seguir estão os resultados obtidos.

Figura 15: Número de cópias de *TrSNF1* de *T. reesei*. A) Esquema do gene, onde as linhas grossas representam os exons e as linhas finas os introns, note as posições dos sítios de restrição para *Bam*HI e *Sca*I. O traço acima mostra a localização do segmento utilizado como sonda no "Southern Blot". As linhas abaixo representam os segmentos de DNA clivados com *Bam*HI, *Sca*I e *Bam*HI e *Sca*I, com os respectivos tamanhos em pares de bases acima de cada linha. B) Autoradiografia do "Southern Blot", onde alíquotas de 10 ug de DNA genômico de *T. reesei* foram clivadas com *Bam*HI, *Sca*I e *Bam*HI + *Sca*I, conforme indicado na figura, e hibridado com a sonda marcada com P^{32} . As bandas principais têm o tamanho correspondente ao indicado em "A": *Bam*HI = 2,1 kb; *Bam*HI + *Sca*I = 0,7 kb e 1,3 kb e *Sca*I = ~1,0 kb e ~18 kb. Estes resultados indicam a presença de uma cópia única de *TrSNF1* no genoma de *T. reesei*.

Complementação de *S. cerevisiae* $\Delta snf1$

S. cerevisiae é um modelo bem estabelecido para o estudo da função de SNF1 como modulador da transcrição. A cepa MCY1551 da levedura é um produto da deleção do gene SNF1 ($\Delta SNF1$). Esta cepa é incapaz de crescer em glicerol, desde que os genes necessários para metabolizar este carboidrato não podem ser desreprimidos devido à falta de atividade de SNF1 (Celenza and Carlson 1986).

Os plasmídeos pTrSNF1 (figura 16 e 17) e pYSNF1, foram construídos como descrito em material e métodos.

O plasmídeo *pYSNF1* contém o gene SNF1 de *S. cerevisiae*, controlado pelo promotor de cobre metalotioneína da levedura. Enquanto o plasmídeo pTrSNF1 contém a sequência codificadora de *TrSNF1* controlada pelo promotor de cobre metalotioneína de levedura. Transformamos a cepa de levedura mutante MCY1551 com: pTrSNF1 e pYSNF1, sendo que ambos os transformantes tiveram restabelecida a capacidade da levedura de crescer em glicerol, conforme mostrado na figura 18.

Desta maneira, demonstramos que o gene de *T. reesei* foi capaz de executar em *S. cerevisiae* as atividades catalíticas necessárias a desrepressão de genes necessários a metabolização de glicerol.

Uso do *TrSNF1*-Antisense para explorar a função de *TrSNF1* *in vivo*

Seria interessante definir os genes alvo, ou seja, a função fisiológica de *TrSNF1 in vivo*, verificando os efeitos de sua inibição na célula.

Figura 16: Esquema de construção do plasmídeo contendo a seqüência codificadora de *TrSNF1* de *T. reesei*, controlada pelo promotor de cobre metalotioneína de levedura. Os exons I e II foram obtidos a partir de segmentos amplificados por PCR, com oligonucleotídeos contendo sítios artificiais para enzimas de restrição nas extremidades 5'. No exon I: iniciador F1Eco, contendo o sítio para *EcoRI* e iniciador i1rHind, contendo o sítio para *HindIII*. No exon II: iniciador i1fHind contendo o sítio para *HindIII* e iniciador 418 que não possui sítio artificial para clivagem com Enzima de Restrição. Os exons I e II foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico clivados com *HindIII* (vide figura 17), purificados e ligados com T4DNA ligase (Life Technologies). Uma alíquota da reação de ligação foi submetida a amplificação por PCR utilizando os iniciadores F1Eco e i1rHind. O fragmento resultante foi purificado, clivado com *EcoRI* e *NheI*, e novamente purificado. Este fragmento foi então clonado entre os sítios de *EcoRI* e *NheI* do plasmídeo p4082 que contém a seqüência 3'do gene *TrSNF1*. Desta maneira foi possível descartar os introns I e II e aproveitar o clone de cDNA p4082, no qual o intron III já foi processado. O plasmídeo pTrSNF foi propagado, isolado e clivado com *EcoRI* e *KpnI* que flanqueiam o inserto e são derivados do sítio de múltiplas clonagens do plasmídeo original. O fragmento contendo toda a seqüência codificadora do gene sem os introns foi clonado entre os sítios de *EcoRI* e *KpnI* do plasmídeo pJN40.

A)

```

      490      500      510      520      530      540
GAGATTGAGT ACCTGCAGCT GCTGCGGCAC CCGCACATCA TCAAGCTGTA CGCTGGTTCC
                                     IIR snf hind
      550      560      570      580      590      600
TCGCCAATTC CTGTTACGCT AGGGCTTCTG ACTCTAACCG TTCGAGCAG TATACCGTCA
                                     IIR snf hind
      610      620      630      640      650      660
TCAAGACTCC GTCCGAAATC ATCATGGTGC TCGAGTACGC AGGCGGCGAG CTCTTCGACT

      670      680      690      700      710      720
ACATCGTCCA GAACGGCCGC ATGAAGGAGG CAGAGGCACG CCGCTTCTTC CAGCAGATGA

```

B)

```

           Ile   Lys   Leu   Tyr   Thr
           [ATC] [AAG] [CTT] [TAT] [ACC]
5' ATC [ATC] [AAG] [CTT] [TAT] [ACC] GTC ATC AAG ACT CCG TCC GAA ATC 3'
3' GAG CAG GCC GTG GGC GTG TAG TAG [TTC] [GAA] ATA TGG 5'

```

Figura 17 : Esquema das junções entre os exons I e II. Foi feita uma mutação sítio dirigida em uma posição que flanqueia o exon I na extremidade 3': a troca do códon CTG→CTT. Ambos codificando para Leucina. Entretanto esta troca cria um sítio de restrição para *HindIII*, o que proporciona uma perfeita ligação entre os exons I e II, desde que a extremidade 5' do exon II possui um sítio para *HindIII*.

Figura 18: Cultura de *S. cerevisiae* selvagem (W303) e mutante para *SNF1* (MCY1551) transformadas com os seguintes plasmídeos: pTrSNF1, contendo a sequência codificadora de *TrSNF1*; pYSNF1, contendo a sequência codificadora de SNF1 de *S. cerevisiae*; e pJN40, o vetor original que contém o promotor de cobre metalotioneína. Todas as células crescem em glicose, entretanto, somente as células da cepa selvagem e aquelas mutantes transformadas com pTrSNF1 são capazes de crescer em glicerol.

