

DETERMINAÇÃO DO PROMOTOR MÍNIMO DO GENE *gsn* DE *Neurospora crassa*. Flávia Magazoni Gonçalves*, Maria Célia Bertolini, Fernanda Zanolli Freitas – Bioquímica - Farmácia-Bioquímica - Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química – Instituto de Química – Campus de Araraquara.

O glicogênio é a principal forma de armazenamento de carboidratos em diferentes tipos de células e seu metabolismo é controlado por um sistema regulatório complexo, que mostrou ser mediado principalmente por alterações rápidas e reversíveis nas atividades das enzimas glicogênio sintase e glicogênio fosforilase. A glicogênio sintase é uma enzima altamente regulada, sofrendo controle pós-traducional via fosforilação multi-sítios e também modulação alostérica.

Entre os microrganismos a glicogênio sintase de *Saccharomyces cerevisiae* é a melhor estudada, sendo dois os genes da glicogênio sintase de levedura, o gene *GSY1* e o gene *GSY2*. Em *Neurospora crassa* apenas um cDNA *gsn* foi isolado, o qual codifica a proteína GSN (de PAULA *et al.*, 2002). Em situações estressantes como choque térmico, enquanto os níveis de glicogênio em *N. crassa* encontram-se drasticamente reduzidos, em *S. cerevisiae* os mesmos encontram-se aumentados. NI & LAPORTE (1995) demonstraram que nas células de levedura, o aumento dos níveis de glicogênio observado durante o choque térmico é acompanhado por um aumento dos níveis do mRNA *GSY2*, o qual é determinado pela presença de elementos STREs (STress Responsive Elements) na região promotora do gene. Os STREs são elementos regulatórios *cis* presentes nos promotores de genes responsivos a várias condições estressantes (MARTINEZ-PASTOR *et al.*, 1996). O gene *gsn* de *N. crassa* isolado em nosso laboratório contém dois destes elementos (STRE1 e STRE2) na sua região promotora, estando um deles localizado dentro de um *intron* (STRE2) contido na região 5'-UTR do gene. Embora os resultados observados durante o choque térmico sejam diferentes dos apresentados em leveduras, resultados obtidos a partir de ensaios de retardamento em gel (EMSA), usando as regiões do promotor *gsn* contendo os elementos STRE sugerem fortemente o envolvimento destes elementos na regulação da expressão do gene *gsn* na referida situação de estresse (FREITAS & BERTOLINI, 2004).

O principal objetivo deste trabalho é determinar o promotor mínimo do gene *gsn* e com isto, investigar quais são as principais regiões do promotor *gsn* envolvidas na regulação da transcrição do gene. Para isso, foram realizadas construções plasmidiais no vetor pBARGEM7-2 a partir do clone IV9A-1 (o qual carrega a sequência nucleotídica inteira do gene *gsn*), contendo diferentes combinações de deleções de sequências nucleotídicas do promotor *gsn*. As construções foram usadas para transformar, por eletroporação, conídios de uma linhagem de *N. crassa* onde o gene *gsn* encontra-se inativado. Em seguida, os transformantes obtidos foram analisados quanto as suas capacidades de acumular glicogênio, através da exposição das colônias ao vapor de iodo.

Na Fig. 1 estão mostradas as construções já realizadas neste trabalho. A construção pm1 é o próprio clone IV9A-1, o qual contém a região 5'-flanqueadora inteira do gene *gsn*, incluindo os elementos de transcrição HSE (Heat Shock Element), dois elementos de transcrição STRE e um sítio de ligação para RNA polimerase II (TATA box) (Fig. 1A). A construção pm2 (Fig. 1B) tem como objetivo, a deleção da região do promotor *gsn* que concentra a maioria dos elementos HSE e contém 783 bp da região 5'-flanqueadora. Para realizar a construção pm2, o clone IV9A-1 foi digerido parcialmente com a enzima *SmaI* e totalmente com a enzima *SfiI*, liberando um fragmento de tamanho de ~10,5 kb. As extremidades do fragmento foram reparadas com a enzima T4 DNA polimerase e religados com a T4 DNA ligase. A análise de restrição com *BamHI* demonstrou a presença do fragmento de DNA de tamanho esperado de ~300 pb (Fig. 2A, linha 2), o qual possui ~500 bp a menos que a construção pm1 (Fig. 2A, linha 1). A mesma diferença de tamanho pode ser observada para as análises com as enzimas *SacI* (Fig. 2A, linha 6; fragmento de 2,2 kb) e *ClaI* (Fig. 2A, linha 4, fragmento de ~610 bp). A construção pm3 (Fig. 1C) tem como objetivo a deleção da região do promotor *gsn* que contém os todos os elementos HSE e o elemento STRE da região promotora do gene e contém 1400 bp da região 5'-flanqueadora.

