

PABLO ACERA MATEOS

**Caracterização funcional e estrutural das proteínas RUV-1 e
RUV-2 do fungo *Neurospora crassa***

**Dissertação de Mestrado apresentada
ao Instituto de Química, UNESP,
Araraquara, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia**

Orientadora: Maria Célia Bertolini

**ARARAQUARA
2016**

DADOS CURRICULARES

Nome: Pablo Acera Mateos

Formação: Graduação em Biologia pela Universidade de Sevilla, 2013.

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
R. Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha – 14800-060, Araraquara, SP
E-mail: pablo.acera@hotmail.com

Atividades acadêmicas no período

Trabalhos apresentados em congressos no período

- Fernanda Z. Freitas, Pablo A. Mateos, Kely B. Imamura, Angelo J. Magro, Marcos Roberto M. Fontes & Maria Célia Bertolini. “THE *NEUROSPORA CRASSA* ORF NCU03482 ENCODES THE HUMAN RUVBL1 ORTHOLOGOUS PROTEIN THAT BINDS TO THE STRESS RESPONSIVE ELEMENT (STRE)”. 2nd International Workshop on Pontin and Reptin. Oeiras, Portugal, 2014.
- Mateos, P.A.; Freitas, F.Z.; Imamura, K.B.; Candido, T.S.; Virgilio, S.; Bertolini, M.C. “THE RUV-1/2 PROTEINS HAVE A FUNCTIONAL ROLE IN HEAT SHOCK RESPONSE IN *Neurospora crassa*” 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology. Foz do Iguaçu, PR, Brazil, 2015.
- Mateos P.A., Imamura K.B., Bertolini M.C. “TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF RUV-1/2 GENE UNDER HEAT SHOCK IN *NEUROSPORA CRASSA*”. 61^o Congresso Brasileiro de Genética. Águas de Lindóia, SP, 2015.

Cursos realizados no período

- “Introdução a bioinformática genômica e pós-genômica”. 2015, Águas de Lindóia, SP, 3 h.

- “Workshop of Next Generation Sequencing by Thermo Fisher Scientific”, 2015, Instituto de Química, Araraquara, SP, 3 h.
- “Next Generation Gene Arrays: fresh tools for transcriptome analysis”, 2015, Instituto de Química, Araraquara, SP, 1 h.

Prêmios recebidos no período

- “SBBq AWARD” for the best poster presented during the 23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), 2015, Foz de Iguaçu, Paraná, Brazil.
- “Menção Honrosa” for participating in the “Milton Krieger Award within the Microorganisms Category” in the 61^o Congresso Brasileiro de Genética, 2015, Águas de Lindóia, SP, Brazil.

Participação em eventos no período

- IV Congresso Farmacêutico da UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2014, Araraquara, Brasil.
- First Brazilian Workshop on Bioinformatics/Chemometrics for Metabolomics, 2015, Ribeirão Preto, Brasil.
- V Congresso Farmacêutico da UNESP, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.
- 23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). 2015, Foz do Iguaçu, Paraná, Brazil.
- 61^o Congresso Brasileiro de Genética. 2015, Águas de Lindóia, SP, Brasil.

A minha família pela compreensão e apoio incondicional na distância

Dedico.

**The most exciting phrase to hear in Science,
the one that heralds new discoveries,
is not “Eureka!” but “That’s funny”**

Isaac Asimov

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha família por me apoiar nos meus projetos e decisões sempre. Também por me acompanhar durante estes dois últimos anos e ter nos visto mais através da tela do computador do que em pessoa.

Agradeço a minha orientadora Maria Célia Bertolini por acreditar e mim e abrir as portas do seu laboratório para me acolher, quase sem experiência e sem falar a língua propriamente.

Agradeço aos meus colegas do laboratório, Stela Virgilio, Kely Braga Imamura, Thiago de Souza Candido, Fernanda Barbosa Cupertino, Rodrigo Duarte Gonçalves, Fernanda Zanolli Freitas, André Pastrelo Cavallieri, Carla Andrea Leite, Dani Luz, Jonatas E. Maimoni Campanella e Antonio Tarcísio Delfino por terem sido uma parte fundamental da minha vida, meus professores e amigos durante o Mestrado.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes da UNESP de Botucatu por abrir as portas do seu laboratório e me tratar como mais um aluno durante minha estadia em seu laboratório. Ao Prof. Dr. Angelo José Magro e o aluno de Mestrado Fabio Filippi Matioli pela participação e colaboração no meu projeto.

Aos meus amigos de Espanha, e os que fiz aqui, dentro e fora da republica, que me ajudaram a me sentir como na minha casa o tempo todo.

Agradeço a UNESP, grande universidade, ao Instituto de Química de Araraquara, e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela acessibilidade e por me receber desde o começo com enorme hospitalidade.

A agencia financiadora CNPq pela bolsa durante todo o mestrado, e ter permitido desenvolver minha pesquisa e minha vida pessoal aqui. Agradeço também a FAPESP pelos auxílios financeiros concedidos ao laboratório, os quais permitiram a realização do presente trabalho.

Ao Brasil, pelas pessoas, a cultura, a música, as comidas e as festas que serão parte de mim o resto da minha vida.

RESUMO

Neste trabalho foi realizado um estudo de caracterização das proteínas RUV-1 e RUV-2 de *Neurospora crassa*, as quais são proteínas ubiquamente encontradas e descritas estar envolvidas em diferentes processos celulares. Resultados anteriores obtidos pelo nosso grupo identificaram, através de espectrometria de massas, a proteína RUV-1 como uma proteína capaz de se ligar ao promotor do gene da glicogênio sintase (*gsn*) durante a resposta ao choque térmico. Mais tarde, foi demonstrado que a proteína foi capaz de se ligar *in vitro*, e de maneira específica, ao motivo de DNA STRE, também presente no promotor *gsn*. Considerando que a proteína RUV-1 interage com a proteína parceira RUV-2 e, juntas, participam de grandes complexos proteicos que atuam na regulação de diferentes processos celulares, este trabalho teve como objetivo realizar estudos de caracterização das proteínas RUV-1 e RUV-2. Os resultados de expressão gênica mostraram que o gene *ruv-1* foi superexpresso na condição de choque térmico e que o gene *ruv-2* não mostrou alteração na expressão na mesma condição. Além disso, foi demonstrado que o transcrito do gene *ruv-2* é parcialmente processado na situação de choque térmico, e não em outra condição indutora de estresse, através do processo conhecido como *intron retention* levando à síntese de uma proteína truncada. No entanto, os resultados mostraram que a proteína RUV-2 foi detectada em extratos celulares do fungo obtidos até 4 h de choque térmico. Os cDNAs (*ruv-1* e *ruv-2*) foram inseridos no vetor pET28a e as proteínas expressas em *E. coli*. Entretanto, ainda não foi finalizada a expressão de ambas utilizando o plasmídeo bicistrônico pETDUET-1, para a análise de interação de ambas proteínas. Neste trabalho também foi construída uma linhagem do fungo modificada geneticamente, a qual produz a proteína RUV-1 fusionada ao *tag* V5 (RUV-1-V5) e será posteriormente utilizada em ensaio de imunoprecipitação para identificação de proteínas parceiras. Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) com esta linhagem foram realizados com o objetivo de analisar se a proteína RUV-1 se liga *in vivo* ao mesmo fragmento de DNA. Entretanto, os experimentos ainda não permitiram identificar a ligação proteína-DNA. Análises de modelagem e dinâmica molecular das proteínas RUV-1 e RUV-2 de *N. crassa* sugeriram interação entre elas e homologia estrutural a outras proteínas RUV conhecidas.

ABSTRACT

In this work, we performed characterization studies of *Neurospora crassa* RUV-1 and RUV-2, which are ubiquitous proteins and have been described to be involved in different cellular processes. Previous results obtained by our group identified, by mass spectrometry, RUV-1 as a protein able to bind to the glycogen synthase gene promoter (*gsn*) during heat shock response. Later, it was demonstrated that the protein was able to bind *in vitro*, and in a specific manner, to the STRE DNA motif, also present in *gsn* promoter. Since RUV-1 interacts with RUV-2 protein, and together participate in large protein complexes that act in the regulation of different cellular processes, this study aimed to conduct characterization studies of RUV-1 and RUV-2 proteins. Gene expression results showed that *ruv-1* gene, but not *ruv-2* gene was overexpressed under heat shock. Furthermore, it was shown that *ruv-2* transcript was incompletely processed under heat shock through a process known as intron retention that leads to the production of a truncated protein. No other stress inducing conditions led to the same phenomenon. However, RUV-2 protein was detected in cell extracts of the fungus exposed to heat shock up to 4 h. The cDNAs (*ruv-1* and *ruv-2*) were inserted into the pET28a vector and the proteins were expressed in *E. coli*. However, it has not yet been completed the molecular cloning in the bicistronic plasmid pETDUET-1, which allows the production of both proteins in the same cell, what is required for protein-protein interaction analysis. In this work, was also constructed a genetically modified strain, which produces the V5-tagged RUV-1 protein (V5-RUV-1), which that will be later used in immunoprecipitation assay for the identification of partner proteins. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay using this strain was performed in order to investigate whether RUV-1 protein binds *in vivo* the DNA fragment from the *gsn* promoter. Experiments have not allowed the identification of protein-DNA binding yet. Analysis of molecular modelling and dynamics of RUV-1 and RUV-2 proteins suggested the existence of interaction between them and structural homology to other known RUV proteins.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Visão geral das funções das proteínas RuvBL-1 e RuvBL-2.....	25
Figura 2 - Modelo da estrutura cristalográfica do monômero da RuvBL-1 de humanos.....	26
Figura 3 - Modelo cristalográfico das proteínas RuvBL1/RuvBL2 de <i>Chaetomium thermophilum</i> mostrando os dois possíveis duplo-heterohexâmeros.....	28
Figura 4 - Mapa físico do vetor pETDuet-1.....	41
Figura 5 - Representação esquemática do processo de introdução do tag V5 utilizando <i>splitmarkers</i>	46
Figura 6 - Alinhamento de sequência das proteínas RUV-1 e RUV-2 de <i>N. crassa</i>	55
Figura 7 - Alinhamento múltiplo de sequência de diferentes proteínas RUV-1.....	56
Figura 8 - Alinhamento múltiplo de sequência de diferentes proteínas RUV-2.....	57
Figura 9- Análises de conservação dos resíduos aminoácidos nos motivos descritos na proteína RUV-1 (A, B, C, D, E).....	58
Figura 10 - Representação esquemática dos motivos estruturais das proteínas RUV-1 e RUV-2.....	60
Figura 11 - Gráfico de RMSD.....	59
Figura 12 - Gráfico de RMSF.....	59
Figura 13 - Representação tridimensional do PDB final gerado pela dinâmica molecular.....	60
Figura 14 - Análises da expressão dos genes <i>ruv-1</i> e <i>ruv-2</i>	62
Figura 15 - Amplificações dos transcritos <i>ruv-1</i> e <i>ruv-2</i> a partir de cDNAs submetidos a diferentes condições de estresse.....	64
Figura 16 - Análise por <i>Western blot</i> das proteínas RUV-1/2 durante choque térmico.....	65
Figura 17 - Amplificação do gene <i>ruv-2</i> e análises de restrição.....	68
Figura 18 - Expressão e análise por <i>Western blot</i> da proteína RUV-2 recombinante.....	68
Figura 19 - Análise da solubilidade proteína RUV-2 recombinante.....	69

Figura 20 - Análise da solubilidade das proteínas RUV-1 e RUV-2.....	70
Figura 21 - Análises da expressão das proteínas RUV-1 e RUV-2 utilizando os plasmídeos pETDuet-1- <i>ruv-1</i> e pETDuet-1- <i>ruv-2</i>	72
Figura 22 - Amplificação dos fragmentos de DNA utilizados para a inserção do <i>tag V5</i>	74
Figura 23 - Comparação fenotípica entre as linhagens.....	75
Figura 24 - Confirmação da presença do <i>tag V5</i> na linhagem transformada.....	75
Figura 25 - Ensaio de CHIP-qPCR.....	77
Figura 26 - <i>Western blot</i> mostrando a proteína RUV-1 em diferentes etapas do ensaio de CHIP.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs para analisar a presença de intron.....	38
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão por RT-qPCR.....	38
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificar e clonar o gene <i>ruv-2</i>	39
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados para amplificar e clonar o gene <i>ruv-2</i> no pETDuet-1.....	42
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados para a inserção do <i>tag V5</i>	46
Tabela 6 - Oligonucleotídeos usados para o experimento de ChiP-qPCR.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
°C	grau Celsius
μl	microlitros
μl	microgramas
g	gramas
kb	kilo base
KDa	kilo Daltons
pmol	picomol
M	molar
L	litro
g.L ⁻¹	gramas por litro
mL	mililitro
mg	miligrama
mM	milimolar
rpm	rotações por minuto
VM	meio Vogel
SC	<i>Synthetic Cross medium</i>
DTT	ditiotreitól
h	horas
min	minutos
DEPC	dicarbonato de dietila
nm	nanometros
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
RT-qPCR	real time PCR quantitativo
ChIP-qPCR	coimunoprecipitação da cromatina acoplada a qPCR
TBP	<i>TATA binding protein</i>
TIP	<i>TATA binding protein-interacting protein</i>
ATP	Trifosfato de adenosina]
DI	dominio I
DII	dominio II
DIII	domínio III
DNA	ácido desoxirribonucleico

cDNA	DNA complementar
ssDNA	single-stranded DNA
AAA+	<i>ATPase associated with different cellular activities</i>
RNA	ácido ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
dNTP	dexoxiribonucleotídeos trifosfato (dATP,dCTP,dGTP,dTTP)
ORF	fase aberta de leitura “Open Reading Frame”
BSA	albumina de soro bovino
SDS	dodecil sulfato de sódio
STRE	<i>stress responsive element</i>
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside
PAGE	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
EDTA	ácido etilenodiamina
pH	potencial hidrogeniônico
V	volts
Ω	ohm
Para	paraquat
Mena	menandiona
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
WT	<i>wild type</i>
p<0,01	99% de significância TUKEY

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO

1- <i>Neurospora crassa</i> , organismo modelo.....	19
2- Proteínas homólogas às proteínas RUV-1 e RUV-2 em diferentes organismos.....	23
3- Estrutura das proteínas RuvBL1 e RuvBL2	25

OBJETIVOS.....	29
----------------	----

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Meios de cultura.....	33
1.1- <i>Neurospora crassa</i>	33
1.2- <i>E. coli</i>	34
2- Propagação das linhagens de <i>N. crassa</i> e obtenção dos conídios.....	34
3- Análise computacional das proteínas estudadas.....	35
4- Extração de RNA e análises de expressão gênica.....	36
4.1- Extração de RNA total.....	37
4.2- Síntese de cDNA e PCR quantitativo (RT-qPCR).....	37
5-Clonagem do gene <i>ruv-2</i> no vetor PET-28 ^a	39
6-Clonagem dos genes <i>ruv-1</i> e <i>ruv-2</i> no vetor pETDuet-1.....	40
7-Produção das proteínas recombinantes.....	40
8-Ensaio de solubilidade das proteínas recombinantes.....	42
9-Ensaio de <i>Western blot</i>	43
10-Inserção do <i>tag V5</i> no genoma de <i>N. crassa</i>	44
10.1-Obtenção dos fragmentos de DNA.....	44
10.2-Transformação de conídios do fungo <i>N. crassa</i>	46
10.3-Cruzamento das linhagens de <i>N. crassa</i> e seleção dos transformantes.....	47
10.4-Confirmação da inserção do <i>tag V5</i>	48
11- Análise da expressão das proteínas no choque térmico.....	49
12- <i>Chromatin Immunoprecipitation</i> -qPCR (ChIP-qPCR).....	50

12.1-Ensaio de <i>Western blot</i> das alíquotas do Chip.....	51
12.2 Análise dos fragmentos de DNA por PCR quantitativo.....	51

RESULTADOS

1-Análises de bioinformática.....	54
1.1- Modelagem Molecular e Dinâmica Molecular.....	54
2-Análises de expressão gênica.....	60
2.1- Expressão dos genes <i>ruv-1/2</i> em diferentes condições ambientais.....	60
2.2- Estudo da regulação pós-transcricional dos genes <i>ruv-1</i> e <i>ruv-2</i>	61
3- Expressão das proteínas RUV-1/2 durante choque térmico.....	64
4- Produção das proteínas recombinantes RUV-1/2.....	66
4.1-Clonagem e produção no vetor pET28a.....	66
4.2-Clonagem e produção no vetor pETDuet-1.....	71
5-inserção do <i>tag V5</i> no locus genômico de <i>N. crassa</i>	73
6-Ensaio de co-imunoprecipitação da cromatina (ChIP-qPCR).....	76
7-Ensaio de <i>Western blot</i> com as amostras de ChIP-qPCR.....	78
CONCLUSÕES.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	83

INTRODUÇÃO

1- *Neurospora crassa*, um organismo modelo

O fungo pertence à classe dos *Eumycetes*, subclasse *Ascomycota*, família *Sordariaceae* e subfamília *Sphaeriales*. É um fungo saprófito, multicelular e não patogênico (ESSER; KUENEN, 1967). Estudos iniciais com *N. crassa* datam da primeira metade do século XIX. Desde então, o fungo vem sendo intensamente utilizado como organismo em estudos de expressão gênica, desenvolvimento e diferenciação celular, ritmo circadiano, defesa do genoma, bem como outros aspectos da biologia de eucariotos (PERKINS; DAVIS, 2000). Os fungos filamentosos são eucariotos multicelulares e, devido a isso, contribuem com uma grande soma de conhecimento para o entendimento dos processos genéticos, bioquímicos e moleculares de organismos eucariotos. Dentre os fungos filamentosos, *N. crassa* se destaca como um excelente organismo modelo, não só pela sua facilidade de manipulação e desenvolvimento, como também pelos seus aspectos genéticos e sistemas bioquímicos bem estabelecidos (PERKINS; DAVIS, 2000).

