



Doctoral Thesis

Transcriptional regulation during fruiting body formation in the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*: promoter analysis of the *cgl2* gene encoding a fruiting body-specific galectin

Author(s):

Bertossa, Rinaldo Camillo

Publication Date:

2004

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004817378> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH NO. 15480

**Transcriptional regulation during fruiting body formation in
the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*: promoter analysis
of the *cg/2* gene encoding a fruiting body-specific galectin**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

presented by
RINALDO CAMILLO BERTOSSA

Dipl. Natw. ETH
born 22.2.1972
citizen of Rossa (GR)

accepted on the recommendation of
Prof. Dr. M. Aebi, examiner
Prof. Dr. U. Kues, co-examiner
Dr. M. Künzler, co-examiner

2004

Summary

Basidiomycetous fungi propagate as loose, undifferentiated mycelia in the substrate they live of. The combined action of various stimuli induce on the established mycelium the formation of a variety of highly differentiated structures. One of these, the fruiting body, develops usually on dikaryotic mycelia (mycelia containing two haploid nuclei with complementary mating specificities) and is specialized in the production and dispersal of sexual spores. The formation of the fruiting body is strictly regulated by several factors, of which mating type genes, light and nutrients play a central role. The effects these regulators exert on fruiting body formation are known but the molecular mechanisms through which they act remain yet largely obscure. Regulation of transcription is one possible means to attain control over cellular events. The discussion of some mechanisms of transcriptional regulation during developmental processes in fungi introduces the thesis.

In the basidiomycete *Coprinopsis cinerea*, two galectins (β -galactoside binding proteins), *cg11* and *cg12*, were shown to be exclusively expressed, though at slightly different time points for each protein, in restricted tissues of the young developing fruiting body. To explore to what extent transcriptional control is exploited to regulate fruiting events, the regulation of *cg12* transcription by fruiting-regulating signals was analyzed. For this purpose, *C. cinerea* was transformed with reporter plasmids containing the *gfp* coding sequence under control of modified *cg12* promoter fragments. Transcript levels of the endogenous *cg12* and the ectopic integrated *gfp* gene were subsequently analyzed in *C. cinerea* transformants by a newly developed analytical method based on real-time PCR technology. The investigation of the *cg12* promoter in a self-compatible homokaryotic strain allowed defining the minimal promoter fragment able to confer wild-type regulated transcription to the *gfp* reporter gene. In the minimal promoter fragment, a site similar to a Sp1-binding motif functioned as enhancer and a sequence containing a CRE (cAMP responsive element) motif together with AAGG direct repeats was necessary to achieve respectable basal activity as well as transcriptional induction upon prolonged incubation of transformants in continuous darkness. The possible involvement of the CRE motif in *cg12* transcriptional regulation is in agreement with the direct influence cAMP has on fruiting events, as established from previous studies in *C. cinerea*. The

repression of *cg/2* transcription upon incubation of transformants in continuous light could not be linked to any site in the *cg/2* promoter and despite the direct control exerted by mating type genes on fruiting, no result indicated presence of docking sites for mating type factors in the *cg/2* promoter.

Fruiting body formation on monokaryons is usually repressed as is galectins expression. To explore whether the repression of *cg/2* expression is mediated, at transcriptional level, by promoter elements, the *gfp* reporter constructs were transformed and tested in a monokaryotic *C. cinerea* strain. Preliminary results indicate that the observed repression was due to specific sites in the *cg/2* promoter.

At the end of the thesis, a possible model for the regulation of the *cg/2* promoter, based on the findings presented in the thesis and backed up by additional data from the literature, is proposed.

Riassunto

I basidiomiceti si sviluppano sottoforma di micelio indifferenziato nel substrato di cui si nutrono. L'azione combinata di diversi stimoli inducono nel micelio la formazione di varie strutture altamente differenziate. Una di queste, il corpo fruttifero, si sviluppa solitamente su micelio dicariotico (contenente due nuclei aploidi a diversa polarità) ed è specializzato nella produzione e disseminazione delle spore sessuali. Lo sviluppo del corpo fruttifero è strettamente regolato da molteplici fattori dei quali i geni di incrocio, la luce e il nutrimento hanno un ruolo fondamentale. L'influenza che questi hanno nella formazione del corpo fruttifero è nota ma i meccanismi molecolari attraverso i quali essi agiscono sono ancora sconosciuti. La regolazione della trascrizione è uno dei modi attraverso il quale eventi cellulari possono essere controllati. La presentazione di alcuni meccanismi di regolazione della trascrizione durante i processi di sviluppo dei funghi introduce la tesi.

Nel basidiomicete *Coprinopsis cinerea* due galectine (proteine che legano il β -galattosio), *cgl1* e *cgl2*, sono espresse esclusivamente, anche se in momenti leggermente distinti per ogni proteina, in tessuti circoscritti del giovane corpo fruttifero in sviluppo. Per capire in che modo la trascrizione è sfruttata come livello di controllo nell'organizzazione degli eventi della fruttificazione, la regolazione della trascrizione di *cgl2* da parte dei fattori che inducono la fruttificazione è stato analizzato a livello di promotore in *C. cinerea*. A tale scopo, *C. cinerea* è stato trasformato con plasmidi contenenti la sequenza codificante di *gfp* sotto controllo di frammenti del promotore *cgl2* modificati e il livello del trascritto del gene endogeno *cgl2* e di *gfp* è stato analizzato in trasformanti di *C. cinerea* per mezzo di un nuovo procedimento analitico basato sulla tecnologia "real-time PCR". L'analisi del promotore di *cgl2* in un ceppo omocariotico fruttificante ha permesso di definire il frammento di promotore minimo capace di conferire una trascrizione "wild-type" al gene *gfp*. Nel frammento del promotore minimo, un sito simile al motivo riconosciuto dal fattore Sp1 funziona come "enhancer" e una sequenza contenente un motivo CRE (elemento che risponde a cAMP) insieme a una ripetizione diretta della sequenza AAGG sono necessari sia per raggiungere livelli appropriati di attività basale sia per provocare un'induzione di trascrizione dopo prolungata incubazione dei trasformanti all'oscurità. La possibile implicazione del motivo CRE nella

regolazione della trascrizione del gene *cg12* è in accordo con l'influenza diretta che cAMP possiede sulla fruttificazione, come stabilito precedentemente da studi con *C. cinerea*. La repressione della trascrizione di *cg12* dopo incubazione di trasformanti in luce continua non ha potuto essere collegata a nessun sito nel promotore di *cg12* e, nonostante il controllo diretto esercitato dai geni d'incrocio sulla fruttificazione, nessun risultato ha potuto indicare la presenza di possibili motivi di riconoscimento per i prodotti di questi geni nel promotore di *cg12*.

La formazione del corpo fruttifero in miceli primari è solitamente repressa come pure l'espressione delle galectine. Per capire se la repressione dell'espressione di *cg12* è mediata, a livello della trascrizione, da elementi nel promotore, i vettori contenenti il gene *gfp* sono stati trasformati e analizzati in un ceppo aploide di *C. cinerea*. Risultati preliminari indicano che la repressione potrebbe essere raggiunta con l'ausilio di sequenze specifiche all'interno del promotore di *cg12*.

Alla fine della tesi è proposto un possibile modello della regolazione del promotore del *cg12* basato sui risultati ottenuti nella tesi e appoggiato da dati addizionali presi dalla letteratura.