Para o preparo da construção pm3, o clone IV9A-1 foi digerido parcialmente com as enzimas *SmaI* e *NcoI*, liberando um fragmento de tamanho esperado de ~11 kb, o qual foi reparado com o fragmento *Klenow* da DNA polimerase I e religado com a T4 DNA ligase. A análise de restrição com

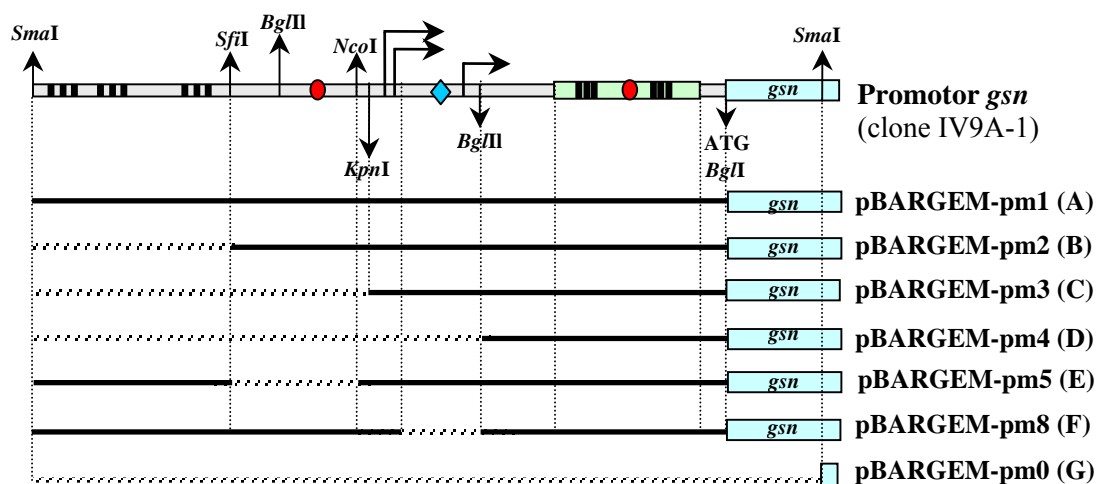


Figura 1. Representação esquemática das construções do promotor mínimo pm1 (A), pm2 (B), pm3 (C), pm4 (D), pm5 (E), pm8 (F) e pm0 (G). Os sítios de restrição contidos na região 5'-flanqueadora do gene *gsn* encontram-se indicados nas figuras. ♦ elemento TATA-box, ● elementos STRE, ■ elementos HSE, ■ intron localizado na região 5'-UTR, ⇨ sítios de início da transcrição (TIS). ATG- codon de iniciação da tradução

*Bam*HI demonstrou a presença de fragmentos de DNA de tamanhos esperados de ~370 bp e ~9,7 kb (Fig. 2B, linha 2), comparado com o clone IV9A-1 cujos fragmentos foram de ~460 bp, 830 bp e ~9,7 kb (Fig. 2B, linha 1). Com a enzima *Sac*I foi observada a presença do fragmento de tamanho esperado de ~1,8 kb (Fig. 2B, linha 6), o qual possui 1000 bp a menos que o fragmento proveniente da digestão da construção pm1 (Fig. 2B, linha 5). Com a enzima *Cla*I foi possível observarmos os fragmentos de tamanho esperado de ~300 bp, ~4,2 kb e de ~5,5 kb (Fig. 2B, linha 4), comparados com os fragmentos provenientes da construção pm1 ~300 bp, ~1,2 kb, ~4 kb e ~5,5 kb (Fig. 2B, linha 3).