Neurospora crassa é um organismo heterotálico e vive a maioria do tempo na sua forma haploide. Existem dois *mating types* diferentes, chamados “A” e “a”, e qualquer um deles pode agir como macho ou fêmea no ciclo sexual. O ciclo de vida de *N. crassa* contém uma fase asexual, onde o fungo cresce e se reproduz por esporos asexuais chamados conídios, podem ser macroconídios (possuem mais de um núcleo) e microconídios (possuem um só núcleo). Ambos tipos de conídios se produzem por estruturas chamadas conidióforos (SPRINGER; YANOFSKY, 1989). A dispersão de *N. crassa* continua sendo asexual se os conídios continuam se pousando num substrato rico em nutrientes.

Para ser desenvolvida a fase sexual é necessário que o fungo esteja em condições de limitação de nitrogênio, e que se induza a formação da estrutura sexual chamada protoperitécio (que seria a estrutura feminina). A doação do núcleo ocorre quando um conídio ou pedaço de hifa de *mating type* diferente entra em contato com o protoperitécio, nesse momento ocorre a fusão das hifas (RAJU 1980). Seguidamente irá se formar o peritécio, constituído por hifas especializadas. Nesta etapa ocorre também a fusão dos núcleos e a posterior meiose. No final da meiose ocorre uma mitose originando no total 8 células sexuais chamadas

ascósporos que ficam contidas dentro de ascus e que vão dar início a novo o ciclo sexual do fungo.

O genoma do *N. crassa* está organizado em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb de tamanho (SCHULTE et al., 2002). Seu genoma foi sequenciado (GALAGAN et al., 2003) revelando ser constituído por aproximadamente 40 Mb, contendo aproximadamente 10.000 genes codificadores de proteínas, é considerado maior comparado a outros organismos modelos clássicos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Apenas 9% do genoma consiste em DNA repetitivo, e a maioria deste está composto por elementos transponíveis desativados. Uma grande quantidade de seus genes não possui ortólogos em *S. cerevisiae*, o que sugere uma relação mais estreita entre fungos filamentosos e eucariotos superiores, se comparado com leveduras e outros eucariotos inferiores (DUNLAP et al., 2007). A presença de um grande número de genes no genoma de *N. crassa* ainda com funções desconhecidas aponta este organismo como um promissor modelo para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos não identificados até o momento (DUNLAP et al., 2007). Atualmente, o número crescente de genomas de fungos filamentosos finalizados vem permitindo o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nos diferentes processos celulares nestes organismos e informações importantes vêm sendo descritas na literatura científica (GALAGAN et al., 2003) .

O sequenciamento do genoma aliado aos avanços das metodologias para a inativação de genes específicos (NINOMIYA et al., 2004) permitiram que análises de genômica funcional neste fungo fossem iniciadas. Como consequência, uma coleção consistindo de linhagens mutantes na maioria dos genes codificadores de proteínas foi construída por um consórcio envolvendo diferentes grupos de pesquisa (COLOT et al., 2006) e disponibilizada para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Nosso laboratório adquiriu parte desta coleção de linhagens mutantes, a qual vem sendo utilizada em diferentes estudos com diferentes objetivos.

Nosso laboratório vem utilizando o fungo *N. crassa* como um organismo modelo para o estudo de mecanismos celulares básicos, entre eles a regulação do metabolismo de carboidratos de reserva, como glicogênio e trealose. A trealose é um dissacarídeo não redutor formado por duas moléculas de glicose unidas por uma ligação glicosídica α -1,1. Este açúcar está presente em uma grande variedade de

organismos, incluindo bactérias, leveduras, fungos e invertebrados. A trealose é comum em leveduras e fungos, onde é acumulada no citosol de várias células como nos conídios e ascósporos, corpos de frutificação e células vegetativas (NWAKA; HOLZER, 1998). Quando os esporos germinam a trealose diminui rapidamente sugerindo que este açúcar é armazenado como fonte de carbono e/ou energia (DAVID CARROLL et al. 2003). Os níveis de trealose aumentam consideravelmente em vários tipos celulares quando estes são expostos a alguns tipos de estresse, o que indica que pode ter um papel no aumento da tolerância dos mesmos (DAVID CARROLL et al., 2003). O glicogênio é o principal carboidrato de reserva em diferentes células e seu metabolismo é bastante conservado nos eucariotos (ROACH et al., 2001). A regulação do metabolismo de glicogênio tem sido estudada há décadas, com foco nas atividades das enzimas responsáveis pelo controle da síntese e degradação do glicogênio, as enzimas regulatórias glicogênio sintase que catalisa a formação das ligações glicosídicas α -1,4 e a enzima glicogênio fosforilase que catalisa a liberação de resíduos de glicose-1-P a partir das extremidades não redutoras da cadeia polissacarídica (NELSON; COX, 2005). Em micro-organismos, além do controle enzimático, diversos trabalhos relatam variações no conteúdo de glicogênio quando estes foram submetidos a diferentes condições de estresse (PAULA et al. 2002; NOVENTA-JORDÃO et al., 1996; NI; LAPORTE, 1995). Assim, muitos micro-organismos acumulam glicogênio em períodos de abundância de nutrientes e o degrada quando as células são submetidas a certos tipos de estresse, como por exemplo, escassez de nutrientes no ambiente, variações na temperatura, etc.

Em relação ao metabolismo de glicogênio no fungo *N. crassa*, foi mostrado que o glicogênio é acumulado nas células no final da fase exponencial de crescimento vegetativo e este aumento foi acompanhado por um aumento tanto da atividade da enzima glicogênio sintase quanto nos níveis do transcrito *gsn*, gene que codifica a mesma enzima. Quando a cultura atinge a fase estacionária de crescimento o glicogênio é degradado (NOVENTA-JORDÃO et al., 1996; DE PAULA et al., 2002). Sob condição de choque térmico (transferência de 30°C para 45°C), ao contrário do que ocorre em *S. cerevisiae*, o nível do transcrito *gsn* é drasticamente reduzido e retorna ao nível normal após o restabelecimento da temperatura fisiológica de crescimento da cultura (30°C). Estes resultados mostraram que a regulação do metabolismo de glicogênio em *N. crassa* envolve mecanismos

diferentes dos descritos na levedura *S. cerevisiae* e mais se aproxima dos mecanismos de regulação de células de mamíferos, ou seja, sob condições estressantes ocorre degradação de glicogênio. Como consequência, diferentes abordagens moleculares e bioquímicas vêm sendo priorizadas, as quais têm como objetivo principal tentar entender os mecanismos moleculares envolvidos na regulação do glicogênio em *N. crassa*.

Em um destes estudos, utilizando uma abordagem proteômica associada à espectrometria de massas, foram identificadas proteínas que se ligam a um fragmento de DNA do promotor *gsn* contendo o motivo STRE (Stress Responsive Element) (FREITAS et al., 2008). Este motivo de DNA é descrito em *S. cerevisiae* como envolvido na regulação da expressão de genes responsivos a estresse, tal como estresse térmico, através de um mecanismo de ativação da expressão gênica nesta condição ambiental. O promotor *gsn* contém dois elementos STRE e os resultados obtidos em nosso grupo mostraram que na situação de choque térmico o transcrito de *gsn* é menos expresso (DE PAULA et al., 2002, FREITAS et al., 2004), enquanto que na levedura, na mesma condição ambiental, a expressão do mesmo transcrito é induzida (NI; LAPORTE et al., 1995). Uma das proteínas identificadas na abordagem utilizada pelo nosso grupo foi considerada como interessante alvo de investigação, em função de um domínio de ligação DNA-proteína não canônico, existente na sua estrutura, o qual é relacionado com proteínas reguladoras da expressão gênica ao nível de transcrição. Esta proteína é o produto da ORF NCU03482, anotada como uma proteína hipotética no banco de dados do fungo e identificada como homóloga à proteína RuvBL1 (denominação da proteína humana), uma DNA helicase descrita pela primeira vez em *E. coli*. Esta proteína é muito conservada desde bactérias até humanos, e é descrita possuir uma proteína parceira, RuvBL2, com a qual forma complexos (RuvBL1/2), os quais podem participar de grandes complexos proteicos em diferentes organismos. Em *N. crassa*, a ORF NCU06854 codifica para a proteína homóloga à RuvBL2, e ambas foram denominadas como RUV-1 e RUV-2, seguindo a nomenclatura para genes/proteínas em *N. crassa* (resultados não publicados).

Quando este trabalho teve início, alguns estudos de caracterização desta proteína em *N. crassa* haviam sido realizados. Assim, foi analisada a capacidade da proteína RUV-1 para se ligar especificamente *in vitro* no motivo STRE presente no promotor *gsn*, utilizando o ensaio de retardamento em gel (Electrophoretic Mobility

Shift Assay). Nesta análise, foi usada uma preparação purificada da proteína His-RUV-1 e dois fragmentos de DNA da região 5'-flanqueadora do gene *gsn*, ambos contendo um elemento STRE em cada fragmento. Os resultados obtidos mostraram que a proteína foi capaz de se ligar aos dois fragmentos de DNA de maneira específica. Também foi demonstrado que a proteína se liga de maneira dependente no motivo STRE, uma vez que foram usadas como controle duas outras sondas, uma delas contendo o motivo STRE localizado dentro da ORF do gene *steA* (produto da ORF NCU00340) e a outra, um fragmento do promotor *gdn* (o qual codifica a enzima desramificadora do glicogênio) que não apresenta o motivo STRE. Os resultados obtidos mostraram que complexos de DNA-proteína de mobilidade reduzida foram observados apenas para o fragmento do gene *steA*, mostrando especificidade para o motivo STRE. Além disso, foi realizado também um estudo preliminar de modelagem da proteína RUV-1 de *N. crassa* com base na estrutura tridimensional da RuvBL1 de *Homo sapiens* disponível no PDB (MATIAS et al., 2006). Este estudo foi feito em colaboração com o grupo do Prof. Marcos Fontes (IB, UNESP, Botocatu). Na modelagem foi observado que a proteína de *N. crassa* apresentava uma alta identidade estrutural com a proteína RuvBL1 humana, o que levou a concluir que a proteína de *N. crassa* é um ortólogo estrutural da RuvBL1 humana.

2- Proteínas homólogas às proteínas RUV-1 e RUV-2 em diferentes organismos

As proteínas Ruv são proteínas parálogas, ubiquamente expressas que estão envolvidas em muito processos celulares, tais como regulação da expressão gênica, processamento do RNA ribossomal, apoptose, divisão celular e proliferação (recentemente revisto em Nano e Houry, 2013 e Rosenbaum et al., 2013). Apresentam diferentes denominações dependendo do organismo e de como foram anteriormente identificadas pelos diferentes pesquisadores, como por exemplo, RuvBL-1/RuvBL-2, Pontin/Reptin e Tip49/Tip48. A conservação evolutiva destas proteínas desde leveduras até o homem sugere que estas proteínas desenvolvem funções essenciais para a viabilidade e desenvolvimento da célula. Estas proteínas pertencem à família das ATPases conhecidas como AAA+ (ATPases associated with diverse cellular activities). Uma análise da sequência polipeptídica destas proteínas revelou a presença dos domínios TIP [TBP (TATA *binding protein-interacting protein*)

e motivos conservados de ligação e hidrólise de ATP como o Walker A (P-circular), Walker B box, e Arg *finger*.

Vários trabalhos afirmam que as duas proteínas atuam conjuntamente, formando estruturas hexaméricas e dodecaméricas, e participando de grandes complexos proteicos (NANO; HOURY, 2013, LAKOMEK et al., 2015). Ambas proteínas possuem atividade ATPásica e helicase. Estudos relatam que as atividades tanto ATPásica como helicase aumentam significativamente quando se trata do complexo RuvBL1/2 comparado às atividades das proteínas separadamente (HOURY et al., 2007). Conjuntamente, o complexo RUVBL1/2 atua em vários complexos multimoleculares nucleares que requerem proteínas com atividade ATPásica, incluindo complexos de remodelagem de cromatina, o complexo HAT (Histone acetil-transferase), complexos de ribonucleoproteínas nucleolares (snoRNP), complexo transcriptase reversa da telomerase, participam na montagem do fuso mitótico na mitose, e participam em algumas vias de sinalização (β -catenina, c-Myc, TBP). A Figura 1 apresenta os diferentes processos celulares onde estas proteínas foram demonstradas ter atuação. O complexo RuvBL1/2 regula a transcrição através da interação com fatores de transcrição. Embora sejam proteínas nucleares também foram detectadas no citoplasma, onde desempenham papéis, muito provavelmente, como chaperonas ou proteínas adaptadoras (IZUMI et al., 2010).

Na levedura *S. cerevisiae*, RuvBL2 e RuvBL1 são parte integral do complexo INO80, o qual catalisa, de maneira dependente de ATP, o deslizamento dos nucleossomas e está envolvido com o reparo de DNA de cadeia dupla e na regulação transcricional (JONSSON et al., 2004). São proteínas essenciais para a viabilidade e desenvolvimento em diversos organismos, tais como *S. cerevisiae* (Qiu et al., 1998) e *Drosophila melanogaster* (BAUER et al., 2000), uma vez que ambas proteínas participam de diversos processos celulares. Mais recentemente, os genes codificadores destas proteínas em humanos foram demonstrados serem superexpressos em alguns tipos de câncer hepático (GRIGOLETTO et al., 2013), câncer de pulmão (RUIZ-ARGUELLO et al., 2014), tumorigenese em geral (SAEKI et al., 2014) e invasão tumoral e metástases (XU et al., 2015).

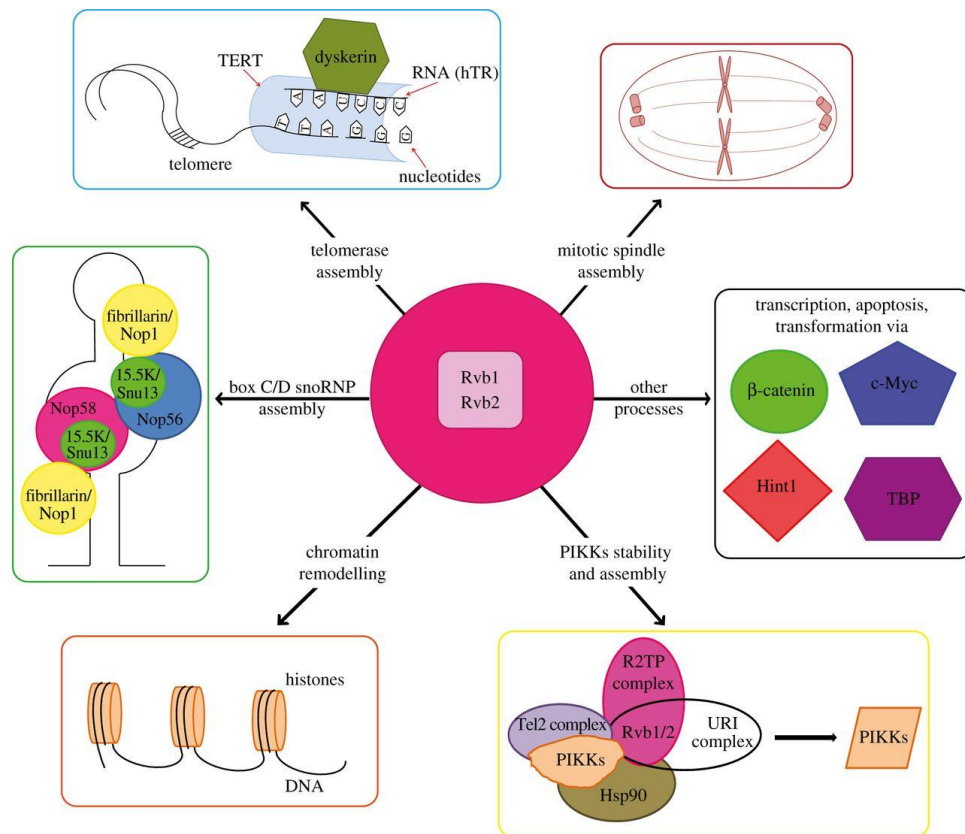


Figura 1- Visão geral das funções das proteínas RuvBL-1 e RuvBL-2 (NANO; HOURY, 2013).

3- Estrutura das proteínas RuvBL1 e RuvBL2

A estrutura tridimensional da RuvBL1 (PDB 2c9o) humana foi elucidada primeiramente através de cristalografia (MATIAS et al., 2006). Importantes conclusões foram obtidas em relação às suas funções. A sequência da proteína RuvBL1 pode ser dividida em três domínios proteicos (Figura 2): DI, a parte N-terminal que possui um motivo $\alpha\beta\alpha$ que é um subdomínio do domínio AAA+, DII, formado por 170 aminoácidos, e chamado “*insertion domain*” e DIII, a parte C-terminal formada só por hélice α e forma junto com DI o domínio AAA+. O domínio DII- é único das RuvBL1/2 dentro da família AAA+, e é provavelmente o responsável pela interação das proteínas com DNA/RNA, uma vez que tem homologia com alguns domínios de ligação de proteínas com ssDNA (NANO; HOURY, 2013). No domínio AAA+, os motivos Walker A e Walker B são responsáveis pela ligação e

hidrólise da molécula de ATP, respectivamente. Outros motivos estruturais da proteína são os motivos *sensor I* e *sensor II*, cujas estruturas mudam de conformação quando a proteína está ligada a nucleotídeos di- ou tri-fosfato, respectivamente.

O *Arginine finger* é outro motivo que se encontra como uma extensão da proteína e que interage com o domínio ATPase da proteína seguinte, permitindo assim uma coordenação da hidrólises do ATP entre as subunidades do complexo. RuvBL1 apresenta estrutura cristalográfica na forma de um hexâmero contendo um canal central, muito provavelmente o local de interação com moléculas de DNA, o qual tem a parte externa do orifício carregada positivamente, facilitando o contato e a translocação de cadeias simples de DNA carregadas negativamente. No entanto O homohexâmero das proteínas foi demonstrado ter uma actividade helicase e ATPase muito menor, indicando que possivelmente não tem uma função fisiológica relevante (HOURY et al., 2008).