Como uma tentativa para explorar a função fisiológica de *TrSNF1* empregamos a estratégia de antisense. Vários trabalhos indicaram que SNF1 está envolvido na viabilidade celular (Tonukari et al., 2000; Enloe et al., 2000), por esta razão decidimos utilizar a abordagem de antisense ao invés da deleção do gene. Foi escolhido o promotor de *CBHI* o qual é induzido por celulose (El-Gogary et al., 1988; Urioste et al., 1989) e fortemente reprimido por glicose (Abrahão -Neto et al., 1994). Foi mostrado que este promotor é regulado pelo repressor CRE1, que é ortólogo de MIG1 de levedura (Takashima et al., 1996). Por esta razão a expressão do antisense sob o controle deste promotor seria autocontrolada. Isto é, a celulose induz a expressão do antisense que por sua vez bloqueia a expressão de *TrSNF1*. Desde que o repressor CRE1 provavelmente seja controlado por *TrSNF1* (Vautard-Mey et al., 1999), a expressão do antisense resultaria no aumento de CRE1 ativo (desfosforilado) que por sua vez reprime este promotor.

Construímos o plasmídeo pANTI-Snf (figura 19), conforme descrito em material e métodos. O plasmídeo foi utilizado para transformar células de *T. reesei* para a obtenção de transformantes estáveis, criando uma cepa denominada TrAnti1. Através de experimento de hibridação foi mostrado a presença de pANTI-Snf inserido aleatoriamente em múltiplas cópias no genoma do fungo (figura 20).

A cepa TrAnti responde de maneira diferente da cepa selvagem (QM9414) no que diz respeito a indução da expressão do gene celulolítico *CBHI*. Na figura 21 estão mostradas autoradiografias, resultantes de experimentos de "northern blot", onde a expressão do gene *CBHI* foi induzida por avicel (celulose microcristalina). Na cepa selvagem o transcrito de *CBHI* começa a aparecer após 19 horas de indução com avicel. Enquanto, na cepa atisense ocorreu um atraso na

Figura 19: Esquema da construção de pAnti, um plasmídeo de integração que expressa um antisense para *TrSNF1* em *T. reesei*. Um segmento de 1,0 kb do gene de *TrSNF1* foi amplificado por PCR com oligonucleotídeos que contêm sítios artificiais para enzimas de restrição nas extremidades 5': *snfanti5*, contendo um sítio de restrição para *Bam*HI e *snfanti 3*, contendo um sítio de restrição para *Sac*II. O segmento amplificado foi digerido com as enzimas indicadas e clonado direcionalmente invertido em um plasmídeo entre o promotor induzível de CBH1 e o terminador de *TRPC* de *A. nidulans*.

Figura 20: Mapeamento do cassete antisense no genoma da cepa TrAnti1 de *T. reesei*. A) esquema do mapa de restrição na cepa selvagem e TrAnti1, e da sonda utilizada no "Southern blot". B) autoradiografia mostrando que o clone selvagem (QM) possui as bandas de 1,4 kb e 4,0 kb, referentes a TrSNF1 e CBHI, respectivamente; enquanto o clone antisense (A) possui uma banda de 4,1 kb, referente a um segmento do cassete antisense contendo o promotor de *CBHI* em junção com o segmento de *SNF1*, além das bandas reconhecidas no clone selvagem.

Figura 21: Perfil de expressão do gene celulolítico *CBHI* induzido com avicel em diferentes cepas de *T. reesei*. Foram preparadas culturas de *T. reesei* selvagem (QM9414) e TrAnti1, e induzidas com avicel. Foram coletadas alíquotas de micélio após 13, 19 e 25 horas de indução. Preparações de RNA total foram feitas de cada uma das alíquotas. As autoradiografias mostradas são o resultado de experimentos de "northern blot". A) utilizando um segmento do gene celulolítico *CBHI* como sonda, podemos observar que o transcrito começa a aparecer após 19 horas de indução na cepa selvagem; enquanto na cepa TrAnti1 ocorreu um atraso no tempo de expressão. B) utilizando um segmento do gene constitutivo de actina podemos observar que a quantidade de RNA é semelhante em todos os tempos de indução.

expressão de *CBHI* pois, o transcrito só pôde ser observado 25 horas após a indução.

Isto mostra que a expressão do antisense retarda a expressão de *CBHI* (ver discussão).

Outra abordagem utilizada para verificar a habilidade de *TrSNF1* em controlar a transcrição de diversos genes, foi a tentativa de utilizar a tecnologia de matrizes de DNA. Visto que tínhamos disponível um banco de EST's de *T. reesei*, composto cerca de 1.200 seqüências de genes únicos elaborado pelo colega de doutoramento Felipe Chambergó Alcalde. Decidimos analisar o efeito do antisense sobre a expressão destes genes.

Desde que *TrSNF1* regula a expressão de genes controlados por glicose, decidimos analisar a expressão deste conjunto de genes nas seguintes condições:

- 1) Cepa selvagem QM9414, e TrAnti1: induzidas por celulose;
- 2) Cepa selvagem QM9414: crescida em glicose.

A elaboração das membranas com as matrizes de DNA, contendo 1.235 seqüências de genes diferentes bem como a hibridação das membranas, está descrita em material e métodos (figura 22).

A captura das imagens das autoradiografias foi realizada em um aparelho de varredura Scanjet 6100C (Hewlett Packard), e as imagens foram analisadas utilizando o programa ArrayVision 5.1 (Imaging Research Inc. – Ontário – Canadá).

Figura 22: Matrizes de DNA contendo EST's de genes únicos de *T. reesei*.

Foram preparadas 13 triplicatas de matrizes de DNA contendo um total de 1.235 EST's de genes únicos de *T. reesei*. Tais matrizes foram hibridadas com sondas complexas de cDNA marcadas com radioisótopos, derivadas de: cepa selvagem QM9414 crescida em glicose; cepa selvagem QM9414 induzida por avicel 15 horas; e cepa TrAnti1 induzida por avicel 15 horas. A esquerda das figuras estão indicadas as cepas e condições de cultura.

É possível observar diferenças na expressão de genes entre as triplicatas dependendo da cepa e da condição de cultura

A análise dos dados e a formação de conjuntos de genes com expressão semelhante foram feitas utilizando o programa Gene Cluster (Eisen et al., 1998), utilizando os seguintes parâmetros:

- filtro de dados = 80%, ou seja somente serão aceitos os genes com um mínimo de 80% de dados;
- os dados foram convertidos em Log_2 ;
- metodologia de agrupamento dos dados = “agrupamento hierarquico completo”;

A visualização gráfica dos resultados das análises bem como a estatística geral da expressão dos grupos de genes foi feita com o programa J-Express (<http://www.ii.uib.no/~bjarted/jexpress/install.html>).