O objetivo da construção pm4 (Fig. 1D) é remover a região do promotor que contém os elementos HSE, o elemento STRE, os sítios para início da transcrição (TIS) e o TATA *box* e contém apenas ~600 bp da região 5'-flanqueadora. Para realizar a construção pm4, o clone IV9A-1 foi digerido com as enzimas *Sma*I e *Bam*HI liberando um fragmento de DNA de ~6,2 kb, correspondendo ao vetor pBARGEM7-2 *Sma*I-*Bam*HI e um fragmento de DNA de ~3,5 kb, correspondendo ao inserto da construção. Posteriormente, o fragmento de ~3,5 kb foi digerido com *Bgl*II, resultando num fragmento de DNA *Sma*I-*Bgl*II de ~3,1 kb, o qual foi inserido no vetor pBARGEM7-2 *Sma*I-*Bam*HI. A digestão com *Bam*HI mostrou a presença de um fragmento de DNA de tamanho esperado de ~9,2 kb (Fig. 2C, linha 2), enquanto que a digestão com *Sac*I revelou a presença de um fragmento de DNA de tamanho esperado de ~1,1 kb (Fig. 2C, linha 6) e para a enzima *Cla*I foi possível observarmos os fragmentos de DNA de tamanhos esperados de ~300 bp, ~3,4 kb e de ~5,5 kb (Fig. 2C, linha 4).

A construção pm5 (Fig. 1E) tem como principal objetivo a deleção do elemento STRE da região promotora do gene *gsn* e possui ~2,0 kb da região 5'-flanqueadora. Para o preparo da construção pm5, o clone IV9A-1 foi digerido com *Bam*HI liberando um fragmento de DNA com o tamanho esperado de ~9,7 kb, correspondendo ao vetor pBARGEM7-2 *Bam*HI-*Bam*HI. Para o preparo do cassete de DNA, o plasmídeo Yep-pm5 (o qual carrega a construção do promotor mínimo *gns* pm5 no plasmídeo Yep-356, para a análise em células de *S. cerevisiae*) foi digerido com a enzima *Bam*HI, liberando um fragmento de DNA de tamanho esperado de ~900 bp. O cassete *Bam*HI-*Bam*HI foi inserido no vetor pBARGEM7-2 *Bam*HI-*Bam*HI, originando a construção pm5. Os DNAs plasmidiais dos transformantes obtidos foram analisados por sequenciamento automático, utilizando *primers* específicos para o promotor *gsn*.

A construção pm8 (Fig. 1F) tem como principal objetivo, a deleção do elemento TATA-box da região promotora do gene *gsn* e contém 2,0 kb da região 5'-flanqueadora. Para o preparo da construção pm8, o clone IV9A-1 foi digerido parcialmente com *Bgl*II, liberando um fragmento de DNA com o tamanho esperado de ~9,2 kb, correspondendo ao vetor pBARGEM7-2 *Bgl*II-*Bgl*II. Para o

preparo do cassete de DNA, o plasmídeo Yep-pm8 (o qual carrega a construção do promotor mínimo *gns* pm8 no plasmídeo Yep-356, para a análise em células de *S. cerevisiae*) também foi digerido com a enzima *Bgl*II, liberando um fragmento de DNA de tamanho esperado de ~1,4 kb. O cassete *Bgl*II-*Bgl*II foi inserido no vetor pBARGEM7-2 *Bgl*II-*Bgl*II, dando origem à construção pm8. A análise de restrição com *Bam*HI, mostrou a presença de fragmento de tamanho esperado de ~9,2 kb (Fig. 2D, linha 2), comparado com o clone IV9A-1 cujo fragmento foi de ~9,7 kb (Fig. 2D, linha 1). Com a enzima *Sac*I foi possível observarmos a presença do fragmento de tamanho esperado de ~2,4 kb (Fig. 2D, linha 6), comparado com o clone IV9A-1 cujo fragmento foi de ~2,8 kb (Fig. 2D, linha 5) e com a enzima *Cla*I foi possível observarmos o fragmento de tamanho esperado de ~3,6 kb (Fig. 2D, linha 4), comparado com o clone IV9A-1 cujo fragmento foi de ~4 kb (Fig. 2D, linha 3).