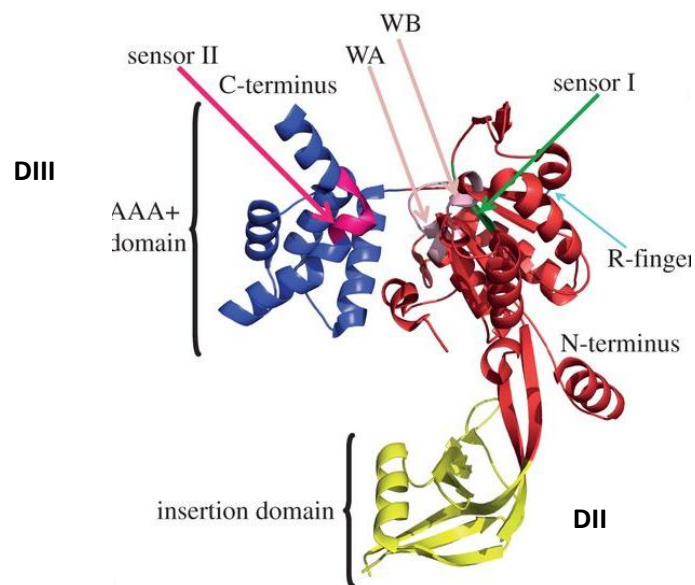


Figura 2- Modelo da estrutura cristalográfica do monômero da RuvBL-1 de humanos (NANO; HOURY, 2013).

Recentemente, a estrutura tridimensional do complexo RuvBL1/2 (PDB 4WW4 e 4WVY) foi descrita na sua totalidade (LAKOMEK et al., 2015). No trabalho, a proteína RuvBL-1 do fungo termófilo *Chaetomium thermophilum* foi cristalizada juntamente com sua paróloga RuvBL-2, mostrando a formação de complexos heterohexaméricos e dois complexos heterododecaméricos (duplos hexâmeros),

(GORYNIA et al., 2011) com diferentes conformações. Neste último, as proteínas RUV-1 e RUV-2 estão alternadas, formando um hexâmero, e estão também em contato com as RUVs do hexâmero parceiro (Figura 3).

Estudos também realizados com as proteínas de humanos, com os Dll ou *insertion domain* truncados mostraram que os complexos formados possuem uma atividade ATPase e helicase aumentada comparada com os complexos da proteína selvagem, sugerindo que o Dll pode ter uma atividade regulatória destas atividades no complexo (CARRONDO et al., 2011). O complexo dodecamérico RvBL1-RvBL2 é descrito como duplo-heterohexâmero, ou seja a estrutura é formada por dois heterohexâmeros um em frente ao outro, e cada hexâmero está composto pelas proteínas RuvBL1 e RuvBL2 alternadas. Os pesquisadores descreveram dois tipos de complexos estáveis, dois duplo-heterohexâmeros cada um deles com os *insertion domains* orientados de maneira oposta em referência ao domínio AAA+. Em uma das estruturas os *insertion domains* estão formando a interface entre os dois hexâmeros, e na outra estrutura se encontram nas extremidades do complexo (Dll em vermelho na imagem). Usando várias técnicas biofísicas, tais como microscopia eletrônica, reconstruções 3D por computação e estruturas cristalográficas de raios-X, tem sido demonstrado que as proteínas humanas RvBL1 e RvBL2 podem se encontrar em vários estados oligoméricos que são modulados pelo *insertion domain*. O estado oligomérico das proteínas de *S. cerevisiae* foi alterado pela presença do *tag* de poli-His no N-terminal da proteína (ORTEGA et al., 2010).

Além das atividades ATPase e helicase, vários pesquisadores tem sugerido que as proteínas RuvBLs tem atividade chaperona-*like*. A menor abundância destas proteínas em alguns complexos onde elas participam indica que as proteínas não se encontram o tempo todo nos complexos, indicando um possível papel de chaperona ou proteínas que facilitam o acoplamento de outras proteínas que formam parte do complexo, ao invés de exercer a função de ATPase ou helicase. Para entender melhor o papel fisiológico destas proteínas em cada situação foram feitos estudos de mutação dos diferentes motivos e foram testados os efeitos nos complexos proteicos. Os resultados mostraram que as RuvBLs realizam funções específicas dentro de cada complexo em que participam apesar de que alguns complexos com os domínios Walker A e Walker B mutados perdem a atividade ATPase e helicase (hidrólise do ATP e o motor que dirige o desenovelamento do DNA/RNA) e outros

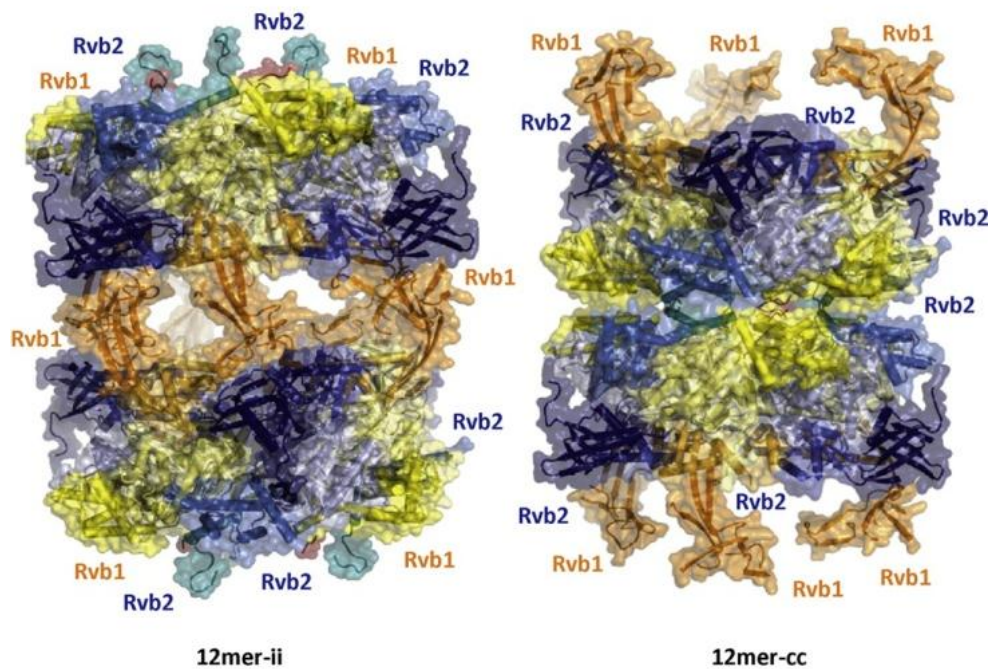


Figura 3- Modelo cristalográfico das proteínas RuvBL1/RuvBL2 de *Chaetomium thermophilum* mostrando os dois possíveis duplo-heterohexâmeros (LAKOMEK et al., 2015).

continuam desempenhando as atividades. As proteínas RuvBLs também mostraram uma atividade de recrutamento de proteínas/DNA/RNA e de remodelação do complexo mediante interações com os diferentes componentes dentro complexo (NANO; HOURY, 2013). Todas estas observações indicam que as RuvBLs tem a capacidade de formar diferentes complexos oligoméricos dependendo do complexo, processo (CHEUNG et al., 2010a; CHEUNG et al., 2010b) ou inclusive de diferentes cofatores que estão agindo junto com elas. Também foi proposto que dependendo do complexo formado por elas e em que complexo elas participam podem ter atividades catalítica ou chaperone-like para o estabelecimento e a maturação de interações proteína-proteína ou proteína-DNA/RNA. Porém mais estudos devem ser realizados para entender todos os papéis das proteínas nos diferentes organismos.

OBJETIVOS

De uma maneira geral, o objetivo do trabalho foi realizar experimentos visando a caracterização das proteínas RUV-1 e RUV-2 de *N. crassa*. O trabalho foi proposto visando realizar análises bioquímicas e funcionais com o objetivo de complementar dados anteriormente obtidos no laboratório. Especificamente, este trabalho tem como objetivo realizar os seguintes estudos:

- **Clonagem e expressão da proteína RUV-2.** O gene que codifica a proteína RUV-1 já havia sido clonado e a proteína expressa em *E. coli* em trabalhos anteriores no nosso laboratório. Portanto, este trabalho teve como objetivo realizar a clonagem do gene *ruv-2* e expressar a proteína RUV-2 de maneira separada e conjunta com a RUV-1, utilizando um vetor bicistrônico.
- **Análise da expressão dos genes codificadores das duas proteínas RUV.** Como a proteína RUV-1 foi anteriormente identificada em complexos DNA-proteína formados com extratos celulares submetidos a estresse térmico, o objetivo foi analisar a expressão dos dois genes nesta condição de estresse e sob outra condição indutora de estresse, tal como estresse oxidativo.
- **Inserção de um tag no locus genômico *ruv-1*.** Ambas proteínas desempenham diferentes funções celulares muito provavelmente consequência da capacidade de atuar em diferentes complexos proteicos. Nosso objetivo, nesta parte do trabalho, foi inserir um tag (V5) no locus genômico *ruv-1* da linhagem selvagem para, posteriormente, ser utilizada em experimentos de imunoprecipitação com o objetivo de identificar proteínas parceiras de RUV-1.
- **Análise de CHIP (Chromatin Immunoprecipitation)-qPCR da proteína RUV-1 no promotor do gene.** Resultados obtidos anteriormente no laboratório mostraram que a proteína RUV-1 se liga *in vitro* a fragmentos de DNA contendo o motivo STRE. Para investigar se a proteína é capaz de ligar *in vivo* foram realizados experimentos de CHIP-qPCR utilizando a linhagem do fungo produtora da proteína RUV-1-V5.

- **Modelagem e dinâmica molecular das proteínas RUV-1 e RUV-2.** Estas proteínas têm sido amplamente estudadas tanto estrutural como funcionalmente em outros organismos, mas não existe nenhum dado estrutural destas proteínas em *N. crassa*. Porém foram feitos estudos de modelagem e dinâmica molecular das proteínas com o objetivo de obter dados que ajudem a confirmar a homologia com outras RUVs e para analisar as possíveis regiões de interação entre ambas proteínas.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Meios de cultura

1.1- *N. crassa*

Meio mínimo de Vogel

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956), acrescido de 2% sacarose, biotina (0,1 mg/mL) e 2% de ágar para meio sólido. O meio VM é um meio quimicamente definido, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 50x concentrada. Esta solução estoque foi realizada a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 mL de água destilada:

130 g citrato de sódio.H₂O

80 g KH₂PO₄

126 g KNO₃

144g (NH₄)H₂PO₄

10 g MgSO₄.7H₂O

5 g CaCl₂.2H₂O (pré-dissolvido em água destilada)

5 mL de solução de elementos traços.

A solução de elementos traços utilizada para o preparo do meio VM é obtida pela dissolução completa dos compostos citados a seguir em 90 mL de água.

5 g ácido cítrico.H₂O

5 g ZnSO₄.7H₂O

1 g Fe(NH₄)₂.(SO₄)₂.6H₂O

0,25 g CuSO₄.5H₂O

0,05 g MnSO₄.H₂O

0,05 g H₃BO₃

0,05 g Na₂MoO₄.2H₂O

Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 1 L com água destilada, foram adicionados 300 µL de clorofórmio como agente conservante e a solução foi armazenada a 4°C.

Meio *Synthetic Cross medium* (SC)

O meio utilizado para realizar os cruzamentos entre diferentes linhagens foi o meio SC (WESTERGARD; MITCHELL, 1947) na concentração 0,5 x acrescido de

sacarose 0,5 % e 2 % de ágar (EBBOLE; SACHS,1990). O meio SC é um meio quimicamente definido com pH 6,5. Foi preparado como uma solução estoque 2 x concentrada, por meio da dissolução completa dos sais, a seguir, em 800 mL de água destilada: 2 g KNO₃, 1,4 g K₂HPO₄, 1 g KH₂PO₄, 0,2 g NaCl, 1 g MgSO₄.7H₂O, 0,2 g CaCl₂.2H₂O, 0,1 mL de solução estoque de biotina (0,1 mg/ mL) e 0,2 mL de solução estoque de elementos traços. Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 1 L com água destilada, 667 µL de clorofórmio foram adicionados como agente conservante, e a solução foi armazenada a 4°C.

Solução FGS

Este meio foi preparado como uma solução estoque 10 x (0,5% frutose, 0,5% glicose e 20% sorbose).

Base e Top agar

Estes meios foram usados nos experimentos de cruzamento e foram preparados em meio VM contendo a solução FGS 1 x (para o *base agar*) 2 x (para o *top agar*) com adição de 2 M de sorbitol (somente para o *top agar*) e 1,5% de ágar. Acrescentando o *base agar* com 4 µL/mL de higromicina

1.2- *E. coli*

Meio 2YT

O meio de cultivo para o crescimento da bactéria foi o meio 2YT com adição de glicose. Para culturas sólidas, foi adicionado ao meio 2% de ágar.

1,6% triptona

1,0% extrato de levedura

0,5% NaCl

0,2% glicose

2- Propagação das linhagens de *N. crassa* e obtenção dos conídios

Para a obtenção dos micélios utilizados nos experimentos, as diferentes linhagens foram crescidas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM a 30°C por 3 dias em estufa e, em seguida, foram expostas à luz até um total de 9 a 10 dias.

Após esse período, os conídios foram coletados, adicionando-se aproximadamente 10 mL de água destilada estéril à garrafa, seguida da filtração em gaze estéril para a retenção das hifas. A suspensão contendo os conídios foi então contada em câmara de Neubauer e utilizada como inóculo, nos diferentes experimentos.

3- Análise computacional das proteínas estudadas. Modelagem e dinâmica molecular das proteínas de *N. crassa*

As sequências nucleotídicas das ORFs que codificam as proteínas estudadas e as sequências polipeptídicas foram identificadas no banco de dados do genoma de *N. crassa* (<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>). A detecção e caracterização dos domínios presentes nas proteínas foram feitas por meio das informações disponíveis no genoma do fungo (<http://www.fgsc.net/scripts/strainsearchform.asp>) pelo SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>) e pelo banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para o alinhamento múltiplo das sequências polipeptídicas das proteínas de interesse e dos ortólogos funcionais caracterizados em outros organismos foi utilizado o programa ClustalW server (<http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html>) e os resíduos de aminoácidos idênticos e conservados foram identificados por *Boxshade* 3.21 no site *Box Shade Server* (http://www.ch.embnet.org/software/.BOX_form.html). Para analisar os motivos estruturais das proteínas das espécies, foi utilizado o programa MEME suite 4.10.1, GLAM2 (*Gapped Local Alignment for Motifs*) (<http://meme.nbcr.net/meme/>). O esquema dos domínios das proteínas de *N. crassa* foi baseado na estrutura tridimensional das proteínas do fungo *Chaetomium thermophilum*, descrita recentemente (LAKOMEK et al., 2015). Para isto, foi feito um alinhamento da sequência peptídica das proteínas ortólogas de cada um dos fungos, e em seguida, foram identificados os aminoácidos que delimitavam os domínios das proteínas de *N. crassa*, usando como modelo os domínios de *C. thermophilum*.

Os estudos de modelagem molecular e de dinâmica molecular foram feitos através da colaboração com os professores Dr. Marcos Fontes e Angelo José Magro, e do aluno Fábio Filippi Matiole do Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu, SP. Para a modelagem molecular por homologia, as sequências

polipeptídicas das proteínas foram utilizadas para identificar as proteínas ortólogas através da ferramenta HHpred (JOHANNES; BIEGERT; LUPAS, 2005). A modelagem por homologia foi realizada utilizando a ferramenta Modeller 9.15 (SALI et al., 2000) para gerar os modelos, e utilizando os servidores Molprobitry (CHEN et al., 2010) e Procheck (LASKOWSKI et al., 1993) para avaliar os mesmos. Após a seleção do modelo gerado pelo Modeller, realizamos duas minimizações energéticas da estrutura antes de iniciar a dinâmica molecular. Uma utilizando o Gromacs 5.0.4 (FISER, SALI, 2003), técnica *Steepest Decend*, e outra utilizando o Charmm (BROOKS et al., 1983), Potencial energético. Seguidamente, uma dinâmica molecular foi realizada para finalizar a predição da estrutura. A dinâmica molecular foi realizada nas seguintes condições: uma solvatação em caixa cúbica, neutralização das cargas da caixa de água + proteína com íons, uma minimização energética utilizando da metodologia *steepest Decend*, 1000 ps de dinâmica com as coordenadas restritas para melhor ajuste das moléculas de águas e outros ajustes e mais 40 Nseg com todos os átomos livres usando a ferramenta Gromacs 5.0.4.

4- Análises de expressão gênica

A extração de RNA foi necessária para os experimentos de expressão gênica e nas análises da presença de introns nos transcritos dos genes *ruv-1* e *ruv-2*. Os experimentos foram realizados em condições experimentais de estresse térmico e na presença dos agentes estressantes menadiona, paraquat e peróxido de hidrogênio e ditioneitol (DTT). Para os experimentos de estresse, uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^7 células/mL) foi inoculada em 30 ml de meio VM líquido contendo 2% de sacarose em Erlenmeyer de 125 ml a 30°C, sob agitação constante de 250 rpm, 24 h. Após este período, o micélio foi coletado por filtração em papel de filtro e separado em duas frações. Uma foi armazenada a -80°C e a outra foi transferida para outro frasco contendo VM líquido e 0,5% de sacarose, pré-aquecido a 45°C (estresse térmico). Depois de 30 min, sob agitação a 250 rpm, os micélios foram coletados e congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Para as análises na presença de agentes que induzem estresse, os micélios foram coletados por filtração e transferidos para outros frascos Erlenmeyer contendo VM líquido e 0,5% de sacarose e paraquat ou menadiona ou H₂O₂ (agentes indutores de estresse oxidativo) ou DTT (indutor de estresse de retículo

endoplasmático) nas concentrações de 10 mM, 50 mM, 5 mM e 5 mM respectivamente. Após 1 h a 30°C e 250 rpm os micélios foram coletados, congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. As amostras foram posteriormente utilizadas para a extração de RNA total.