Apesar da elaboração das matrizes ter sido realizada com 1.235 diferentes seqüências parciais de genes, após a captura das imagens e tratamentos matemáticos com os programas de computador indicados, restaram 972 genes na análise final. A figura 23 contém o resultado gráfico da análise das matrizes, mostrando a expressão dos genes em glicose, avicel e a cepa antisense crescida em avicel. O programa de computador analisa a expressão de cada gene conforme a intensidade marcada no filme de raios-X e define valores para os genes mais expressos e os menos expressos. Desta maneira é gerada uma tabela onde genes com características de expressão semelhantes em glicose, avicel e avicel-antisense são agrupados em uma estrutura ramificada. Os genes com características de expressão semelhantes estão mais próximos na estrutura do que aqueles com padrões de expressão diferentes.

Figura 23: Gráfico contendo dados analisados das matrizes de DNA. Programas de computador analisam as imagens das auto-radiografias e designam valores máximos e mínimos de expressão para os genes contidos na matriz. Então, genes com padrões de expressão semelhantes em glicose, QM-avicel e TrAnti1-avicel foram agrupados sob o dendograma a esquerda. Na figura colorida a direita, as cores têm os seguintes significados: preto = genes com níveis de expressão mediana; vermelho = genes com níveis de expressão maior; e verde = genes com níveis de expressão menores.

Então, os dados constantes da tabela contendo os genes estruturados são transformados em gráfico onde as cores pretas, verdes e vermelhas se referem a genes com expressão mediana, expressão abaixo da média e expressão acima da média, respectivamente (figura 23). Desta maneira é possível visualizar também um gráfico onde a expressão de cada um dos genes analisados é marcada em glicose, avicel e antisense-avicel.

O próprio programa de computador elabora e analisa os padrões de expressão das centenas de genes e cria uma linha de tendência visualizada em azul na figura 24.

Foi mostrada que a tendência da expressão dos 972 genes analisados segue um padrão. Em glicose a tendência é uma expressão mediana, em torno de zero; em avicel a tendência de expressão da maioria dos genes é ter uma expressão maior, em torno de 0,8; e finalmente, o clone TrAnti1 crescido em avicel tem uma expressão intermediária, em torno de 0,4.

Verificamos que existe diferença na tendência da expressão dos genes na presença de glicose e avicel, o que é esperado, pois:

- 1) um grupo de genes são expressos na presença de glicose, isto é induzidos por glicose;
- 2) um grupo de genes são expressos na ausência de glicose, isto é reprimidos por glicose;
- 3) um grupo de genes que são induzidos por avicel;

Portanto, a cepa TrAnti1 induzida por avicel apresenta um perfil de expressão distinto daquele mostrado nas outras duas condições. É possível que estejamos visualizando o efeito da expressão do antisense na expressão global dos 972 genes analisados. Em geral existe uma tendência de que os genes sejam mais expressos em avicel, e esta tendência é parcialmente revertida no clone antisense.

Figura 24: Gráfico contendo a análise de expressão de cada um dos genes da matriz de DNA. Cada linha representa a expressão de um gene da cepa selvagem crescendo em glicose ou avicel, e da cepa TrAnti1 crescendo em avicel. Note que o eixo Y do gráfico está numerado de -8,381 até 8,381. Estes números foram estipulados pelo programa de computador Cluster utilizado na análise dos dados e se referem ao menor e maior nível de expressão presente na matriz. A linha azul significa a tendência geral de expressão todos os 972 genes passíveis de análise nesta matriz. Note que a expressão destes genes em glicose é média, com valor zero; a expressão global destes genes na cepa selvagem crescida em avicel aumenta para valores em torno de 0,8; enquanto a expressão global dos genes analisados na cepa TrAnti1 crescida em avicel caem para cerca de 0,4.

Discussão

Uma subfamília de proteínas quinase serina treonina apresenta alta homologia entre as porções amino-terminais, com a parte carboxi-terminal pouco homóloga (Hardie et al., 1998). Com o objetivo de isolar um gene potencialmente relacionado a esta subfamília em *T. reesei*, nós desenhamos oligonucleotídeos degenerados para amplificar um segmento do gene através de PCR. Tais oligonucleotídeos foram desenhados a partir do alinhamento de seqüências de aminoácidos conservadas dentro do domínio catalítico de diversas enzimas pertencentes a esta subfamília (Hanks and Quinn, 1991). As seqüências dos oligonucleotídeos foram deduzidas das seqüências de aminoácidos presentes nos subdomínios de quinase VI, VIII e IX, mostrados na figura 4.

Os produtos da amplificação por PCR, utilizando os oligonucleotídeos degenerados, foram múltiplas bandas com diferentes tamanhos (figura 5A). Para identificar qual das bandas corresponderia ao gene em questão procedemos a uma análise por "Southern blot" dos produtos de amplificação, utilizando o oligonucleotídeo degenerado snfVIII. Este oligonucleotídeo, snfVIII, está localizado entre os iniciadores snfVI/snfIX e snfVI/snf1060, usados na amplificação (figura 5C). A autoradiografia mostrou uma banda única de tamanho esperado em cada amplificação (figura 5B).

O fragmento de DNA resultante da amplificação com os iniciadores snfVI e snf1060 que foi reconhecido pela sonda snfVIII, foi isolado e clonado em pMOSBlue. O seqüenciamento de diversos clones mostrou que na verdade foram isolados fragmentos de diferentes proteínas quinases. Entretanto, apenas um fragmento de 198 pb mostrou

homologia com *SNF1*. Este clone foi isolado e denominado pR5C. A análise da sequência do clone pR5C apresentou uma homologia de 71% e 95% de identidade ao nível de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente, com *SNF1* de *S. cerevisiae*.

Isolamento e organização do gene relacionado a SNF1

O clone pR5C foi utilizado como sonda para varredura de uma biblioteca genômica. Clones positivos foram mapeados com enzimas de restrição, e a banda reconhecida pela sonda pR5C foi subclonada em pBluescript e seqüenciada. Este clone denominado pEMJ2,1, é constituído por um fragmento de *BamHI* com 2.097 pb, que contém a sequência 5' não codificadora e a maior parte da sequência codificadora do gene.

Desde que pEMJ2,1 não cobre toda a sequência do gene, foi importante isolar outro clone que contivesse o restante 3' do gene. Como dispomos de uma biblioteca de cDNA de *T. reesei*, decidimos isolar a extremidade 3' do gene a partir dela. Esta abordagem foi adequada pois conseguimos completar a sequência do gene bem como identificar a posição de dois introns.

Utilizando como sonda o clone genômico pEMJ2,1 foi possível isolar um clone de cDNA denominado pTr4082, que contém toda a sequência 3' não traduzida, e se sobrepõe ao clone genômico pEMJ2,1, estando truncado 1.136 nucleotídeos a 5' desde o códon de terminação de tradução (figura 9).