A construção pm0 tem como objetivo a remoção de toda a região promotora do gene *gns* e parte da região codificadora do mesmo e deverá ser usada como controle negativo nos ensaios de acúmulo de glicogênio (Fig. 1G). Logo, esta construção não contém os primeiros 4888 bp da construção 1, ou seja, ausência total da região 5'-flanqueadora e dos primeiros 2497 bp da região codificadora do gene *gns*. Para preparar a construção pm0, o clone IV9A-1 foi digerido com *Sma*I, liberando um fragmento *Sma*I/*Sma*I de ~6,1 kb, o qual foi desfosforilado com fosfatase alcalina (SAP) e religado com T4 DNA ligase. A análise de restrição com *Bam*HI permitiu observarmos a presença apenas do DNA plasmidial linearizado de tamanho esperado de ~6,5 kb (Fig. 2E, linha 2). Com a enzima *Sac*I foi observada a presença de fragmentos de DNA de tamanhos esperados de ~550 bp e ~5,5 kb (Fig. 2E, linha 6) e com a enzima *Cla*I foram observados os fragmentos de tamanhos esperados de ~300 bp, ~350 bp e ~5,5 kb (Fig. 2E, linha 4).

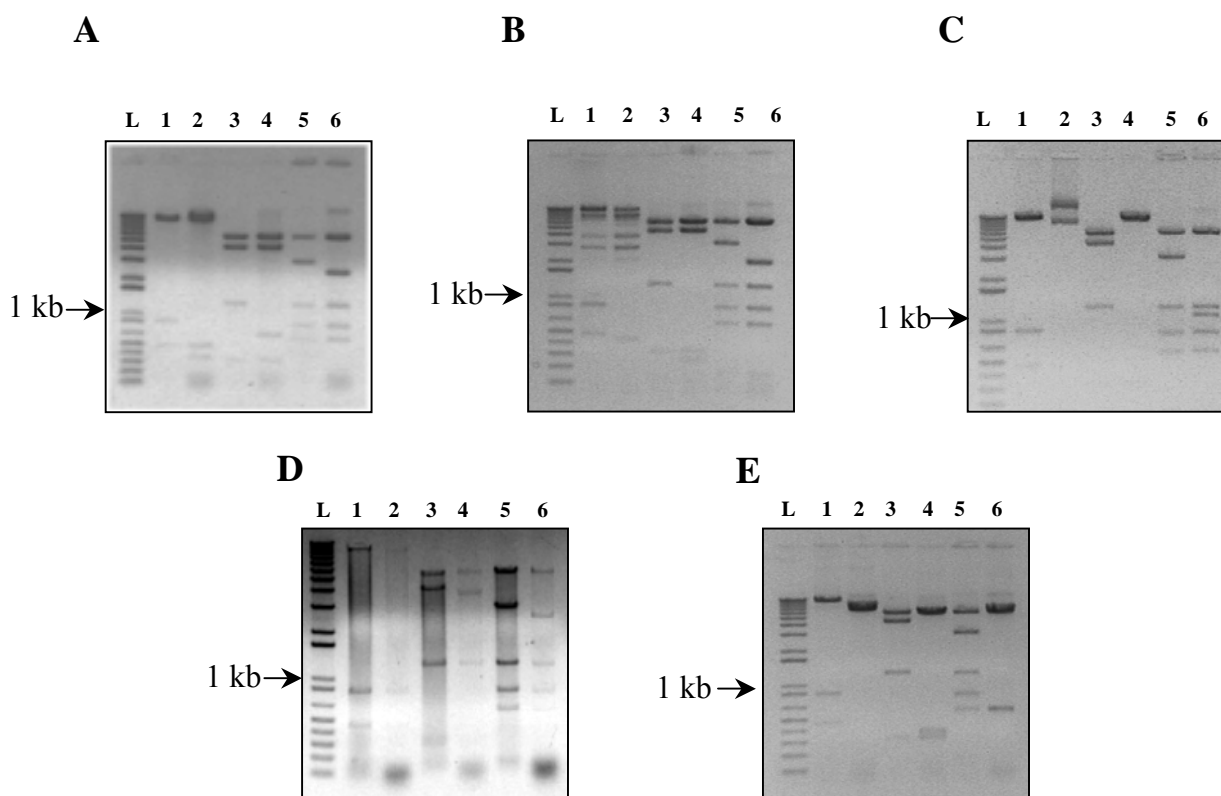


Figura 2. (A) Análise de restrição dos clones IV9A-1 e da construção pm2 finalizada (clone 6) com as enzimas *Bam*HI, *Cla*I e *Sac*I. (B) Análise de restrição dos clones IV9A-1 e da construção pm3 finalizada (clone 7) com as enzimas *Bam*HI, *Cla*I e *Sac*I. (C) Análise de restrição dos clones IV9A-1 e da construção pm4 finalizada (clone 18) com as enzimas *Bam*HI, *Cla*I e *Sac*I. (D) Análise de restrição dos clones IV9A-1 e da construção pm8 finalizada (clone 7) com as enzimas *Bam*HI, *Cla*I e *Sac*I. (E) Análise de restrição dos clones IV9A-1 e da construção pm0 finalizada (clone 5) com as enzimas *Bam*HI, *Cla*I e *Sac*I. 1- clone IV9A-1 digerido com *Bam*HI, 2- clone 6 digerido com *Bam*HI, 3- clone IV9A-1 digerido com *Cla*I, 4- clone 6 digerido com *Cla*I, 5- clone IV9A-1 digerido com *Sac*I, 6- clone 6 digerido com *Sac*I. L- 1kb Ladder (Invitrogen). Eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1x, contendo 0,5µg/ml de brometo de etídeo.