4.1- Extração de RNA total

O procedimento utilizado para a extração de RNA total foi o que utiliza cloreto de lítio (SOKOLOVSKY et al., 1990) modificado. Uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizada em gral de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para tubos contendo uma mistura de 750 µL de tampão de lise (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0, 0,6 M NaCl, 10 mM EDTA, 4%SDS) e 750 µL de fenol saturado em 100 mM Tris-HCl, pH 8,0. A suspensão foi homogeneizada em *vortex* durante 5 min à temperatura ambiente e centrifugada a 10.000 rpm, 10 min 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo igual volume de fenol e agitado em *vortex* rapidamente para homogeneização. Uma nova centrifugação foi realizada a 10.000 rpm, 10 min, 4°C. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M, mantido a 4°C por 2 h e coletado a 10.000 rpm, 10 min. 4°C. O precipitado foi solubilizado em 300 µL de água tratada com DEPC e novamente precipitado com 30 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,2 e 750 µL de etanol absoluto gelado a 4°C, durante 5 min. Depois de 5 min em gelo, o RNA total foi coletado a 10.000 rpm, 10 min 4°C, lavado duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a 10.000 rpm, 10 min 4°C, seco e dissolvido em 100-130 µL de água previamente tratada com DEPC. A concentração do RNA foi quantificada utilizando o espectrofotômetro Beckman, modelo DU640, no comprimento de onda de 260 nm. A qualidade da preparação foi avaliada pela relação 260/280 nm.

4.2- Síntese de cDNA e PCR quantitativo (RT-qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Inicialmente, as amostras de RNA (20 µg) foram tratadas com DNase RQ1 RNase-Free (Promega®) seguindo especificações do fabricante. Após essa primeira etapa, utilizou-se para a síntese do cDNA o kit SuperScript III

First Strand (Invitrogen®) e oligo dT seguindo as especificações do fabricante. Após obtenção do cDNA, foi analisada a presença ou ausência de introns. Para isso foram feitas duas reações de PCRs, cada uma com os oligonucleotídeos mostrados na Tabela 1. Após a PCR, os amplicons foram analisados em gel de agarose 2%. As análises de RT-qPCR foram realizadas no sistema StepOnePlus Real-Time PCR (Applied Biosystems®) utilizando como fluoróforo SYBR® Green e como gene referência o gene da actina (*act*), gene padronizado no laboratório anteriormente para experimentos de estresse. Os oligonucleotídeos específicos para os genes analisados estão apresentados na Tabela 2. Foram realizadas 3 réplicas biológicas para os experimentos e para cada experimento foram analisadas, no mínimo, 3 réplicas experimentais. Os dados foram analisados com o *software* StepOne v3.2 (Applied Biosystems®). Para quantificar a expressão dos genes foi realizada uma curva padrão de 5 pontos com concentrações conhecidas de DNA genômico. A curva padrão foi considerada válida só a partir de um r^2 maior ou igual a 0.99 e uma eficiência maior a 94%. Por último foi observada a curva de *melt* para analisar as ampliações.

Tabela 1- Oligonucleotídeos utilizados nas PCRs para analisar a presença de intron.

Nome	Sequencia
RUV-2F intron	5'-ATCTTGCAAATCAGTGGGC-3'
RUV-2R intron	5'-CCAGAGCAGTCTTTCCCG-3'
RUV-1F intron	5'-CTGGTTCCTGGCGTGCTG-3'
RUV-1R intron	5'-GATCTCGTTGCGACCATTGACC-3'

Tabela 2- Oligonucleotídeos utilizados nas análises de expressão por RT-qPCR.

Nome	Sequencia
q3482-F1	5'-GGCCGCTAATTGACAAGATT-3'
q3482-R1	5'-ATTGACCTTGCCAGAATG-3'
q-PCR RUV2-F	5'-TGCAGGAATCGGAGAAGAG-3'
q-PCR RUV2-R	5'-CTGCTGGTATCCATGCTATC-3'
act-F	5'-CCATGTACCCTGGTCTCTCCGAC-3'
act-R	5'-CCACCGATCCAGACGGAGTACTTG-3'

5- Clonagem do gene *ruv-2* no vetor PET-28a

A sequência nucleotídica do cDNA foi amplificada com os oligonucleotídeos relacionados na Tabela 3 utilizando como fontes de DNA as bibliotecas de cDNA preparadas anteriormente. Foi feita a reação de amplificação, com os oligonucleotídeos Ruv2-F/Ruv2-R, os quais (contém os sítios para as enzimas *NdeI* e *BamHI*, respectivamente, salientados nas sequências). A reação continha: oligonucleotídeos F e R (100 pmol/μL), 1 μL de cDNA, 10 μL do kit Phusion Flash high-fidelity *Master Mix* (Thermo Scientific) e 7 μL de água destilada. As condições da PCR foram: 98°C/30 seg, 98°C/5 seg, 60°C/30 seg, 72°C/60 seg por 35 ciclos, 72°C/5 min. O produto das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE contendo brometo de etídio, e em seguida, o fragmento de DNA de tamanho esperado foi excisado do gel e purificado utilizando o kit de illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band (GE Healthcare). Após purificação, o fragmento foi digerido juntamente com o vetor de clonagem, pET28a. As digestões foram realizadas com *BamHI* e *NdeI*, nas condições indicadas pela NewEnglandBioLabs, e a reação de ligação dos fragmentos foi realizada com a enzima T4 ligase a 16°C incubando até o dia seguinte. O produto da reação de ligação foi usado para transformar células competentes de *E. coli* DH10B. Após transformação, a seleção dos transformantes foi feita através do plaqueamento em meio de cultura 2YT sólido suplementado com 100 μg/mL de canamicina. As colônias resultantes do crescimento foram inoculadas em meio 2YT líquido contendo 100 μg/mL de canamicina e submetidas à extração do DNA plasmidial. As construções plasmidiais foram confirmadas por análise de restrição e as células dos clones positivos foram armazenadas à -80°C como cultura permanente em glicerol 50% estéril.

Tabela 3- Oligonucleotídeos utilizados para amplificar e clonar o gene *ruv-2*.

Nome	Sequencia
Ruv2-F	5'-GGAATTC <u>CATATGGCTGCTCAGGTCGTTACCG</u> -3'
Ruv2-R	5'-CGCGGATC <u>CCTTAGCTGCTGGTATCCATGC</u> -3'

6- Clonagem dos genes *ruv-1* e *ruv-2* no vetor pETDuet-1

A clonagem dos dois genes foi realizada neste plasmídeo com o objetivo de produzir ambas proteínas recombinantes na mesma célula para a avaliação da interação física entre as duas proteínas. Este vetor foi gentilmente doado pela Profa. Dr. Ana Paula Ulian de Araújo, IF, USP, São Carlos. O mapa físico deste plasmídeo está representado na Figura 4. Este vetor possui duas regiões de clonagem múltipla com vários sítios de restrição para a inserção de um gene em cada uma delas (MCS1 e MCS2), uma sequência que codifica para 6 His no MCS1, dois promotores T7 com dois operadores *lac* e um terminador T7. Utilizando este vetor, apenas uma das proteínas recombinantes será produzida fusionada a cauda de His. Nosso objetivo foi realizar duas construções distintas para a produção das proteínas: His::RUV-1/RUV-2 e His::RUV-2/RUV-1. Para a construção do vetor pETDuet é preciso fazer duas clonagens consecutivas, cada uma inserindo um dos genes. Depois da primeira inserção é recomendável checar a indução da proteína para ter certeza que ela está sendo produzida corretamente. Até o momento, somente foi inserido o primeiro gene de cada construção. A sequência nucleotídica do gene *ruv-1* foi amplificada com os oligonucleotídeos relacionados na Tabela 4, os quais contém os sítios para as enzimas *NdeI* e *KpnI*, a partir da biblioteca de cDNA preparada anteriormente. As condições da PCR foram as mesmas descritas anteriormente. Após purificação, o fragmento foi digerido juntamente com o vetor de clonagem com as enzimas *NdeI* e *KpnI*. A construção pETDuet-*ruv2* foi feita por subclonagem, partindo da construção pET28a-*ruv-2*. Esta construção foi digerida com as enzimas *NdeI* e *BamHI* e paralelamente o vetor pETDuet foi digerido com as enzimas *NdeI* e *BglII*. Os produtos das ligações (cada um contendo um gene) foram usados para transformar células competentes de *E. coli* DH10B. Após transformação, a seleção dos transformantes foi feita através do plaqueamento em meio de cultura 2YT sólido suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As colônias resultantes do crescimento foram inoculadas em meio 2YT líquido contendo 100 µg/mL de ampicilina e submetidas à extração do DNA plasmidial. As construções plasmidiais foram confirmadas por análise de restrição e as células dos clones positivos foram armazenadas à -80°C como cultura permanente em glicerol 80% estéril.

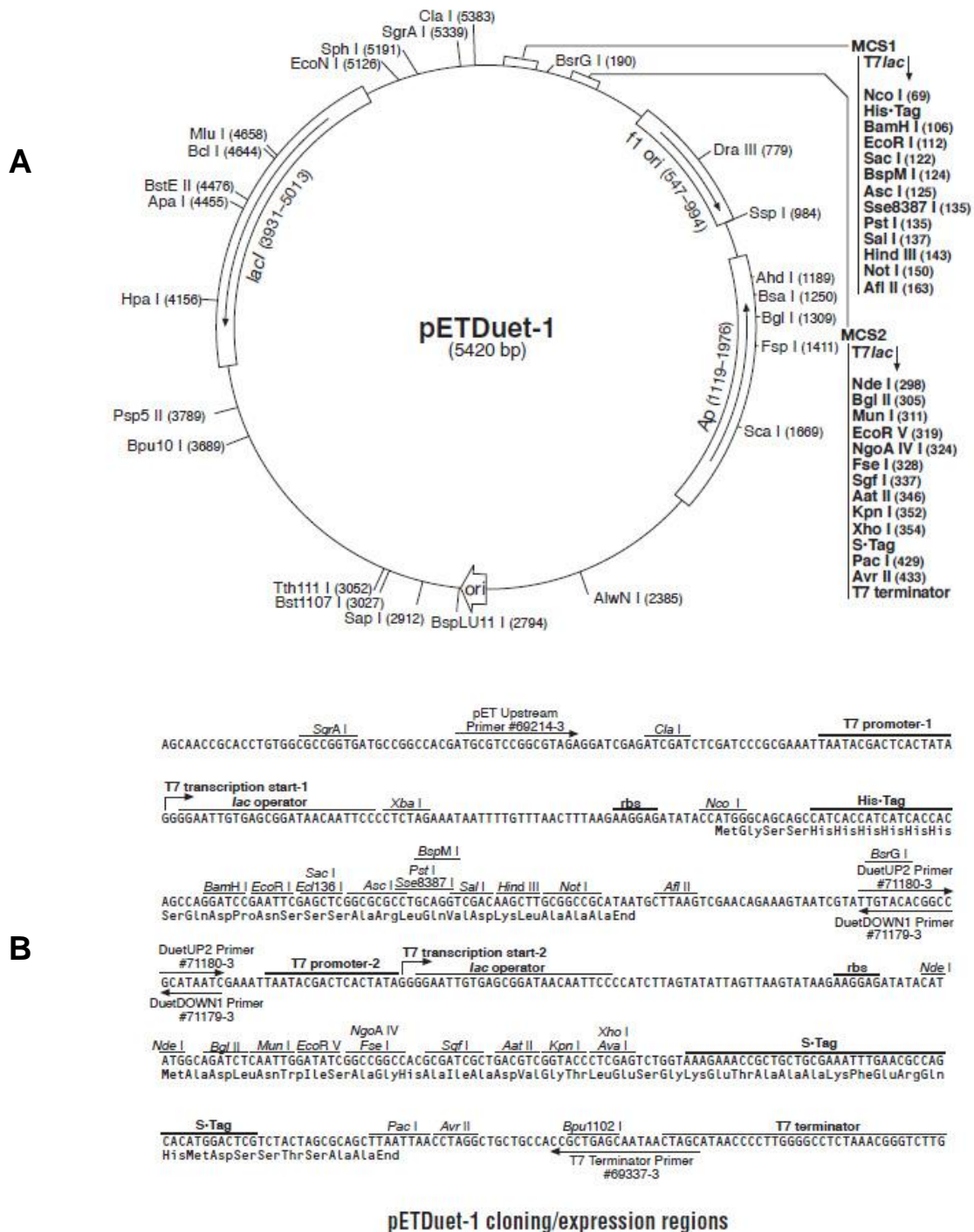


Figura 4. Mapa físico do vetor pETDuet-1. (A) Mapa físico mostrando o vetor pETDuet-1. (B) Região do vetor contendo os sítios de clonagem múltipla, os promotores e o terminador.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados para amplificar e clonar o gene *ruv-2* no pETDuet-1.

Nome	Sequencia
NCU03482-F	5'-GGAATTCC <u>CATATGGT</u> GCAAATCAGCG-3'
ruv-1 K-R	5'-CGGGTACCTCAACAAATAAACTCCTGACC-3'

7- Produção das proteínas recombinantes

Este ensaio foi feito com o DNA plasmidial das construções pET28a-*ruv-2*, pETDuet-*ruv-2* e pETDuet-*ruv-1*. Estas construções foram utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem produtora BL21-Rosetta(DE3)pLys-S. Um pré-inóculo fresco das células de *E. coli* carregando os plasmídeos foi preparado e 1 mL deste foi inoculado em 30 mL de meio 2YT acrescido de 100 µg/mL canamicina e 100 µg/mL cloranfenicol (para a produção a partir da construção pET28a-*ruv-2*) e acrescido de 100 µg/mL ampicilina e 100 µg/mL cloranfenicol (para a produção a partir das construções pETDuet-*ruv-2* e pETDuet-*ruv-1*). As culturas foram mantidas a 37°C e 250 rpm durante 4 h aproximadamente, até alcançar uma DO a 600 nm de aproximadamente 0,6. Em seguida, a produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,4 mM durante 4 h. Inicialmente, o ensaio de indução da proteína recombinante foi realizado juntamente com um controle positivo pET28a-3482, o qual produz a proteína RUV-1 com aproximadamente 49 kDa e um controle negativo (pET28a vazio). Após o período de indução, as células foram coletadas a 10.000 rpm, 1 min. A seguir, o precipitado da cultura de células foi resuspenso em 25 µl de água e 5 µl de tampão Laemmli 5 X (375 mM Tris-HCl pH 6,8, 60% glicerol, 5% SDS, 15% β-mercaptoetanol e traços de azul de bromofenol sal sódico) e submetidas à fervura durante 5 min. Após a fervura, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 1 min e 20 µl do sobrenadante foram aplicados no gel 12% SDS-PAGE e submetidas à eletroforese a 100 V.

8- Ensaio de solubilidade das proteínas recombinantes

Para verificar se as proteínas recombinantes eram solúveis, foi realizado um ensaio de solubilidade. A linhagem produtora BL21-Rosetta(DE3)pLysS contendo os

plasmídeos pET-28a-*ruv-2* e pET-28a-*ruv-1* foram usados para este experimento. Um pré-inóculo fresco das células de *E. coli* carregando os plasmídeos foi preparado, 1 mL deste foi inoculado em 30 mL de meio 2YT acrescido de 100 µg/mL canamicina e 100 µg/mL cloranfenicol. A cultura foi mantida a 37°C e 250 rpm durante 4 h, até uma DO a 600 nm de aproximadamente 0,6 – 0,8. Em seguida, a produção da proteína recombinante foi induzida pela adição de IPTG para uma concentração final de 0,4 mM durante 4 h a 28°C, separando anteriormente uma alíquota de 2 mL que seria a cultura não induzida. Ao final da indução, coletamos as células a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4°C, e descartamos o sobrenadante mantendo o precipitado em gelo. Ao mesmo precipitado foi adicionado 3 mL de tampão de lise (50 mM HEPES, pH 7, 500 mM NaCl, 5% glicose, 150 mM imidazol e 0,4% NP-40) acrescido de inibidores de proteases 1 mM PMSF, e 10 mM benzamidina. Após suspensão, as células foram lisadas usando o sonicador *Sonics vibra-cell* a 40% de amplitude (três ciclos de 30 seg com intervalos de 1 min em banho de gelo). Após lise, os extratos celulares foram centrifugados a 14.000 rpm durante 20 min a 4°C para separar a parte insolúvel. Após centrifugação, o precipitado foi resuspenso no mesmo tampão de lise acrescido dos inibidores de proteases. As proteínas totais do precipitado e sobrenadante foram quantificadas (HARTREE, 1972) e 100 µg de proteína total de cada fração foi adicionada de tampão Laemmli 5 X e analisadas por SDS-PAGE.

Com o objetivo de determinar a condição de cultivo que produzisse uma maior quantidade de proteína solúvel, foram testadas três condições de indução para a RUV-1 e RUV-2. A primeira foi feita a 150 rpm, 12°C, 24 h com uma concentração final de IPTG de 0,4 mM, a segunda foi feita a 150 rpm, 25°C, 8 h e IPTG de 0,4 mM, e a terceira os cultivos foram mantidos a 150 rpm, 30°C, 4 h e IPTG de 0,1 mM.

9- Ensaio de *Western blot*

Para a confirmação da produção da proteína recombinante, o ensaio de *Western blot* foi realizado. Após o fracionamento por eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose em um sistema Mini Trans-Blot Eletrophoretic Transfer Cell (BioRad) usando o tampão de transferência (20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM glicina, 200 mL/L de metanol) durante 2 h a 100 V/250 mA. Após a transferência, a membrana foi corada com corante Ponceau-S para detectar

a presença das proteínas e do padrão molecular. Para remover o corante a membrana foi rapidamente lavada com água e, em seguida, incubada com uma solução de 6% de leite em pó desnatado em tampão 1 X TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 0,05% tween-20) com suave agitação durante 2 h para permitir o bloqueio da mesma.

Após esse período, as proteínas foram reveladas utilizando os ensaios de peroxidase ou fosfatase alcalina. Para proteínas recombinantes fusionadas à cauda de His, a membrana foi lavada com 1 X TBST (3 X, 5 min) e incubada com anticorpo monoclonal anti-His conjugado com fosfatase alcalina (Sigma, diluição 1:10.000 em 1 X TBST + 3% leite) por 2 h à temperatura ambiente, com agitação. Em seguida, a membrana foi novamente lavada três vezes com 1 X TBST e a revelação foi em 10 mL de tampão bicarbonato (100 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂, pH 9,8) adicionado de 100 µL NBT (cloreto p-nitrozul de tetrazólio) (30 mg/mL em 70% DMF) e 100 µL BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato de p-toluidina) (15 mg/mL em DMF).