Análises computacionais das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida, bem como a utilização de iniciadores específicos em conjunto com a técnica de PCR, proporcionaram a

localização de um terceiro intron na sequência codificadora do gene (figura 12).

A sequência de aminoácidos da proteína foi deduzida e apresenta homologia ao nível de estrutura primária (figura 13) e terciária (figura 11) com outras proteínas serina-treonina quinase da mesma subfamília.

O gene homólogo a *SNF1* cuja sequência foi isolada e caracterizada em *T. reesei* foi denominado *TrSNF1*.

Para determinar o número de cópias de *TrSNF1* no genoma de *T. reesei*, realizamos um experimento de "Southern blot" onde o DNA de *T. reesei* foi clivado com as enzimas de restrição *BamHI*, *ScaI* e *BamHI+ScaI*, e hibridado com uma sonda de 772 pb que se sobrepõe ao sítio de *ScaI*, conforme a figura 15. A autoradiografia mostrou uma banda única na digestão com *BamHI*, dois fragmentos na digestão com *ScaI* e dois fragmentos na digestão dupla com *BamHI+ScaI*. O padrão de restrição sugere a presença de uma cópia única de *TrSNF1* no genoma de *T. reesei*. A presença de bandas com hibridação fraca, que podem ser observadas na figura 15, indicam a presença de outras sequências estreitamente relacionadas com *TrSNF1*, possivelmente outras proteínas quinase, em *T. reesei*. O que é corroborado pelo fato de que foram identificadas outras proteínas quinase quando do isolamento do clone pR5C.

Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos deduzida de *TrSNF1*

A análise da sequência do clone de cDNA pTr4082, do clone genômico pEMJ2,1, bem como dos produtos de PCR utilizando mRNA ou DNA genômico como moldes, mostraram que a sequência de *TrSNF1* é interrompida por três introns. Estes introns consistem em sequências

de 71 pb, 102 pb e 82 pb, com uma sequência aberta de leitura que codifica para 692 aminoácidos. Cada um dos introns estão flanqueados por sinais de processamento de introns "GT" e "AG", na extremidade 5' e 3', respectivamente.

Comparações da sequência putativa de aminoácidos de TrSNF1 com membros das proteínas quinase ativada por AMP e relacionadas a SNF1, incluindo levedura (Celenza e Carlson, 1986), rato (Carling et al., 1994) e planta (Alderson et al., 1991), revelaram que o segmento amino-terminal, do aminoácido 65 até 313 da proteína de *T. reesei*, é muito similar aos membros da mesma subfamília de enzimas (figura 13). É conhecido que a porção amino-terminal contém o domínio catalítico das proteínas serina-treonina quinase (Hanks e Quinn, 1991).

Treze resíduos contíguos de histidina próximos ao amino-terminal de *SNF1* de *S. cerevisiae*, estão ausentes em TrSNF1, bem como nas outras proteínas da mesma subfamília. Foi verificado que estes resíduos de histidina não são requeridos para a função de *SNF1* em levedura (Celenza e Carlson, 1989).

Outras similaridades foram encontradas entre a proteína putativa TrSNF1 e outras quinases da mesma subfamília. Uma das características marcantes nestas proteínas é a presença de um resíduo de treonina localizado no segmento de ativação (Johnson et al., 1996), e situado entre os motivos conservados Asp-Phe-Gly (DFG) e Ala-Pro-Glu (APE). O resíduo de treonina-172 é o principal sítio de fosforilação que sinaliza para a ativação de AMPK (Hawley et al., 1996) e é essencial para a função de *SNF1 in vivo* (Estruch et al., 1996). Este resíduo de treonina, localizado no segmento de ativação é encontrado na proteína deduzida de *T. reesei*, altamente

conservado. A presença deste sítio de fosforilação indica que, assim como SNF1 e AMPK (Estruch et al., 1992; Hawley et al., 1996), a atividade de TrSNF1 pode ser modulada por fosforilação.

Identificação do início de transcrição

O sítio de início de transcrição de TrSNF1 foi determinado com o objetivo de facilitar a construção de um vetor de expressão para a análise funcional do gene em células de levedura (figura 14). Os estudos de experimentos de extensão de iniciador mostraram uma banda principal localizada 49 pb a jusante do primeiro códon de iniciação ATG. Uma segunda banda foi observada 162 pb a montante do principal sítio de início de transcrição. Neste caso, localizado 33 pb a jusante do segundo códon de iniciação ATG. Se ambos os sítios de início de transcrição forem ativos *in vivo*, duas cadeias de polipeptídeos diferentes seriam produzidas, uma delas 48 aminoácidos menor do que a outra. Surpreendentemente, os primeiros 64 aminoácidos não possuem homologia significativa entre as outras proteínas serina-treonina quinases (figura 13). De fato, um curto segmento na extremidade amino-terminal não é conservado entre aquelas proteínas.

Análise funcional de TrSNF1 em *S. cerevisiae*

Para determinar se o produto de *TrSNF1* é funcionalmente homólogo a proteína quinase SNF1 de levedura, nós examinamos a habilidade de TrSNF1 em restaurar a atividade em uma cepa de *S. cerevisiae* mutante para *SNF1*. A cepa de *S. cerevisiae* que carrega a deleção para *SNF1* não consegue utilizar substratos como sacarose, glicerol e etanol como únicas fontes de carbono (Carlson, 1998). A cepa de levedura denominada MCY1551 carrega a mutação por deleção de *SNF1* (Celenza e Carlson, 1986) foi transformada com o plasmídeo

pTrSNF1 (figura 16). Este plasmídeo contém o gene de *TrSNF1* controlado pelo promotor de cobre metalotioneína (Geitz e Sugino, 1988). A sequência codificadora utilizada é iniciada pelo segundo códon de iniciação ATG. A figura 18 mostra que as células mutantes (MCY1551) transformadas com pTrSNF1 cresceram no meio de cultura contendo glicerol como única fonte de carbono. As células mutantes transformadas apenas com o plasmídeo pJN40 não cresceram, sob as mesmas condições. Enquanto as células mutantes transformadas com pYSNF1, no qual a sequência codificadora de *SNF1* de *S. cerevisiae* está sob o controle do promotor de cobre metalotioneína, cresceram em glicerol, bem como as células selvagens, W303-1A. Estes resultados mostram que *TrSNF1* complementou a mutação em *SNF1* de levedura, portanto, realiza as mesmas funções *in vivo* do gene original de *S. cerevisiae*.

Além disso, desde que o plasmídeo pTrSNF1 tem a sequência transcrita iniciada no segundo ATG (vide figura 12), é possível afirmar que assim como em *SNF1* de *S. cerevisiae* (Estruch et al., 1992), a extremidade amino terminal de *TrSNF1* não é essencial para a função do gene.