A análise da determinação do promotor mínimo *gsn* no fungo *N. crassa* baseou-se na capacidade de uma linhagem do fungo deficiente na atividade glicogênio sintase em acumular glicogênio quando transformada com um plasmídeo contendo a região codificadora do gene *gsn* sob o controle de diferentes regiões do promotor *gsn*. Conídios desta linhagem foram usados para transformar as construções plasmidiais pm0, pm1, pm2, pm3 e pm4. Os transformantes foram selecionados e suas colônias foram expostas ao vapor de iodo durante 5 min. Os resultados da exposição encontram-se na Fig. 3. Como era esperado, a linhagem usada como controle (*gsn*^{RIP}) não apresentou acúmulo de glicogênio. O mesmo resultado pode ser observado para os transformantes pm0, onde 4.888 bp do gene *gsn* foram removidos. O acúmulo de glicogênio pode ser observado para os transformantes pm1 (clone 2), pm2 (clones 1 e 4), pm3 (clone 5) e pm4 (clone 9). Futuramente, os DNAs genômicos destes clones deverão ser isolados e a presença das construções será confirmada por reações de amplificação por PCR, usando oligonucleotídeos específicos e também através de reações de sequenciamento.

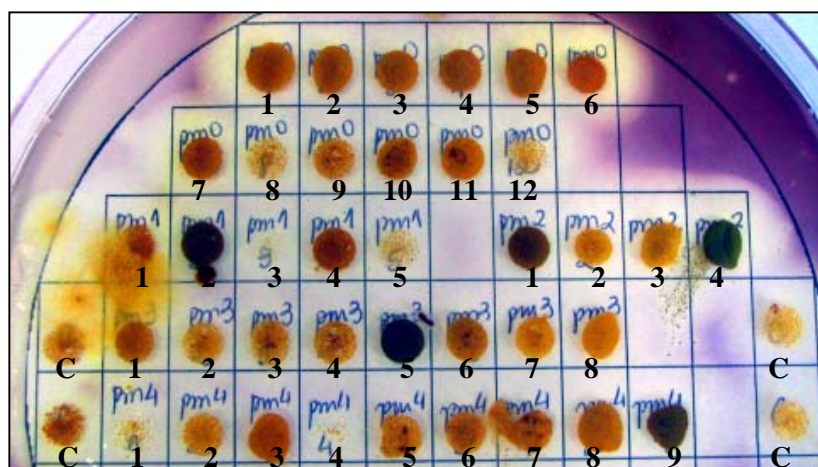


Figura 3. Determinação qualitativa do acúmulo de glicogênio nos transformantes de *N. crassa gsn*^{RIP} para análise do promotor mínimo *gsn*, após 5 min de exposição aos vapores de iodo. C- controle (*N. crassa gsn*^{RIP}); pm0- clones 1 a 12; pm1- clones 1 a 5; pm2- clones 1 a 4; pm3- clones 1 a 8 e pm4- clones 1 a 9.

Referências Bibliográficas

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

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

MARTINEZ-PASTOR, M.; MARCHLER, G.; SCHULLER, C.; MARCHLER, B. A.; RUIS, H.; ESTRUCH, F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **EMBO J.**, Oxford, UK, v. 15, n. 9, p. 2227-2235, May 1996.

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

Bolsa: CNPq/PIBIC