No caso do análise de proteínas sem cauda de His, as membranas foram incubadas com o anticorpo específico contra a proteína de interesse em uma solução de 1 X TBST + 3% leite à baixa temperatura, com agitação suave. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas três vezes com 1 X TBST e incubadas com o anticorpo secundário conjugado com a peroxidase por 2 h. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com 1 X TBST e reveladas usando o ensaio da peroxidase. Para isto, as membranas foram incubadas durante 3 min em 5 ml de solução reveladora (10 mM Tris-HCl, pH 8,5, 0,2 mM ácido p-cumárico) contendo 1,2 mM de luminol (Sigma) e 1,5 µl de H₂O₂ e expostas ao filme de raio X.

10- Inserção do *tag* V5 no genoma de *N. crassa*

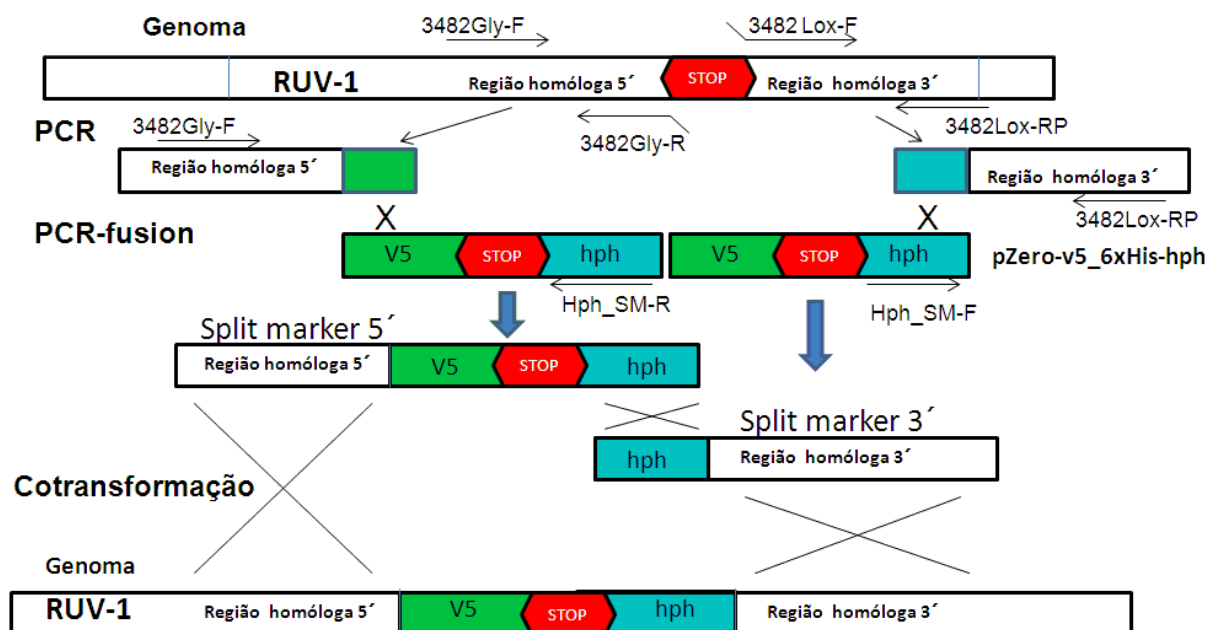
10.1- Obtenção dos fragmentos de DNA

A inserção do *tag* V5 foi realizada com o objetivo de produzir a proteína RUV-1 fusionada com um *tag* na região C-terminal para futuros experimentos de imunoprecipitação. Um esquema do procedimento utilizado está representado na Figura 5 e foi realizado juntamente com a Doutoranda Stela Virgílio. Foi utilizado o vetor pZERO-V5-*hph* (HONDA; SELKER, 2009) como DNA molde para a síntese por

PCR do cassette contendo o DNA codificador do *tag V5*, um códon de parada (serviria para parar a tradução da proteína depois da produção do V5) e uma região que codifica para uma proteína que confere resistência a higromicina. Todos os oligonucleotídeos utilizados nos experimentos estão relacionados na Tabela 5. O fragmento V5-STOP-*hph* foi amplificado por PCR, a partir do plasmídeo, utilizando o Kit *Phusion Flash high-fidelity Master Mix* e os oligonucleotídeos 10XGly-F e LoxP-R, nas seguintes condições: 35 ciclos a 98°C por 5 seg, 58°C por 5 seg, e 68°C por 1 min, após desnaturação inicial de 10 seg a 98°C. Em seguida, diferentes fragmentos do gene *ruv-1*, correspondentes às regiões *upstream* e *downstream* ao códon de término de síntese da proteína, com aproximadamente 1 kb, foram amplificados utilizando os oligonucleotídeos 3482Gly-F/3482Gly-R para a região *upstream* e 3482Lox-F/3482Lox-RP para a região *downstream*. É importante ressaltar que foram adicionadas as sequências nucleotídicas 5'-CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCC-3' na região 5'-*overhang* do oligonucleotídeo 3482GLY-R e a sequência 5'-TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCG-3' na região *overhang* do oligonucleotídeo 3482Lox-F para a construção dos *splitmarkers* pela técnica de fusion-PCR. As condições da PCR foram as mesmas descritas anteriormente. Para a síntese do *splitmarker* 5' foram utilizados os oligonucleotídeos 3482GLY-F e *hph_SM-R* junto com aproximadamente 300 ng dos fragmentos de PCR obtidos pela amplificação do vetor mais o *amplicom* 5' ao *stop codon*. Para a síntese do *splitmarker* 3' foram utilizados os oligonucleotídeos 3482Lox-RP e *hph_SM-R* junto com aproximadamente 300 ng dos fragmentos de PCR obtidos pela amplificação do vetor mais o *amplicom* 3' ao *stop codon*. Após a obtenção dos *splitmarkers*, 500 ng de cada um deles foram utilizados para a transformação de conídios competentes da linhagem selvagem FGSC#9719 (*mus 52::bar^r*).

Tabela 5. Oligonucleotídeos utilizados para a inserção do *tag* V5.

Nome	Sequencia (5' → 3')
10XGly-F	GGCGGAGGCGGCGGAGGCGGAGGCGGAGG
LoxP-R	CGAGCTCGGATCCATAACTTCGTATAGCA
3482Gly-F	GTCTGGACCCGAGCATCTAC
3482Gly-R	CCTCCGCCTCCGCCTCCGCCGCCTCCGCCACAAATAA ACTCCTGACCCT
3482Lox-F	TGCTATACGAAGTTATGGATCCGAGCTCGTCATCAGCTGTTGTTGTTTC
3482Lox-RP	CCTGCCTGTCTGTCTGGTTCAAC

**Figura 5.** Representação esquemática do processo de introdução do *tag* V5 utilizando *splitmarkers*. Esquema da inserção do *tag* no genoma de *N. crassa* usando o cassette de DNA V5-*hph*.

10.2- Transformação de conídios do fungo *N. crassa*

A inserção das construções de DNA em *N. crassa* foi realizada através da eletroporação de conídios coletados segundo o item 2. Após a sua coleta, os conídios foram centrifugados a 3000 rpm, o sobrenadante foi descartado e os conídios foram resuspenso em uma solução de 1,5 ml de 1 M sorbitol. Para a

transformação do fungo, foram adicionados 500 ng de cada um dos *splitmarkers* a 50 µl da suspensão conidial em um tubo estéril e mantido em gelo por 10 min. Em seguida, a mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação estéril e a suspensão eletroporada em um eletroporador Gene Pulser II (BioRad), nas seguintes condições 1500 V, 600 Ω e 25 µ Faraday. Após a eletroporação, foi adicionado 1 mL de 1 M sorbitol no interior da cubeta e 1/3 deste volume foi transferido para um tubo estéril contendo 5 mL de meio VM sem fonte de carbono. O tubo foi submetido à agitação a 200 rpm, 30°C por 1 h para a recuperação dos conídios. Após essa etapa, foram adicionados 5 ml de *top agar* pré-aquecido e mantido à temperatura de 55°C. Os tubos foram então agitados e dispensados em placa contendo *base agar* contendo 4 µg/µl de higromicina e sorbose para induzir o crescimento colonial. Após o crescimento dos transformantes na placa, algumas colônias foram isoladas e transferidas para tubos de ensaio contendo 5 ml de meio VM sólido + 2% de sacarose e 4 µg/µl de higromicina para a seleção dos transformantes que mostrassem um fenótipo selvagem. Um destes transformantes foi utilizado no cruzamento para a obtenção de uma linhagem homocário.

10.3- Cruzamento das linhagens de *N. crassa* e seleção dos transformantes

O cruzamento foi realizado para a obtenção de uma linhagem homocariótica, ou seja, uma linhagem que contem em todos os núcleos o mesmo material genético (tendo assim todos os núcleos modificados geneticamente). Os cruzamentos foram realizados seguindo o procedimento padronizado no laboratório (DAVIS; DE SERRES, 1970). Inicialmente a linhagem receptora FGSC2489 (A) foi inoculada em placas contendo meio SC e incubada à temperatura ambiente no escuro durante 5 dias até a formação do protoperitécio. Em seguida, uma suspensão conidial da linhagem transformada (para a inserção do *tag*) foi inoculada sobre a linhagem receptora, e as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 12 dias. Após esse período, observou-se a formação do peritécio, e os ascósporos foram liberados nas tampas das placas. Estes ascósporos foram coletados com 1 mL de água estéril em um tubo microtubo de 1.5 mL e centrifugados a 1000 rpm por 5 min. Após centrifugação, 800 µL do sobrenadante foi desprezado e 20 µL da cultura resuspendida foi inoculada em uma placa contendo meio VM 1X sólido contendo 1-5% de sacarose acrescido de 4 µg/µL higromicina. Estas placas foram incubadas a

65°C por 50 min para ativação dos ascósporos, bem como inativação das hifas e conídios. Após esta etapa, as placas foram mantidas à temperatura ambiente por 16 h. Finalmente, com o auxílio de um estereomicroscópio e uma espátula, os ascósporos em germinação foram removidos das placas e inoculados em tubos de ensaio em meio VM contendo 2% sacarose, acrescido com 4 µg/µL higromicina e foram mantidos por 2 dias a 30°C.

10.4- Confirmação da inserção do *tag V5*

A confirmação do *tag V5* nos segregantes foi conferida por PCR e por *Western blot*. Primeiramente foi feita uma extração do DNA genômico. Conídeos da linhagem obtida após transformação e obtenção da linhagem homocáριο e da linhagem selvagem (usada como controle negativo) foram inoculados em tubos contendo 5 mL de VM acrescido de 2% de sacarose e crescidos durante dois dias, sem agitação. O micélio foi coletado, seco em papel, e colocado em um tubo de 2 mL contendo 0.6 mL de tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA e 1% de SDS) acrescido de 3 µL de proteinase K (de uma solução 10 mg/mL) contendo contas de vidro (710-1.180 µm). Em seguida, a mistura foi fortemente agitada em Vortex e incubada a 65°C durante 1 h. Foi adicionado 3 µL de RNase A, novamente agitada e incubada a 37°C por 1 h. Após esse período, foi adicionado 0.2 mL de 7,5 M acetato de amônio e a mistura deixada em gelo durante 5 min. Em seguida, 0,5 mL de clorofórmio foi adicionado, a mistura foi agitada e centrifugada por 3 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi cuidadosamente transferido para outro tubo e foi adicionado 0,6 mL de isopropanol. As amostras foram incubadas a -80°C durante 15 min, e novamente centrifugadas por 3 min a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 70 % etanol. Após a lavagem, o DNA foi ressuspenso em 50 µL de água.

Para a confirmação da inserção por PCR, o DNA genômico da linhagem selvagem e da linhagem transformada foi utilizado como molde, seguindo as condições anteriormente descritas e utilizando os oligonucleotídeos *hph_SM-F* e *3482Lox-RP*. Estes oligonucleotídeos amplificam a região desde o gene que codifica a resistência a higromicina até 1.000 pb após o códon STOP do gene *ruv-1*.

A confirmação da inserção também foi feita por *Western blot* (procedimento descrito no item 8). Primeiro, uma suspensão conídeos da linhagem obtida após

transformação e da linhagem selvagem (usada como controle negativo) foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo 30 mL de VM acrescido de 2% de sacarose e foram deixados durante 24 h. Após esse período, os micélios foram coletados e transferidos para um gral de porcelana contendo nitrogênio líquido. Os micélios foram macerados e o pó resultante foi transferido para um tubo contendo o tampão de extração (50 mM HEPES, pH 7,4, 137 mM NaCl, 10 % glicerol) e inibidores de proteases (1 mg/mL pepstatina A, e 1 mM PMSF). Em seguida, os tubos foram agitados por inversão, deixados 5 min em gelo e novamente agitados. O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 min a 4°C e as proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas com o método Hartree modificado (HARTREE, 1972). Cerca de 100 µg de proteína total foram analisadas por *Western blot*. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-V5 (Life Technologies) durante 2 h. Em seguida, a membrana foi lavada e incubada como anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma) durante 2 h. Após incubação, a membrana foi revelada como descrito no item 8.

11- Análise da expressão das proteínas no choque térmico

Este experimento foi feito usando conídios da linhagem selvagem FGSC#2489. Uma quantidade de 10^6 conídios/ml foram inoculados em frascos de 500 ml contendo 125 ml de meio VM contendo 2% sacarose. Um total de 5 frascos foram inoculados e deixados em agitação a 30°C durante 24 h. Após esse período, micélios de quatro frascos foram coletados por filtração e transferidos para outro meio VM contendo 0,5% de sacarose pré-aquecido a 45°C em agitação e deixados 30 min, 1 h, 2 h e 4 h, na mesma temperatura. Após esse tempo, todos os micélios foram coletados e armazenados a -80°C. Os micélios foram macerados com nitrogênio líquido, o pó foi transferido para microtubos contendo tampão de lise pH 7,4 (50 mM HEPES, 134 mM NaCl, 10% glicerol) acrescentado de inibidores de protease e as proteínas foram extraídas por agitação em Vortex durante 5 min. Em seguida, o material foi centrifugado durante 15 min a 13.000 rpm a 4°C, o precipitado foi descartado e as proteínas totais presentes no sobrenadante foram quantificadas. Cerca de 375 µg de proteína total de cada amostra foram analisadas por *Western blot* em duas membranas de PVDF diferentes. Uma delas foi incubada com anticorpo anti-RUVBL-1 humano e a outra com anticorpo anti-RUVBL-2 humano

(Sigma, diluição 1:2500 e 1:2000 respectivamente em 1 x TBST + 3% leite). Em seguida, as proteínas foram reveladas pelo ensaio de peroxidase descrito no item 8.

12- Ensaio de *Chromatin Immunoprecipitation* (ChIP)

Os experimentos de ChIP foram realizados seguindo o protocolo descrito por Tamaru et al. (2003). Uma quantidade de 10^6 conídios/ml da linhagem RUV-1::V5 (construída neste trabalho, item 10) e RUV-1::GFP e RUV-2::GFP (construídas no laboratório por outro aluno) foram inoculados em 125 ml de meio VM acrescido de sacarose 2% e mantidos em agitação a 30°C durante 24 h. Após esse período, dois dos quatro micélios inoculados foram transferidos para um meio VM 0.5% sacarose a 45°C e foram mantidos durante 30 min em agitação. Em seguida, foi adicionado 3,5 ml de formaldeído deionizado em cada meio e os frascos foram mantidos por 30 min sob agitação. Em seguida, foram adicionados 7,7 ml de glicina 2,5 M e mantidos por 10 min (*cross-linking* DNA-proteína). Os micélios foram coletados e uma quantidade correspondente a 0,5 g de cada um deles foi pulverizada com nitrogênio líquido e o pó transferido para 6 ml de tampão de lise (50 mM HEPES, pH 7,9, 90 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100, 0,1% Na-DOC) acrescido de inibidores de protease (1 mM PMSF, 1 µg/mL leupeptina, 1 µg/mL pepstatina e 10 mM benzamidina).

A seguir, a cromatina foi sonicada para a obtenção dos fragmentos de DNA ligados às proteínas. O DNA foi sonicado utilizando o Sonics Vibra Cell (6 ciclos de 1min, 8 seg ON 9 seg OFF com 1 min em gelo depois de cada ciclo, 40% de amplitude). Após a sonicação, as amostras foram centrifugadas durante 15 min a 13000 rpm a 4°C e o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 15 ml. Uma alíquota (1 ml) foi removida para a análise posterior da proteína (amostra *Input*, controle positivo). De cada amostra, um volume de 1 ml foi removido e transferido para outros tubos para incubação com o anticorpo específico dependendo da proteína (anti-V5 para a proteína RUV-1-V5 e anticorpo anti-GFP para as proteínas RUV-1/2-GFP). A imunoprecipitação foi realizada durante a noite. Uma reação paralela, sem adição de anticorpo, portanto não imunoprecipitada, também foi realizada como controle negativo.