Efeito da expressão do antisense de *TrSNF1*

Na tentativa de determinar os genes alvo cuja expressão é controlada por *TrSNF*, construímos o plasmídeo pAntiSNF, o qual contém um segmento de 967 pb da sequência codificadora de *TrSNF*, clonado invertido sob o controle do promotor induzido por celulose e reprimido por glicose denominado *CBHI*, usando o terminador do gene *TRPC* de *A. nidulans*, mostrado na figura 19. Outro plasmídeo utilizado no experimento, para a seleção dos transformantes, foi pCSN43 (Cullen et al., 1987), que contém o gene *HPH* (higromicina

fosfotrasferase) sob controle do promotor do gene *TRPC* de *A. nidulans*. Este plasmídeo contém, também, o terminador de *TRPC*.

Protoplastos de *T. reesei* foram co-transformados com pAntiSNFe pCSN43, por biobalística, e transformantes estáveis foram isolados. A presença do cassete antisense foi confirmada nos clones isolados a partir de análises por "Southern blot".

Análises por "northern blot" mostraram que a presença do antisense causou um perfil de expressão alterado do gene celulolítico *CBHI* (figura 21). Podemos observar claramente um atraso na expressão de *CBHI* no clone TrAnti, quando comparado a cepa selvagem.

O efeito do antisense sobre o transcrito alvo (o mRNA sense) pode ser devido a vários mecanismos:

- 1) a instabilidade do duplex antisense/mRNA;
- 2) o bloqueio da tradução pela hibridação antisense/mRNA;
- 3) Interferência no processo de transcrição.

É importante notar que a expressão deste antisense resulta, por qualquer que seja o mecanismo descrito, na diminuição do nível de expressão de *TrSNF1*. Como resultado deste efeito CRE1 deixaria de ser fosforilado, continuando a ser localizado no núcleo, reprimindo seus genes alvo.

É importante notar também, que a expressão do antisense neste experimento é controlada pelo promotor de *CBHI*, que é regulado por CRE1. A escolha deste promotor permite que a expressão do antisense seja autoregulada, pois a sua expressão reprime a sua própria transcrição. Desta maneira podemos analisar o efeito da

expressão transiente do antisense dentro da célula. O gene *CBHI* é um componente do sistema celulolítico de *T. reesei*, induzido por celulose e reprimido por glicose. Cujas repressão é controlada por CRE1. Então, o atraso da expressão do transcrito de *CBHI* é devido a expressão do antisense TrSNF1 induzida por celulose.

Além disso, fizemos uma tentativa de utilizar matrizes de DNA ("macroarrays") para identificar genes com expressão regulada por *TrSNF1*. Foram preparadas, em triplicata, 13 membranas de náilon contendo um total de 1.235 segmentos de genes únicos. Para obter mRNA em diferentes condições fisiológicas do fungo, preparamos culturas de *T. reesei* assim denominadas:

- Glicose: Cepa selvagem (QM9414) crescida em glicose;
- Avicel: Cepa selvagem (QM9414) induzida com avicel (celulose microcristalina);
- Antisense: Cepa TrAnti1 induzida com avicel (celulose microcristalina).

Isolamos mRNA e preparamos sondas complexas de cDNA marcado com α -P³² dCTP. Hibridamos cada lote de treze membranas com as sondas derivadas de cada uma das três diferentes culturas de fungo (figura 22). As imagens foram analisadas e as tabelas de dados utilizadas para gerar gráficos.

Desta maneira pudemos obter resultados preliminares que mostram uma tendência geral de uma menor expressão gênica em glicose do que em avicel (figura 24). Fato compreensível, desde que muitos genes devem ser desreprimidos para que o organismo possa utilizar fontes de carbono alternativas. Além disso, no mesmo gráfico, podemos observar uma tendência do clone antisense em possuir

níveis de expressão menores do que o clone selvagem induzido com avicel, apesar do antisense ter sido submetido as mesmas condições de cultura. Estes resultados podem sugerir que no clone AntiSNF1 possui uma expressão global menor do que o clone selvagem devido a falha na desrepressão de genes reprimidos por glicose.

É importante salientar que os resultados obtidos a partir das matrizes de DNA são preliminares e necessitam repetições mais controladas. Entretanto, estes resultados alcançaram o propósito de estabelecer metodologias de análise de matrizes de DNA no laboratório, bem como verificar a tendência da expressão global de genes quando o fungo é crescido em glicose e celulose. A abordagem de “macroarrays” foi abandonada e passamos agora a utilizar a tecnologia de “microarrays”.

Portanto, neste trabalho nós isolamos e caracterizamos o gene de TrSNF1. Que foi utilizado, com sucesso, na complementação de uma cepa de *S. cerevisiae* deletada de *SNF1*. Além disso foi possível observar que na cepa antisense de TrSNF1 existe uma tendência global de expressão diferente da cepa selvagem QM9414.

Bibliografia

- Abrahao-Neto, J., C. H. Rossini, S. El-Gogary, F. Henrique-Silva, O. Crivellaro, and H. El-Dorry. 1995. Mitochondrial functions mediate cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*. *Biochemistry* 34:10456-10462.
- Alderson, A., P. A. Sabelli, J. R. Dickinson, D. Cole, M. Richardson, M. Kreis, P. R. Shewry, and N. G. Halford. 1991. Complementation of *snf1*, a mutation affecting global regulation of carbon metabolism in yeast, by a plant protein kinase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:8602-8605.
- Andren RK, Erickson RJ, Medeiros JE. 1976. Cellulosic substrates for enzymatic saccharification. *Biotechnol Bioeng Symp.*(6):177-203.
- Beg ZH, Allmann DW, Gibson DM. 1973. Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*54:1362-69
- Beg ZH, Stonik JA, Brewer HB Jr. 1978. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: regulation of enzymatic activity by phosphorylation and dephosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (8):3678-82.
- Brown MS, Brunschede GY, Goldstein JL.1975. Inactivation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in vitro. An adenine nucleotide-dependent reaction catalyzed by a factor in human fibroblasts. *J Biol Chem.* 250(7):2502-9.
- Carle-Urioste, J. C., J. Escobar-Vera, S. El-Gogary, F. Henrique-Silva, E. Torigoi, O. Crivellaro, A. Herrera-Estrella, and H. El-Dorry. 1997. Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *J. Biol. Chem.* 272:10169-10174.

- Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. 1989. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem.* 186(1-2):129-36.
- Carling D, Zammit VA, Hardie DG. 1987. A common bicyclic protein kinase cascade inactivates the regulatory enzymes of fatty acid and cholesterol biosynthesis. *FEBS Lett.* 223(2):217-22.
- Carling, D., K. Aguan, A. Woods, A. J. Verhoeven, R. K. Beri, C. H. Brennan, C. Sidebottom, M. D. Davison, and J. Scott. 1994. Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism. *J. Biol. Chem.* 269:11442-11448.
- Carlson CA, Kim KH. 1973. Regulation of hepatic acetyl coenzyme A carboxylase by phosphorylation and dephosphorylation. *J. Biol. Chem.* 248:378-80
- Carlson, M. 1998. Regulation of glucose utilization in yeast. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8:560-564.
- Carlson, M. 1999. Glucose repression in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2:202-207.
- Carlson, M. and D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28:145-154.
- Carlson, M., B. C. Osmond, and D. Botstein. 1981. Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* 98:25-40.
- Carlson, M., B. C. Osmond, L. Neigeborn, and D. Botstein. 1984. A suppressor of SNF1 mutations causes constitutive high-level invertase synthesis in yeast. *Genetics* 107:19-32.
- Carraro, D. M., J. R. Ferreira Junior, R. Schumacher, G. G. Pereira, C. P. Hollenberg, and H. El-Dorry. 1998. A region of the

cellobiohydrolase I promoter from the filamentous fungus *Trichoderma reesei* mediates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*, dependent on mitochondrial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253:407-414.

- Celenza, J. L. and M. Carlson. 1984. Cloning and genetic mapping of SNF1, a gene required for expression of glucose-repressible genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4:49-53.
- Celenza, J. L. and M. Carlson. 1984. Structure and expression of the SNF1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4:54-60.
- Celenza, J. L. and M. Carlson. 1986. A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science* 233:1175-1180.
- Celenza, J. L. and M. Carlson. 1989. Mutational analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 protein kinase and evidence for functional interaction with the SNF4 protein. *Mol. Cell Biol.* 9:5034-5044.
- Celenza, J. L., F. J. Eng, and M. Carlson. 1989. Molecular analysis of the SNF4 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for physical association of the SNF4 protein with the SNF1 protein kinase. *Mol. Cell Biol.* 9:5045-5054.
- Cereghino GP, Scheffler IE. 1996. Genetic analysis of glucose regulation in *saccharomyces cerevisiae*: control of transcription versus mRNA turnover. *EMBO J.* 15(2):363-74.
- Chet I, Inbar J. 1994. Biological control of fungal pathogens. *Appl Biochem Biotechnol.* 48(1):37-43. Review.
- Chet, I. 1997. Lectins and biocontrol. *Crit Rev Biotechnol.* 1-20. Review
- Conaway RC, Conaway JW. 1993. General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem.* 62:161-90. Review.

- Cullen D, Leong SA, Wilson LJ, Henner DJ. 1987. Transformation of *Aspergillus nidulans* with the hygromycin-resistance gene, hph. *Gene*. 57(1):21-6.
- Davies SP, Hawley SA, Woods A, Carling D, Haystead TA, Hardie DG. 1994. Purification of the AMP-activated protein kinase on ATP-gamma-sepharose and analysis of its subunit structure. *Eur J Biochem*. 223(2):351-7.
- Davies, J. P., F. H. Yildiz, and A. R. Grossman. 1999. Sac3, an Snf1-like serine/threonine kinase that positively and negatively regulates the responses of *Chlamydomonas* to sulfur limitation. *Plant Cell* 11:1179-1190.
- DeVit, M. J. and M. Johnston. 1999. The nuclear exportin msn5 is required for nuclear export of the mig1 glucose repressor of *saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Biol*. 9:1231-1241.
- Divne C, Stahlberg J, Reinikainen T, Ruohonen L, Pettersson G, Knowles JK, Teeri TT, Jones TA. 1994. The three-dimensional crystal structure of the catalytic core of cellobiohydrolase I from *Trichoderma reesei*. *Science* 265(5171):524-8.
- Dombek, K. M., V. Voronkova, A. Raney, and E. T. Young. 1999. Functional analysis of the yeast Glc7-binding protein Reg1 identifies a protein phosphatase type 1-binding motif as essential for repression of ADH2 expression. *Mol. Cell Biol*. 19:6029-6040.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(25):14863-8.
- Erickson, J. R. and M. Johnston. 1993. Genetic and molecular characterization of GAL83: its interaction and similarities with other genes involved in glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 135:655-664.
- Eriksson KE. 1981. Cellulases of fungi. *Basic Life Sci*. 18:19-32.

- Estruch F, Carlson M. 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 13(7):3872-81
- Estruch, F. and M. Carlson. 1990. Increased dosage of the MSN1 gene restores invertase expression in yeast mutants defective in the SNF1 protein kinase. *Nucleic. Acids. Res.* 18:6959-6964.
- Estruch, F. and M. Carlson. 1993. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 13:3872-3881.
- Estruch, F., M. A. Treitel, X. Yang, and M. Carlson. 1992. N-terminal mutations modulate yeast SNF1 protein kinase function. *Genetics* 132:639-650.
- Feilotter, H., P. Nurse, and P. G. Young. 1991. Genetic and molecular analysis of *cdr1/nim1* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 127:309-318.
- Ferrer A, Caelles C, Massot N, Hegardt FG. 1987. Allosteric activation of rat liver microsomal [hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH)]kinase by nucleoside phosphates. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 368(3):249-57
- Foretz, M., D. Carling, C. Guichard, P. Ferre, and F. Foufelle. 1998. AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 273:14767-14771.
- Frederick, D. L. and K. Tatchell. 1996. The REG2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a type 1 protein phosphatase-binding protein that functions with Reg1p and the Snf1 protein kinase to regulate growth. *Mol. Cell Biol.* 16:2922-2931.

- Gancedo, J. M. 1998. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:334-361.
- Gao, G., C. S. Fernandez, D. Stapleton, A. S. Auster, J. Widmer, J. R. Dyck, B. E. Kemp, and L. A. Witters. 1996. Non-catalytic beta- and gamma-subunit isoforms of the 5'-AMP-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* 271:8675-8681.
- Gao, G., J. Widmer, D. Stapleton, T. Teh, T. Cox, B. E. Kemp, and L. A. Witters. 1995. Catalytic subunits of the porcine and rat 5'-AMP-activated protein kinase are members of the SNF1 protein kinase family. *Biochim. Biophys. Acta* 1266:73-82.
- Gietz, R. D., Sugino, A., 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* 74, 527-534.
- Godfrey MI, Van Winkle DH. Surface-tension-gradient-induced flow in freely suspended liquid crystalline films. 1996. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 3752-3764.
- Guex, N. and Peitsch, M. C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.
- Hanks, S. and A.M. Quinn. , 1991. Protein kinase catalytic domain sequence database: Identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods in Enzymology* 200, 38-62.
- Hannappel U, Vicente-Carbajosa J, Barker JH, Shewry PR, Halford NG. 1995. Differential expression of two barley SNF1-related protein kinase genes. *Plant Mol Biol.* 27(6):1235-40
- Hardie DG. 1989. Protein phosphorylation and dephosphorylation. *Curr Opin Cell Biol.* 220-6. Review.
- Hardie, D. G. 1999. Roles of the AMP-activated/SNF1 protein kinase family in the response to cellular stress. *Biochem. Soc. Symp.* 64:13-27:13-27.