Após incubação, os complexos formados (anticorpo-proteínas-fragmentos de DNA) foram isolados utilizando a resina Dynabeads (Novex) constituída de contas

magnéticas acopladas à proteína A. Previamente, foi realizado o bloqueio da resina. Para isto, 50 µl da resina foi misturado com 1,5 ml de uma solução total de 25 ml de PBS com 0,125 g de soroalbumina bovina e incubada durante 5 min. A seguir, a solução de bloqueio foi descartada e o procedimento foi repetido. A resina bloqueada foi adicionada à solução contendo os complexos e a mistura foi incubada durante 4 h em agitação suave a 4°C. Após esse período, as contas foram separadas da solução usando uma *rack* magnética, o *flow through* foi descartado e a resina junto com o imunoprecipitado foram lavadas em baixa temperatura sequencialmente com 1,5 ml de tampão de lise ChIP (50 mM HEPES, 90 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton, 0,1% Na-Doc) sem inibidores de protease, em seguida com o mesmo tampão mas contendo 0,5 M NaCl, seguidamente com tampão contendo LiCl (10 mM Tris-HCl, 0,25 M LiCl, 1 mM EDTA, 0,5% Na-Doc e 0,5% NP-40). Finalmente, a resina foi lavada com 62,5 µl de TES (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA pH 8, 1% SDS) e aquecida a 65°C por 15 min, com agitação a cada dois minutos. Esta última etapa de lavagem foi feita duas vezes, cada uma delas transferindo o sobrenadante para outro microtubo usando o *rack* magnético. O último sobrenadante obtido, mais os controles positivo e negativo, foram incubados durante a noite a 65°C. Para isto, 20 µl das amostras foram misturadas com 105 µl de TES.

12.1- Identificação das proteínas por *Western blot*

Durante o procedimento para a obtenção das amostras para o ChiP, foram recolhidas várias alíquotas com o objetivo de realizar um *Western blot* para verificar a presença da proteína de interesse ao longo das etapas do experimento. As proteínas de cada amostra foram quantificadas com o método (HARTREE, 1972) e 100 µg de proteína total foram separadas por SDS-PAGE 12%. O ensaio de *Western blot* foi realizado como descrito no item 8, incubando com anticorpo Anti-V5 e revelando com o ensaio da peroxidase.

12.2- Análise dos fragmentos de DNA por PCR quantitativo

As amostras obtidas no item 12, após incubação a 65°C, foram adicionadas de 125 µl de água destilada e 3 µl de RNase A (10 mg/ml). A seguir, as mesmas foram incubadas a 50°C durante 1 h 30 min e, a seguir, adicionadas de 8 µl de

proteínase K (20 mg/ml). A mistura final foi incubada durante mais 1 h e 30 min a 50°C. As amostras foram extraídas com 250 µl de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (24:24:1) e os sobrenadantes foram extraídos novamente com clorofórmio.

O sobrenadante final foi precipitado com 10 µl de glicogênio (20 mg/ml), 25 µl de acetato de sódio 3 M, pH 5,0 e 865 µl de etanol 100% por 2 h a -80°C. As amostras foram centrifugadas a 15,8000 g a 4°C por 30 min, os precipitados foram lavados com 650 µl de etanol 75% e novamente centrifugados por 5 min. Os precipitados finais e o *Input* foi resuspenso com 150 µl de água e os DNAs imunoprecipitados com anticorpo e não imunoprecipitados foram resuspenso com 50 µl de água.

O DNA foi quantificado por espectrometria utilizando NanoVue Plus (GE). Os oligonucleotídeos na Tabela 6 foram utilizados para verificar a ligação das proteínas RUV-1 e RUV-2 aos elementos STRE localizados no promotor do gene *gsn*. Cerca de 25 ng de DNA de cada amostra foram analisados por PCR quantitativa (qPCR) usando o método de quantificação absoluta, no aparelho StepOnePlus™ Real Time PCR system (Applied Biosystems) usando o Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Uma curva padrão com concentrações conhecidas de DNA genômico foi construída para estimar a quantidade de DNA que a proteína havia se ligado. A curva padrão foi considerada válida a partir de um r^2 maior o igual a 0.99 e uma eficiência maior a 94%. Por ultimo foi observada a curva de *melting* para verificar que só um amplicon tinha sido gerado.

Tabela 6 – Oligonucleotídeos usados para o experimento de ChiP-qPCR.

Nome	Sequencia
emsa-STRE1F	5´- CACTGCACAGATCTGGAGGACC-3´
emsa-STRE1R	5´- TCTTGAGACATCCATGGGCATTTTCAG-3´
stre2i-F	5´- GCTTCAGTGAGGCCCG-3´
stre2i-R	5´- GGCAGATCAGGTCGACGTAGCC-3´
act-F	5´- CCATGTACCCTGGTCTCTCCGAC-3´
act-R	5´-CCACCGATCCAGACGGAGTACTTG-3´

RESULTADOS

1- Análises de bioinformática

Várias análises foram realizadas com o objetivo de obter algumas informações sobre as proteínas RUV-1 e RUV-2. Primeiro, foi feito um alinhamento das sequências polipeptídicas das duas proteínas (Figura 6), o qual mostrou que ambas apresentam uma identidade ao redor de 40%. Em seguida, foi feito um alinhamento de sequências das duas proteínas com as proteínas ortólogas de organismos distintos (*Homo sapiens*, *S. cerevisiae*, *Aspergillus nidulans* e *N. crassa*) (Figuras 7 e 8). Os resultados mostraram uma alta identidade entre as proteínas de diferentes organismos (em torno de 70%) o que sugere uma conservação da função das proteínas ortólogas. Foi realizada também uma análise detalhada da sequência dos resíduos de aminoácidos correspondentes aos motivos estruturais descritos na proteína RUV-1 (Figura 9). Foram identificados os motivos típicos de proteínas AAA+, como o Walker A (GXXXXGK(T/S), onde X é qualquer aminoácido), o motivo Walker B (ZZZZDE, onde Z é qualquer aminoácido hidrofóbico) e os motivos sensor I, sensor II e *Arginine finger*. O resultado mostrou uma alta conservação entre os aminoácidos existentes nos motivos, ainda sendo proteínas de organismos tão diferentes fisiologicamente, isso indica uma provável conservação na função destes motivos proteicos. Uma representação esquemática dos domínios estruturais das duas proteínas está representado na figura 10. Este esquema foi baseado na estrutura tridimensional das duas proteínas do fungo termófilo *C. thermophilum*, descrita recentemente (KRISTINA et al., 2015). A organização estrutural das proteínas é muito conservada, contendo os mesmos domínios. Apesar da RUV-2 ser um pouco maior, podemos sugerir que a origem das proteínas foi um evento de duplicação no genoma.

1.1- Modelagem molecular e dinâmica molecular

A modelagem molecular por homologia e a dinâmica molecular das proteínas RUV-1/2 foram feitas para obter um modelo computacional das proteínas e analisar a conformação tridimensional deste no espaço, e também para analisar se o modelo do dímero das proteínas poderia permitir interações entre ambas. Depois de obter a modelagem, utilizando servidores de análises, validamos a estereoquímica, Ramachandran e os rotâmetros do modelo. Uma vez que estes parâmetros se

encontravam dentro dos limites esperados para proteínas, foi feita uma dinâmica molecular para obter uma minimização energética, ajuste estrutural, cargas etc., e finalizar a predição do modelo. Os resultados da dinâmica molecular de 40 Nseg geraram dois gráficos, um deles o RMSD, representado na figura 11, que é a média do desvio médio quadrático dos átomos da cadeia principal em função do tempo, e o gráfico de RMSF, representado na figura 12, que é a média do desvio de cada resíduo. Também foi gerado o PDB da estrutura final, após a dinâmica, o qual está representado na figura 13. A região que ficou acima da média no gráfico de RMSF, a qual é a região entre os resíduos 127 ao 230, é uma região de maior liberdade dos átomos e é comum em regiões onde se encontram mais *loops* do que estruturas secundárias definidas, como a região marcada. Devido ao tamanho e a localização da região, provavelmente esta região pode interagir com ligantes, tais como outras proteínas ou DNA (OLDFIELD; DUNKER, 2014). Resultados da dinâmica molecular também mostraram possíveis regiões de interação, tipo pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre aminoácidos das duas proteínas.

```

RUV-1   1  MVQISEVKNSRDNR----TAAHTHIKGLGINSQGIAEKQAS-GEVGGOTTAREACGVVVD
RUV-2   1  MAAQVVTVGEISKDLRGLNLTAAHSHIRGLGVDADTLEPRVASOGLVGOEKARKAAAVVLE

RUV-1  56  IIKAHKLAGRCVLLAGGPGTGKTALALASQELGTKIPFCPTGSEIYSTENKKEVLMEME
RUV-2  61  MIKQKLAGRAVLIAGPPTGKTALAMGMAQSLGTDVFPFTTAASEIYSLENSKTEALITQ

RUV-1  116 NERRAIGLKVRETKEVYEGEVTELTPEEAENPLGGYGKTTITLLIGLKSAGKQKRLRIDP
RUV-2  121 AFRKSIQVRIKKEESEIMEGEVVEIQIDRSVTGHAKQGK-----LTIKTTDMEAIYDMGS

RUV-1  176 SIYEAIQKERVTVGDVITYIFANTGACKRVGRSDAYATEFDLE--AEEYVPIPKGEVHKKK
RUV-2  175 KMIDAMTKERVMAGDIIISLTKSSGKITKIGRSYARSRVDAMGVDTKFLQCFDDELQKRR

RUV-1  234 EIVQDVSLHDLIDVANARPOGGODIMSMGQIMKPKMTEITDKRSEINKVYSKYIDQGVVA
RUV-2  235 EVVHTVSLHDLIDVINSRTQ-----FLAFESGDTGEIRSEIRDQINTKVAEKKEGKA

RUV-1  294 EIVPGVLFIDEAHMLDVECFYLNKALESPIPIVVLASNRGMGIRGAEDLVAAHGIIP
RUV-2  288 EIVPGVLFIDEVHMLDVECFYINRALESDLPIVIVMASNRGHSKIRG-TDYKSPHGLPL

RUV-1  354 DFLSRLIILPTAYDPEELKRIIVKIRSTTEGVKITEAALDKIAEHGVRISLRYCLOLITP
RUV-2  347 DFLDRISLINTHSYTPDELRLQILITIRAQEEVDLTPDALALTKIGAEAGLRYASNLITP

RUV-1  414 ASIIAKVNGRNEIDVQDVAECEDIFLDARSAALLS-SEQ---GQEFIC-----
RUV-2  407 SQLICAKRKAQVGVEDVQRSFKLFYDPAKRSVKFVQESEKRLIGSDGVVDFRVNGGATGE

RUV-1  -----
RUV-2  467 PAATAAGGDSMDTSS

```

Figura 6. Alinhamento de sequência das proteínas RUV-1 e RUV-2 de *N. crassa*. O número de acesso no *GenBank* da proteína RUV-1 é XP_955769 e da proteína RUV-2 é XP_963328.

<i>NcRUV-1</i>	1	MVQISEVKGNSRDN-----RTAAHTHIKGLGLNSQGTAEKQASGFVGGTTAREACGV
<i>AnRuvBL1</i>	1	MVQISEVKGNSRDN-----RTAAHTHIKGLGLRDPGTAEVSGDGVVGQAAAREACGV
<i>ScRVB1</i>	1	MVAISEVKENPGVNSSNSGAVTRTAAHTHIKGLGLDESGVAKRVEGGFVGGIEAREACGV
<i>HsruvBL1</i>	1	-MKIEEVKSTTKTC-----RTIASHSHVVKGLGLDESGLAKQAASGLVGGENAREACGV
<i>NcRUV-1</i>	53	VVDLIKAHKMAGREVLLAGGPGTGKTALALAI SQELGTKVFFCPIITGSEIYSTEVKKTETV
<i>AnRuvBL1</i>	53	VVDLIKAKKMAGRAVLLAGGPGTGKTALALAI SQELGTKVFFCPIVSGSEIYSAEVKKTETV
<i>ScRVB1</i>	61	IVDLIKAKKMSGRAVLLAGGPGTGKTALALAI SQELGPKVFFCPIVSGSEIYSSVEVKKTEET
<i>HsRuvBL</i>	52	IVVLIKSKKMAGRAVLLAGGPGTGKTALALAI AQELGSKVFFCPIVSGSEIYSTETIKKTEET
Walker A		
<i>NcRUV-1</i>	113	LMENFRRAIGLKVRETKEVYEGEVELTLP EEAENPLGGYKGTITTLIIIGLKSAKGQKKLR
<i>AnRuvBL1</i>	113	LMENFRRAIGLRVRETKEVYEGEVELTLP EEAENPLGGYGRITISHLIIIGLKSAGTKKLR
<i>ScRVB1</i>	121	LMENFRRAIGLRIKETKEVYEGEVELTLP EDAENPLGGYKGTISHVIIVGLKSAGTKKTLR
<i>HsruvBL</i>	112	LMENFRRAIGLRIKETKEVYEGEVELTLP CETENPVGGYKGTISHVIIVGLKTAAGTKQLK
<i>NcRUV-1</i>	173	LDPSIYEAIQKERVTVGDVIYIEANTGACKRVGRSDAYATEFDLEAEEVVPVPKGEVHKK
<i>AnRuvBL1</i>	173	LDPSIYEAIQKERVTVGDVIYIEANTGACKRVGRSDAYATEFDLEAEEVVPVPKGEVHKK
<i>ScRVB1</i>	181	LDPSIYEAIQKERVTVGDVIYIEANTGAVKRVGRSDAYATEFDLETEEYVPLPKGEVHKK
<i>HsruvBL</i>	172	LDPSIYESIQKERVEAGDVYIEANSGAVKRVGRSDAYATEFDLEAEEVPLPKGVVHKK
<i>NcRUV-1</i>	233	KEIVQDVSLHDLVDVANARPQGGQDI MSMMGQLMKPKKTEITDKLRSEINKVVVSKYIDQGV
<i>AnRuvBL1</i>	233	KEIVQDVTLHDLVDANARPQGGQDI MSMMGQLMKPKKTEITDKLRQSEINKVVVYIDQGV
<i>ScRVB1</i>	241	KEIVQDVTLHDLVDVANARPQGGQDI MSMMGQLIKPKKTEITDKLRQSEINKVVAKYIDQGV
<i>HsruvBL</i>	232	KEIVQDVTLHDLVDVANARPQGGQDI MSMMGQLMKPKKTEITDKLRGEINKVVNKYIDQGI
<i>NcRUV-1</i>	293	AELVPGVLFIDEAHMLDIECFITYLNRALESPIISPIVILASNRGMTGIRGAEIDVAAHGIP
<i>AnRuvBL1</i>	293	AELVPGVLFIDEVHMLDIECFITYLNRALESSISPIVILASNRGHTVIRGTIDISAAHGIP
<i>ScRVB1</i>	301	AELVPGVLFIDEVHMLDIECFITYLNRALESNIAPVIVLASNRGMTVIRGTEDVISPHGIP
<i>HsruvBL</i>	292	AELVPGVLFIDEVHMLDIECFITYLNRALESSIAPIVIFASNRGNVIRGTEDITSPHGIP
Walker B Sensor I		
<i>NcRUV-1</i>	353	PDFLSRLLIPTTAYDPHEIKRIVKIRSTTEGVKITEAAIDKIAEHGVITSLRYCLQLLT
<i>AnRuvBL1</i>	353	PDLLARLLIIPTHPYSDEIKTIIRIRAKTEGLNITDPALDKVAEHGKIVSLRYALQLLT
<i>ScRVB1</i>	361	PDLIDRLLIIVRTIYDKDEIRTIIRERATVERLOVESALDLLATMGTEISLRYALQLLA
<i>HsruvBL1</i>	352	LDLLDRVMIIRTMLYTEQEMKQIIKIRACQTEGINISEEALNHLGELGTKTLIRYSVQLLT
Arg Finger Sensor II		
<i>NcRUV-1</i>	413	PASILAKVNGR-NEIIVQDVAECEDFLDARRSAALISSEQQGEFIC
<i>AnRuvBL1</i>	413	PASILARVNGRPGGIEADVTECEDFLDSKRSAALINQDS-EKFLY
<i>ScRVB1</i>	421	PCGILAQTSNR-KEIVVNDVNEAKLFLDAKRSTKILETISA--NYL-
<i>HsruvBL1</i>	412	PANILAKLNGK-DSIEKEHVEEISELFLYDAKSSAKIILADQQ-DKYMK

Figura 7. Alinhamento múltiplo de sequência de diferentes proteínas RUV-1. Alinhamento das proteínas Ruv-1 de *N. crassa* (XP_955769), de *S. cerevisiae* (Q03940) de *H. sapiens* (NP_003698.1) e de *A. nidulans* (Q5BBV9.3). Os motivos estruturais descritos para esta proteína são mostrados com linhas vermelhas.

<i>HsruvBL2</i>	1	MATVTA	T	KVPEIRDVTR	ERIGAHSHIRGLGIDD-AL	EP	QASQGVGQLAARRAAGV	
<i>ScRVB2</i>	1	--MSI	QTS	DPNETSDL	SLSLIAAHSHITGLGLDE-NL	QPRPT	SEG	
<i>NcRUV-2</i>	1	--MAA	QVV	TVGESKDLRGLN	LIAAHSHIRGLGVDADIE	PR	VASQGLVGOEKARKAAAV	
<i>AnRuvBL2</i>	1	--MAA	PT	STVAESKLRGLN	LIAAHSHIRGLGVDVDSL	QPR	PASQGLVGOEKARKAAAV	
<i>HsruvBL2</i>	60	LEMIREGK	IAGRAVLIAG	QPGTGKTA	AMGMAQALGPDTP	PFTA	IAGSEIF	
<i>ScRVB2</i>	58	LKM	QNGTI	IAGRAVLIAG	PPSTGKTALAMG	V	SQSLGK	
<i>NcRUV-2</i>	59	LEMIREGK	IAGRAVLIAG	PPSTGKTALAMG	MAQSLGTDV	PFT	TLLA	
<i>AnRuvBL2</i>	59	LQMI	REGK	IAGRAVLIAG	PPSTGKTALAMG	MAQSLG	PDV	
Walker A motif								
<i>HsruvBL2</i>	120	TQAFR	SIGVRIKEE	SEI	IEGEVVEIQIDR	PATG	TGSK	
<i>ScRVB2</i>	118	TQAFR	SIGIKIKEE	SEI	IEGEVVEIQIDR	SITG	GHK	
<i>NcRUV-2</i>	119	TQAFR	SIGVRIKEE	SEI	IEGEVVEIQIDR	SVTG	HAK	
<i>AnRuvBL2</i>	119	TQAFR	SIGVRIKEE	SEI	IEGEVVEIQIDR	SVTG	GNK	
<i>HsruvBL2</i>	180	ESLTK	DRVQAGDVI	IDKAT	GKISKLGRSE	TR	RARDY	
<i>ScRVB2</i>	177	DGLTK	ERVLAGDVI	SIDKAS	GKITKLGRSE	ARS	RDY	
<i>NcRUV-2</i>	178	DAMTK	ERV	MAGDII	SIDKSSGKIT	KLGR	SMARS	
<i>AnRuvBL2</i>	178	DSMTK	ERV	MAGDII	SIDKSSGKIT	KLGR	SMARS	
<i>HsruvBL2</i>	240	HTVSL	LHEIDVINSR	TQGF	LALFSGDTGEI	KSEV	RQINA	
<i>ScRVB2</i>	237	HTVSL	LHEIDVINSR	TQGF	LALFGDTGEI	RSE	VRDQIN	
<i>NcRUV-2</i>	238	HTV	LHEIDVINSR	TQGF	LALFSGDTGEI	RSE	VRDQIN	
<i>AnRuvBL2</i>	238	HTVSL	LHEIDVINSR	TQGF	LALFSGDTGEI	RSE	VRDQIN	
Walker B motif								
<i>HsruvBL2</i>	300	EVHMLDIE	CSFS	INRALES	DMAPVIM	ATNRG	ITRIG	
<i>ScRUV2</i>	297	EVHMLDIE	CFS	INRALES	DEFAPIV	MATNRG	VSKTR	
<i>NcRVB-2</i>	298	EVHMLDIE	CFS	INRALES	LAPIVIMAS	NRGHS	KIRGT	
<i>AnRuvBL2</i>	298	EVHMLDIE	CYS	INRALES	LAPIVIMAS	NRGHS	RIRGT	
Sensor motif I				Arg finger				
<i>HsruvBL2</i>	360	TPYSEK	TKQIL	RIRCEE	EDVEMSE	DAYTVL	TRIG	
<i>ScRVB2</i>	357	KSYNE	QEI	KTILS	IRAQEE	EVELSS	DAL	
<i>NcRUV-2</i>	358	HSY	PDEL	RQIL	TIRAQEE	EVDL	PDAL	
<i>AnRuvBL2</i>	358	QHYS	ADEL	RQIL	TIRAQEE	EIDL	SPDAL	
Sensor motif II								
<i>HsruvBL2</i>	420	EVQ	VDK	KRVYS	LFLE	DESR	STQY	
<i>ScRVB2</i>	417	TVE	VDK	KRAYL	LFLE	SARS	VKY	
<i>NcRUV-2</i>	418	QVG	VDV	QRS	FKLFY	DPARS	VK	
<i>AnRuvBL2</i>	418	EV	VDV	QRSY	RLFY	DPARS	VK	
<i>HsruvBL2</i>	463	--S-						
<i>ScRVB2</i>	468	DTIE						
<i>NcRUV-2</i>	478	DTSS						
<i>AnRuvBL2</i>		----						

Figura 8. Alinhamento múltiplo de sequência de diferentes proteínas RUV-2. Alinhamento com as proteínas RUV-2 de *N. crassa* (XP_963328.1), de *S. cerevisiae* (Q12464.1) de *H. sapiens* (NP_003698.1) e de *A. nidulans* (Q5BGK3.2). Os motivos estruturais descritos para esta proteína são mostrados com linhas vermelhas.

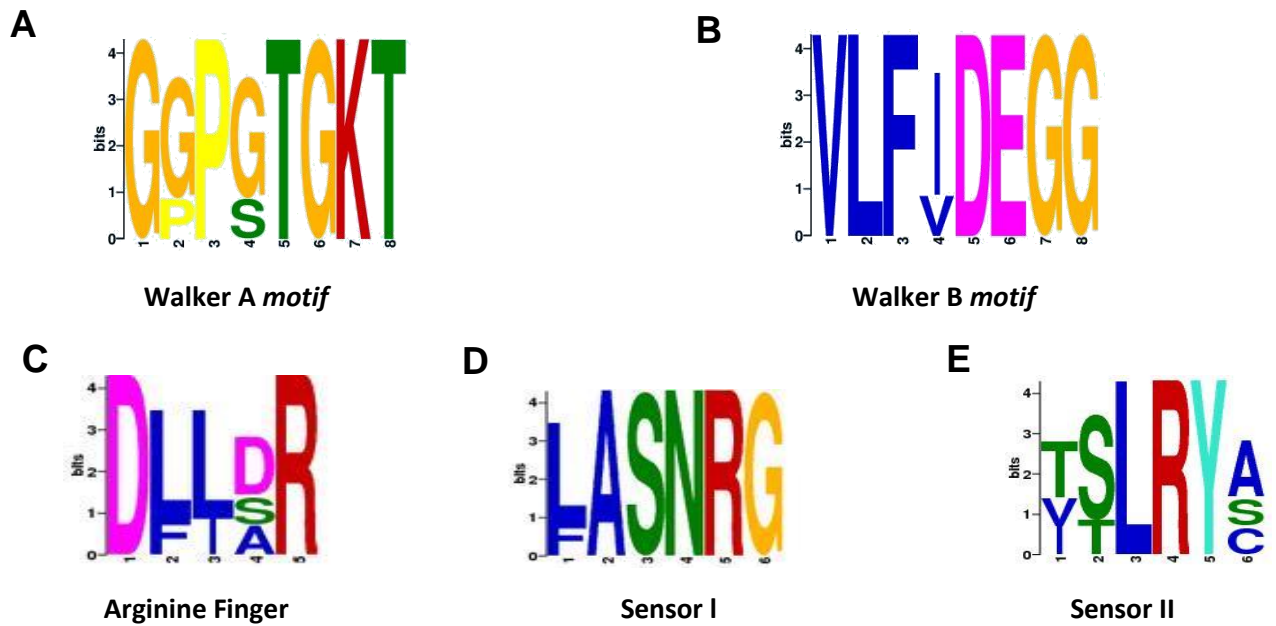


Figura 9. Análises de conservação dos resíduos aminoácidos nos motivos descritos na proteína RUV-1 (A, B, C, D, E). Motivos das proteínas RUV-1 dos organismos: *N. crassa*, *S. cerevisiae*, *H. sapiens* e *A. nidulans*, analisados com o programa MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/>).

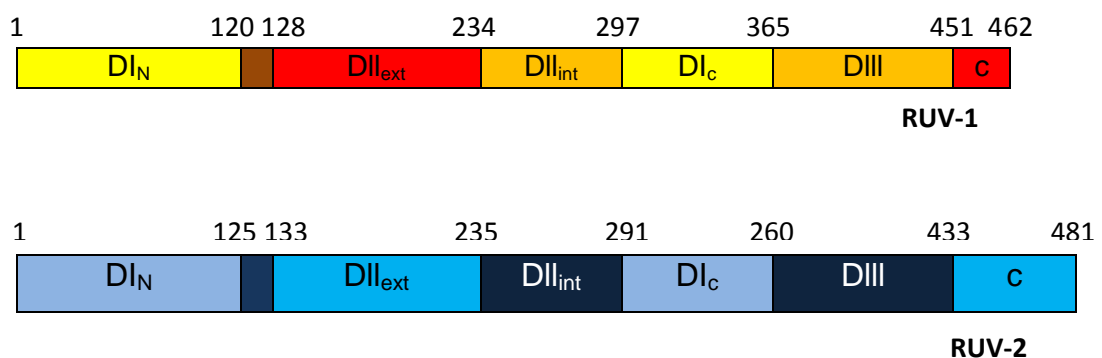


Figura 10. Representação esquemática dos motivos estruturais das proteínas RUV-1 e RUV-2. Esquema da organização estrutural das proteínas, com os diferentes domínios e com os correspondentes aminoácidos da extremidade N- a C-terminal.

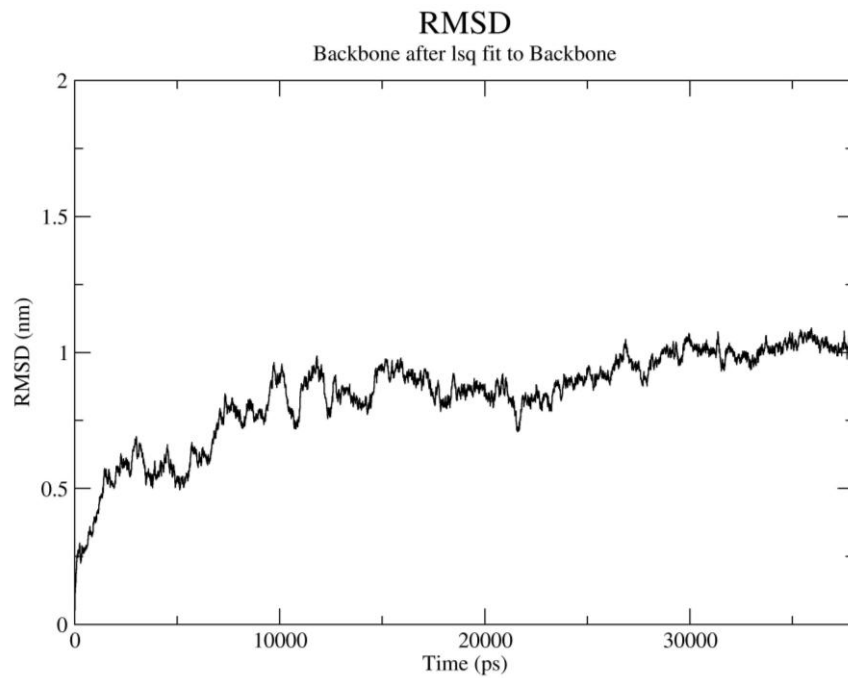


Figura 11. Gráfico de RMSD. O gráfico mostra a média do desvio médio quadrático dos átomos da cadeia principal em função do tempo. A tendência é um aumento da distancia média entre os átomos da cadeia principal e parece que tende a se estabilizar no 1.

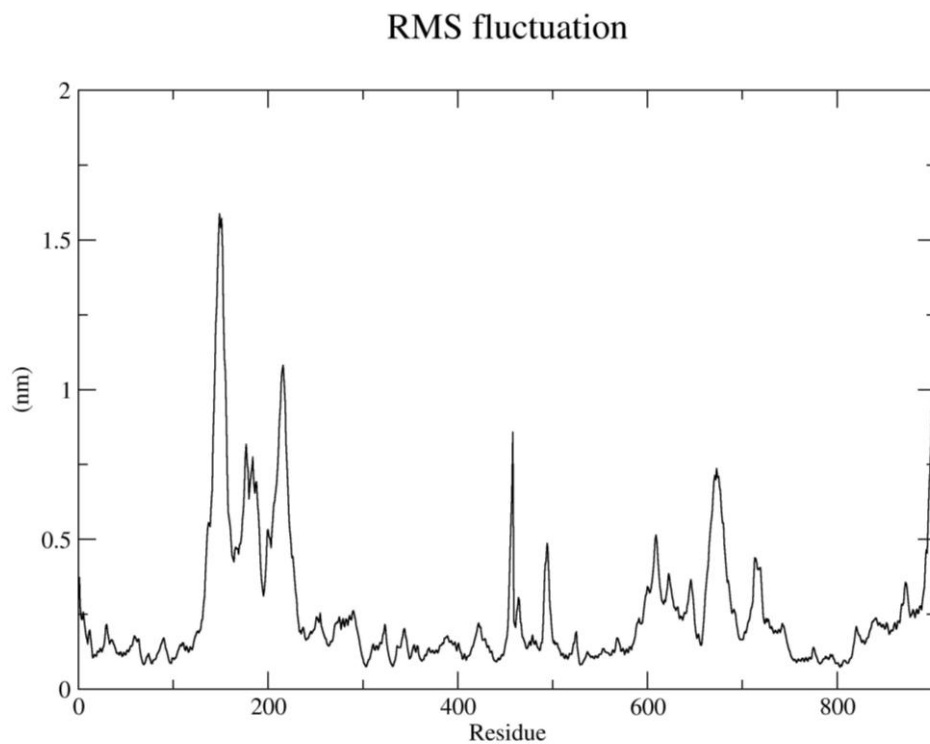


Figura 12. Gráfico de RMSF. A figura representa a média do desvio de cada resíduo. Os picos fora da média pertencem a regiões nas proteínas com conformação secundária não definida onde os resíduos tem mais liberdade de movimento.

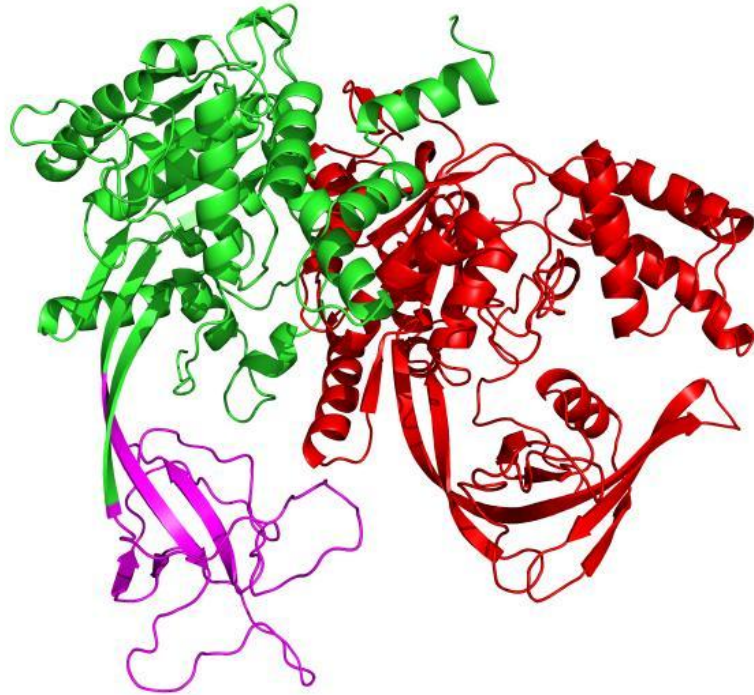


Figura 13. Representação tridimensional do PDB final gerado pela dinâmica molecular. Usando o *software* de visualização de moléculas PyMoL 1.3, a figura mostra o dímero RUV-1/2. Em verde a proteína RUV-1, em vermelho a RUV-2, e em magenta a região de alta flutuação no gráfico de RMSF que pertence a proteína RUV-1.

2- Análises de expressão gênica

2.1- Expressão dos genes *ruv-1/2* em diferentes condições ambientais

O objetivo das análises de expressão gênica tinha como alvo os genes *ruv-1* e *ruv-2* na condição de estresse térmico, uma vez que a proteína RUV-1 foi identificada previamente como uma proteína capaz de ligar ao promotor do gene *gsn* (codifica para a enzima glicogênio sintase) durante estresse térmico. Com o objetivo de investigar se a expressão dos genes poderia ser influenciada em outras condições de estresse, as análises também foram realizadas em condição que induzem estresse oxidativo. Os reagentes escolhidos para a realização das análises foram o paraquat, um herbicida de fórmula química $C_{12}H_{14}N_2$, a menadiona (2-metil, 1,4-naftoquinona), que assim como o paraquat, na maioria dos casos, gera ânions superóxidos (O_2^-) na mitocôndria e induz, desta maneira, estresse oxidativo por aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio (ZUH et al., 2013). A

menadiona está mais direcionada a gerar ânions superóxidos no citoplasma. O peróxido de hidrogênio, foi também utilizado. Este reagente é uma espécie reativa de oxigênio naturalmente produzido devido às reações enzimáticas nas células, pode ainda atravessar membranas, o que possibilita a ocorrência de reações com alvos biológicos distantes de seu local de formação.

Como a proteína RUV-2 participa juntamente com a proteína RUV-1 em vários complexos proteicos desempenhando diferentes funções celulares, nosso objetivo foi analisar se o gene *ruv-2* sofre ou não o mesmo tipo de regulação que o gene *ruv-1*. Os resultados da expressão gênica do gene *ruv-1*, no estresse térmico, mostraram que a 45°C a expressão do gene foi significativamente maior que a 30°C, o que mostra que pode existir uma regulação positiva da expressão do gene nessa condição de estresse, o que corrobora nossa hipótese inicial (Figura 14A). Quando analisamos os resultados da expressão do gene *ruv-1* sob condições de estresse oxidativo, observamos que apenas na presença de menadiona a expressão do gene sofreu uma diminuição significativa, o que indica que a transcrição do gene é reprimida na presença deste composto (Figura 14B). Os agentes que induzem estresse oxidativo não mostraram efeito na expressão do gene. Em relação aos experimentos de expressão gênica do gene *ruv-2* como gene alvo, os resultados mostraram que a expressão do gene não foi modulada na presença de agentes que induzem estresse oxidativo e também não foi modulada sob estresse térmico, diferentemente do que foi observado para o gene *ruv-1* (Figuras 14C e 14D).