- Hardie, D. G. and D. Carling. 1997. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur. J. Biochem.* 246:259-273.
- Hardie, D. G., D. Carling, and M. Carlson. 1998. The AMP-activated/SNF1 protein kinase subfamily: metabolic sensors of the eukaryotic cell? *Annu. Rev. Biochem.* 67:821-55:821-855.
- Hardie, D. G., D. Carling, and N. Halford. 1994. Roles of the Snf1/Rkin1/AMP-activated protein kinase family in the response to environmental and nutritional stress. *Semin. Cell Biol.* 5:409-416.
- Hardy, T. A., D. Huang, and P. J. Roach. 1994. Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269:27907-27913.
- Hawley SA, Davison M, Woods A, Davies SP, Beri RK, Carling D, Hardie DG. 1996. Characterization of the AMP-activated protein kinase kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 271(44):27879-87
- Henrique-Silva, F., S. El-Gogary, J. C. Carle-Urioste, E. Matheucci,Jr., O. Crivellaro, and H. El-Dorry. 1996. Two regulatory regions controlling basal and cellulose-induced expression of the gene encoding cellobiohydrolase I of *Trichoderma reesei* are adjacent to its TATA box. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228:229-237.
- Hidaka,H., Inagaki,M., Kawamoto,S. and Sasaki,Y. 1984. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23 (21), 5036-5041.

- Hisamoto, N., et al. 1994. The Glc7 type 1 protein phosphatase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for cell cycle progression in G2/M. *Mol Cell Biol* 14:3158-3165
- Ilmen M, Thrane C, Penttila M. 1996. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form. *Mol Gen Genet*.251(4):451-60
- Jiang YW, Veschambre P, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Conaway JW, Conaway RC, Kornberg RD. 1998. Mammalian mediator of transcriptional regulation and its possible role as an end-point of signal transduction pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95(15):8538-43
- Jiang, R. and M. Carlson. 1996. Glucose regulates protein interactions within the yeast SNF1 protein kinase complex. *Genes Dev*. 10:3105-3115.
- Jiang, R. and M. Carlson. 1997. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell Biol*. 17:2099-2106.
- Johnson, LN, Noble, MEM, Owen, DJ. 1996. Active and inactive Protein Kinases: Structural Basis for Regulation. *Cell* 85: 149-158.
- Johnston, M., J. S. Flick, and T. Pexton. 1994. Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol*. 14:3834-3841.
- Keith ML, Rodwell VW, Rogers DH, Rudney H. 1979. In vitro phosphorylation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: analysis of ³²P-labeled, inactivated enzyme. *Biochem Biophys Res Commun*.90(3):969-75.

- Koleske AJ, Young RA. 1994. An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators. *Nature*. 368(6470):466-9.
- Kuchin S, Treich I, Carlson M. 2000. A regulatory shortcut between the Snf1 protein kinase and RNA polymerase II holoenzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(14):7916-20
- Lafuente MJ, Gancedo C, Jauniaux JC, Gancedo JM. 2000. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 35(1):161-72
- Le Guen, L., M. Thomas, M. Bianchi, N. G. Halford, and M. Kreis. 1992. Structure and expression of a gene from *Arabidopsis thaliana* encoding a protein related to SNF1 protein kinase. *Gene* 120:249-254.
- Lesage, P., X. Yang, and M. Carlson. 1994. Analysis of the SIP3 protein identified in a two-hybrid screen for interaction with the SNF1 protein kinase. *Nucleic. Acids. Res*. 22:597-603.
- Lesage, P., X. Yang, and M. Carlson. 1996. Yeast SNF1 protein kinase interacts with SIP4, a C6 zinc cluster transcriptional activator: a new role for SNF1 in the glucose response. *Mol. Cell Biol*. 16:1921-1928.
- Levin,D.E. and Bishop,J.M. 1990. A putative protein kinase gene (kin1+) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 87 (21), 8272-8276
- Levin,D.E., Hammond,C.I., Ralston,R.O. and Bishop,J.M. 1987. Two yeast genes that encode unusual protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 84 (17), 6035-6039.
- Ludin, K., R. Jiang, and M. Carlson. 1998. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 95:6245-6250.

- Lundin M, Nehlin JO, Ronne H. 1994. Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol.* 14(3):1979-85
- Makoto, Takano, Kajiya-Kanegae H, Funatsuki H, Kikuchi S. 1998. Rice has two distinct classes of protein kinase genes related to SNF1 of *Saccharomyces cerevisiae*, which are differently regulated in early seed development. *Mol. Gen. Genet.* 260: 388-394
- Man, A. L., P. C. Purcell, U. Hannappel, and N. G. Halford. 1997. Potato SNF1-related protein kinase: molecular cloning, expression analysis and peptide kinase activity measurements. *Plant Mol. Biol.* 34:31-43.
- Montenecourt BS, Eveleigh DE. 1977. Preparation of mutants of *Trichoderma reesei* with enhanced cellulase production. *Appl Environ Microbiol.* 34(6):777-82.
- Muranaka, T., H. Banno, and Y. Machida. 1994. Characterization of tobacco protein kinase NPK5, a homolog of *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 that constitutively activates expression of the glucose-repressible SUC2 gene for a secreted invertase of *S. cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 14:2958-2965.
- Nehlin JO, Carlberg M, Ronne H. 1992. Yeast SKO1 gene encodes a bZIP protein that binds to the CRE motif and acts as a repressor of transcription. *Nucleic Acids Res.* 20(20):5271-8
- Neigeborn, L. and M. Carlson. 1984. Genes affecting the regulation of SUC2 gene expression by glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 108:845-858.
- Nyyssonen E, Penttila M, Harkki A, Saloheimo A, Knowles JK, Keranen S. 1993. Efficient production of antibody fragments by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Biotechnology (N Y).* 11(5):591-5.

- Ohba H., Steward N., Kawasaki S., Berberich T., Ikeda Y., Koizumi N., Kusano T., Sano H. 2000. Diverse response of rice and maize genes encoding homologs of WPK4, and SNF1-related protein kinase from wheat, to light, nutrients, low temperature and cytokinins. *Mol Gen Genet*;263(2):359-66
- Ostling, J., M. Carlberg, and H. Ronne. 1996. Functional domains in the Mig1 repressor. *Mol. Cell Biol.* 16:753-761.
- Ozcan S, Dover J, Johnston M. 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 17(9):2566-73.
- Ozcan S, Johnston M. 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol.* 15(3):1564-72.
- Pallier, C., M. Valens, V. Puzos, H. Fukuhara, G. Cheret, F. Sor, and M. Bolotin-Fukuhara. 1993. DNA sequence analysis of a 17 kb fragment of yeast chromosome XI physically localizes the MRB1 gene and reveals eight new open reading frames, including a homologue of the KIN1/KIN2 and SNF1 protein kinases. *Yeast.* 9:1149-1155.
- Peitsch, M. C. (1995). Protein modeling by E-mail. *Bio/Technology* 13,658-660.
- Peitsch, M. C. (1996). ProMod and Swiss-Model: Internet-based tools for automated comparative protein modelling. *Biochem Soc Trans* 24:274-279.
- Petter, R. and K. J. Kwon-Chung. 1996. Disruption of the SNF1 gene abolishes maltose utilization in the pathogenic yeast *Candida glabrata*. *Infect. Immun.* 64:5269-5273.
- Petter, R., Y. C. Chang, and K. J. Kwon-Chung. 1997. A gene homologous to *Saccharomyces cerevisiae* SNF1 appears to be

essential for the viability of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 65:4909-4917.

- Poyton RO, Dagsgaard CJ. 2000. Mitochondrial-nuclear crosstalk is involved in oxygen-regulated gene expression in yeast. *Adv Exp Med Biol* 475:177-84.
- Randez-Gil F, Herrero P, Sanz P, Prieto JA, Moreno F. 1998. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 425(3):475-8.
- Randez-Gil F, Sanz P, Entian KD, Prieto JA. 1998. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol.* 18(5):2940-8.
- Ronne H.. 1995. Glucose repression in fungi. *Trends Genet.* 11(1):12-7. Review.
- Rouvinen J, Bergfors T, Teeri T, Knowles JK, Jones TA. 1990. Three-dimensional structure of cellobiohydrolase II from *Trichoderma reesei*. *Science.* 249(4967):380-6.
- Saloheimo A, Aro N, Ilmen M, Penttilä M. 2000. Isolation of the *ace1* gene encoding a Cys(2)-His(2) transcription factor involved in regulation of activity of the cellulase promoter *cbh1* of *Trichoderma reesei*. *J Biol Chem.* 275(8):5817-25.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sano, H. and S. Youssefian. 1994. Light and nutritional regulation of transcripts encoding a wheat protein kinase homolog is mediated by cytokinins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:2582-2586.
- Smith FC, Davies SP, Wilson WA, Carling D, Hardie DG. 1999. The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in

- vitro at four sites within or near regulatory domain 1. FEBS Lett. 453(1-2):219-23.
- Smith, C.M., I.N. Shindyalov, S. Veretnik, M. Gribskov, S.S. Taylor, L.F. Ten Eyck, P.E. Bourne. 1997. The Protein Kinase Resource. TIBS Vol. 22, no. 11, p. 444-446
 - Smith, F. C., S. P. Davies, W. A. Wilson, D. Carling, and D. G. Hardie. 1999. The SNF1 kinase complex from *Saccharomyces cerevisiae* phosphorylates the transcriptional repressor protein Mig1p in vitro at four sites within or near regulatory domain 1. FEBS Lett. 453:219-223.
 - Stapleton, D., G. Gao, B. J. Michell, J. Widmer, K. Mitchelhill, T. Teh, C. M. House, L. A. Witters, and B. E. Kemp. 1994. Mammalian 5'-AMP-activated protein kinase non-catalytic subunits are homologs of proteins that interact with yeast Snf1 protein kinase. J. Biol. Chem. 269:29343-29346.
 - Sugden, C., P. G. Donaghy, N. G. Halford, and D. G. Hardie. 1999. Two SNF1-related protein kinases from spinach leaf phosphorylate and inactivate 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, nitrate reductase, and sucrose phosphate synthase in vitro. Plant Physiol. 120:257-274.
 - Sugden, C., R. M. Crawford, N. G. Halford, and D. G. Hardie. 1999. Regulation of spinach SNF1-related (SnRK1) kinases by protein kinases and phosphatases is associated with phosphorylation of the T loop and is regulated by 5'-AMP [In Process Citation]. Plant J. 19:433-439.
 - Takashima S, Iikura H, Nakamura A, Masaki H, Uozumi T. 1996. Analysis of Cre1 binding sites in the *Trichoderma reesei* cbh1 upstream region. FEMS Microbiol Lett 145(3):361-6
 - Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD.. 2000. The *Cochliobolus carbonum* SNF1 gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize. Plant Cell. 12(2):237-48.

- Toroser D., Plaut Z., Huber SC. 2000. Regulation of a plant SNF1-related protein kinase by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol* 2000 May;123(1):403-12
- Treitel MA, Carlson M. 1995. Repression by SSN6-TUP1 is directed by MIG1, a repressor/activator protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92(8):3132-6
- Treitel, M. A., S. Kuchin, and M. Carlson. 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol*. 18:6273-6280.
- Trumbly, R. J. 1992. Glucose repression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol*. 6:15-21.
- Tu, J. and M. Carlson. 1995. REG1 binds to protein phosphatase type 1 and regulates glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 14:5939-5946.
- Vautard-Mey G, Cotton P, Fevre M. 1999. Expression and compartmentation of the glucose repressor CRE1 from the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Biochem*. 266(1):252-9
- Weekes J, Hawley SA, Corton J, Shugar D, Hardie DG. 1994. Activation of rat liver AMP-activated protein kinase by kinase kinase in a purified, reconstituted system. Effects of AMP and AMP analogues. *Eur J Biochem*. 219(3):751-7.
- Wright, R. M. and R. O. Poyton. 1990. Release of two *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome genes, COX6 and CYC1, from glucose repression requires the SNF1 and SSN6 gene products. *Mol. Cell Biol*. 10:1297-1300.
- Wu J, Trumbly RJ. 1998. Multiple regulatory proteins mediate repression and activation by interaction with the yeast Mig1 binding site. *Yeast*. 14(11):985-1000.
- Yeh LA, Lee KH, Kim KH. 1980. Regulation of rat liver acetyl-CoA carboxylase. Regulation of phosphorylation and inactivation

of acetyl-CoA carboxylase by the adenylate energy charge. J Biol Chem. 255(6):2308-14.

- Zeillinger S, Galhaup C, Payer K, Woo SL, Mach RL, Fekete C, Lorito M, Kubicek CP. 1999. Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichoderma harzianum* with its host. Fungal Genet Biol. 26(2):131-40