2.2- Estudo da regulação pós-transcricional dos genes *ruv-1* e *ruv-2*

Como salientado na Introdução, quando este trabalho teve início o DNA codificante para o gene *ruv-1* já havia sido clonado e a proteína recombinante em *E. coli* havia sido produzida. Neste trabalho, foi realizada a clonagem e expressão do da gene *ruv-2*. Os resultados de sequenciamento de DNA do clone inicialmente isolado mostrou o segundo intron do gene *ruv-2* estava presente em todos os plasmídeos analisados. É importante salientar que este gene possui dois introns pequenos e próximos, localizados no início da ORF. A manutenção deste intron introduz um codon STOP prematuro, o qual leva à produção uma proteína truncada de 98 resíduos de aminoácidos ao invés dos 482. Isto explica a não visualização da

produção da proteína recombinante nas primeiras análises realizadas. Como o tamanho do inserto correspondente ao

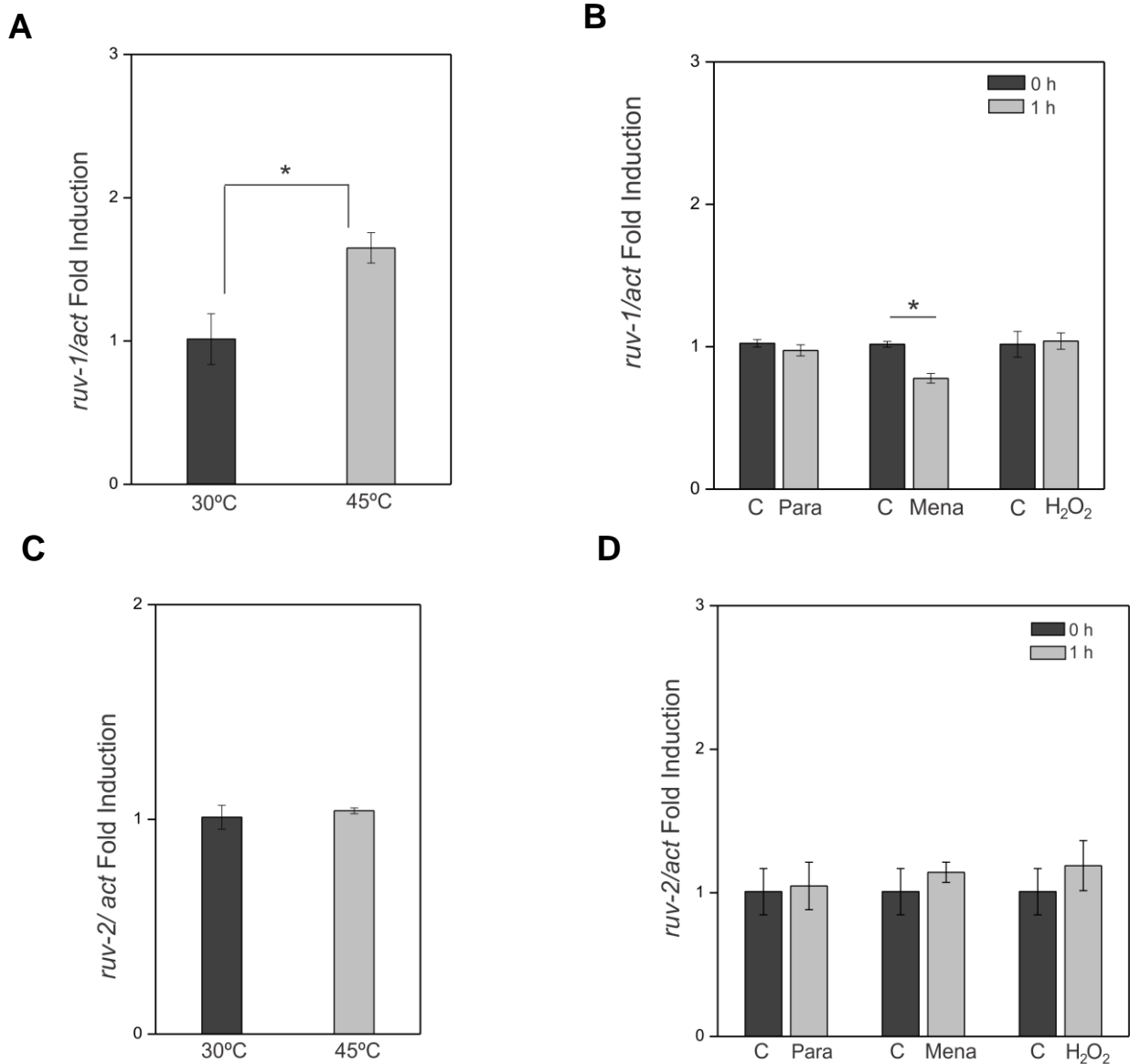


Figura 14. Análises da expressão dos genes *ruv-1* e *ruv-2*. (A e C) Expressão dos genes *ruv-1* e *ruv-2* na temperatura de crescimento normal do fungo (30°C) e após indução de estresse térmico (45°C) durante 30 min. (B e D) Expressão dos genes sob condições que induzem estresse oxidativo. O gene da actina foi utilizado como gene de referência nos análises de RT-qPCR ($p > 0,01$).

RNA processado é de 1.446 pb, no gel de agarose não foi possível diferenciar os 76 pb a mais correspondente ao intron. É importante salientar que a amostra de cDNA utilizada na clonagem corresponde a uma amostra de micélio submetido a estresse térmico (transferência de 30°C para 45°C). O resultado da manutenção do intron

sugeriu que o processamento incompleto poderia ser resultado da condição experimental utilizada. Em função disto, decidimos analisar amostras de cDNAs do fungo crescido em diferentes condições de estresse, com o objetivo de verificar se a presença do intron foi devida a alguma condição de crescimento do fungo que levou ao fenômeno de *intron retention*.

Intron retention é um tipo de *splicing* alternativo conhecido por ser um importante mecanismo regulador da atividade biológica das proteínas, tanto em plantas como animais (MASTRANGELO et al., 2005). Tem sido estudado em *N. crassa* como um fenômeno que ajuda a regular a expressão de alguns genes (STRANDBERG et al., 2013). Também o estresse induzido por temperatura tem sido descrito como fenômeno que pode desencadear este tipo de *splicing* em plantas, como trigo (MASTRANGELO et al., 2005).

Para fazer estas análises, foram desenhados oligonucleotídeos, os quais delimitam a região onde os dois introns se encontram no gene e levam à amplificação de um fragmento de DNA de tamanho menor e suficiente para a visualização do intron. A região amplificada tem aproximadamente 279 pb, o suficiente para visualizar a presença ou ausência de uma região de 75 e 79 pb correspondentes a ambos introns, respectivamente. Foram selecionadas amostras de cDNAs obtidas a partir de micélio do fungo crescido na condição de choque térmico (45°C), na presença de agentes que induzem estresse oxidativo, tais como paraquat, menandiona e peróxido de hidrogênio e DTT, um agente indutor de estresse de retículo endoplasmático. Como controle foi utilizado cDNA do fungo crescido sem estresse (30°C) e DNA genômico. Foram feitas reações de PCR com todas as amostras de cDNA e os produtos das amplificações foram separados em eletroforese de agarose 2%.

Os resultados mostraram que o transcrito de *ruv-2* sofreu um processamento incompleto apenas na condição de estresse térmico, permanecendo o segundo intron no mRNA maduro (Figura 15A 15C). Após estes resultados, analisamos se o evento de *intron retention* acontecia no transcrito do gene *ruv-1*. Oligonucleotídeos que delimitaram a região onde ficam os introns do gene *ruv-1* foram desenhados. A região amplificada tem aproximadamente 396 pb e os introns possuem 96 pb o primeiro e 107 pb o segundo. O cDNA do fungo submetido a choque térmico foi usado como molde e os controles foram o cDNA do fungo em condições de crescimento normal e o DNA genômico. Os produtos das reações de PCR foram

separados e analisados por eletroforese e os resultados mostraram que o transcrito de *ruv-1* sofre um processamento completo em condições de choque térmico e o mRNA maduro não possui nenhum dos introns (Figura 15B). Foi concluído que apenas o transcrito *ruv-2* é parcialmente processado e apenas na condição de estresse térmico.

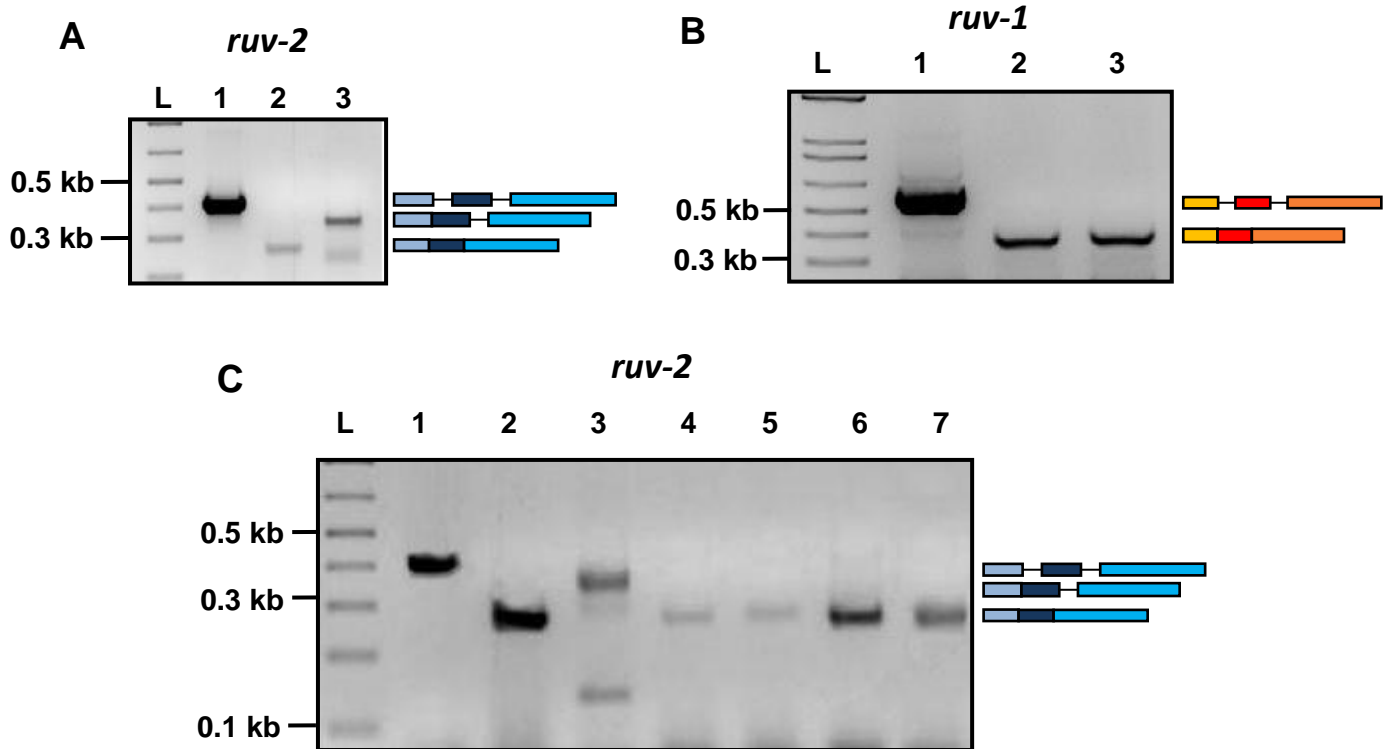


Figura 15. Amplificações dos transcritos *ruv-1* e *ruv-2* a partir de cDNAs submetidos a diferentes condições de estresse. (A) Amplificação do transcrito do gene *ruv-2* usando como molde o DNA genômico, o cDNA obtido de RNA em condições de crescimento controle (30°C) e em condições de choque térmico (45°C) (1, 2 e 3, respectivamente). **(B)** Amplificação do transcrito *ruv-1* usando como molde o DNA genômico (1), o cDNA obtido do RNA em condições de crescimento controle e em condições de choque térmico (1, 2 e 3, respectivamente). **(C)** Amplificação do transcrito *ruv-2* usando como molde o DNA genômico, o cDNA obtido do RNA em condições de crescimento controle, choque térmico, e micélio crescido na presença de paraquat, menadiona, peróxido de hidrogênio e DTT (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, respectivamente).

3- Expressão das proteínas RUV-1/2 durante choque térmico

Este ensaio foi realizado para analisar a expressão das proteínas RUV-1/2 durante o choque térmico. Para isto, micélio do fungo crescido à temperatura normal de crescimento, 30°C (T0) e após 30 min, 1 h, 2 h, e 4 h de crescimento a 45°C foi utilizado para a extração de proteínas. Após eletroforese, as proteínas foram

transferidas para uma membrana de PVDF e reveladas com anticorpos anti-RUVBL1 e anti-RUVBL2 comerciais através da técnica *Western blot*. A figura 16 mostra que as proteínas RUV-1 e RUV-2 estão presentes até quatro horas de choque térmico. As diferenças de intensidades nas bandas, acreditamos que são devidas a efeitos de natureza técnica. O experimento foi realizado varias vezes, modificando o protocolo, entretanto o experimento realizado com alta concentração de proteína total (375 µg) foi realizado uma única vez, portanto necessita ser confirmado. Uma quantidade muito maior de proteínas comparada com a quantidade habitual foi analisada, uma vez que com menor quantidade não foi observado a marcação das bandas. A exposição da membrana com o reagente de revelação e depois ao filme de Raios X também foi aumentada consideravelmente, o que pode ter provocado o aparecimento de pequenas manchas no filme.

Este resultado foi inesperado, pois está incompatível com os resultados de expressão do gene *ruv-2* na condição de choque térmico. Como descrito anteriormente, nesta condição o RNA primário é parcialmente processado o que leva à manutenção do segundo intron e a produção de uma proteína truncada contendo apenas os primeiros 98 resíduos de aminoácidos. A proteína RUV-2 não deveria ter sido observada nos longos tempos de exposição do micélio ao choque térmico (3 e 4 h).

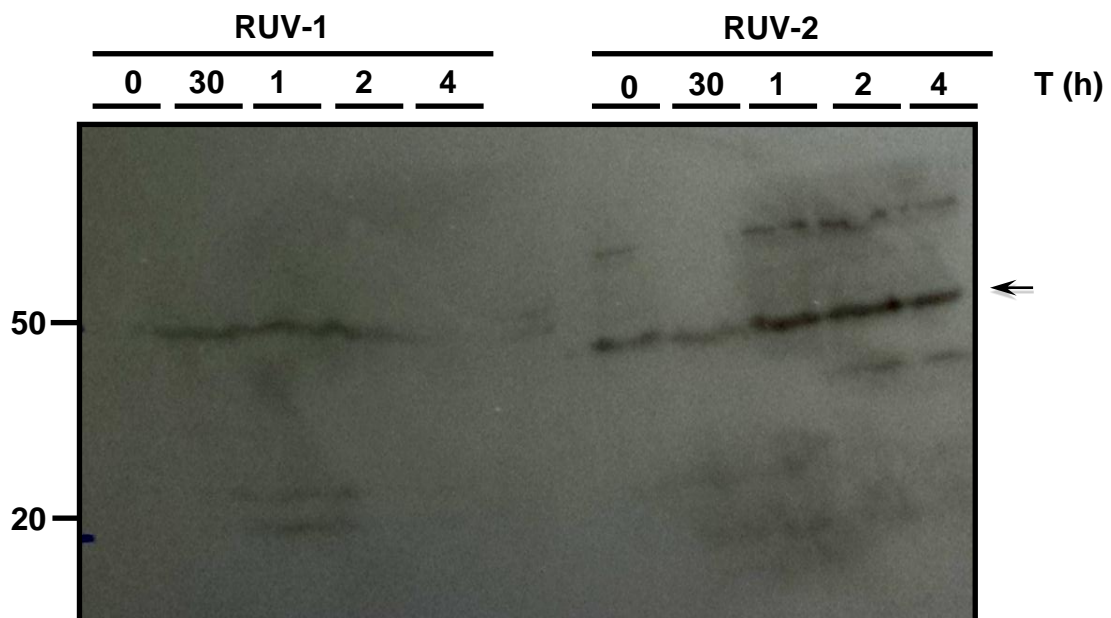


Figura 16. Análise por *Western blot* das proteínas RUV-1/2 durante choque térmico. Foram analisadas as proteínas do fungo a 30°C (0), e 30 min (30), 1 h (1), 2 h (2) e 4 h (4) depois do choque térmico. As proteínas (375 µg de proteína total) foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas e reveladas usando os anticorpos comerciais anti-RUV-1 e anti-RUV-2 e o ensaio de peroxidase. A seta indica as proteínas RUV-1 e RUV-2.

4- Produção das proteínas recombinantes RUV-1/2

4.1- Clonagem e produção no vetor pET28a

Para as análises de caracterização estrutural das proteínas é necessária a produção das mesmas de forma recombinante. A clonagem foi inicialmente realizada no vetor pET28a com dois objetivos: primeiro, queríamos produzir a proteína recombinante e testar várias condições de indução para obter a quantidade máxima possível de proteína na fração solúvel, pois o vetor permite a produção da proteína fusionada a uma cauda de poli-His. A cauda de poli-His é essencial para o reconhecimento pelos anticorpos anti-His e para a purificação, uma vez que a mesma será realizada por cromatografia de afinidade, em uma coluna cuja resina contém níquel, o qual interage com os anéis imidazol dos resíduos de His.

Para fazer a construção, oligonucleotídeos específicos foram desenhados para a amplificação da ORF. O DNA molde da reação foi obtido por RT-PCR a partir de RNA total extraído de micélio do fungo submetido a choque térmico (transferência de 30°C para 45°C). Inicialmente, a melhor temperatura de hibridização dos oligonucleotídeos foi definida em uma reação de PCR com gradiente de temperatura, utilizando DNA genômico. Com a temperatura de anelamento já definida, a ORF foi amplificada, através de PCR, obtendo-se um fragmento do tamanho de 1.446 pb. Este seria o tamanho esperado considerando o tamanho da proteína (482 resíduos de aminoácidos) (Figura 17A). Após digestão do fragmento de DNA e do vetor pET28a, o fragmento foi inserido nos sítios *NdeI* e *BamHI*.

Após clonagem, algumas colônias de cada construção plasmidial foram analisadas através da digestão dos seus DNAs plasmidiais. Para a construção pET28-*ruv-2*, o DNA plasmidial foi digerido com a enzima *XbaI* e com o par *NdeI/BamHI* (enzimas utilizadas na clonagem) (Figura 17B e 17C). Considerando o plasmídeo pET28-*ruv-2*, existem dois sítios de clivagem para a enzima de restrição *XbaI*, um deles está localizado 97 pb antes do começo do inserto e outro 327 pb após do começo do inserto. Portanto, a digestão com esta enzima tem que liberar dois fragmentos de DNA, um de 424 pb e outro de 6391 pb já que o tamanho do vetor sem o inserto é de 5369 pb. O resultado da digestão foi visualizado com uma eletroforese em gel de agarose 0,8 % (Figura 17B) e concluímos que a construção está correta, pois foram liberados fragmentos de tamanho esperado. O resultado da

digestão com *NdeI/BamHI* pET28-*ruv-2* também liberou um fragmento de DNA de tamanho esperado, aproximadamente de 1446 pb (Figura 17C). As clonagens foram consideradas positivas, e as bactérias contendo os clones foram armazenadas a -80°C.

A construção pET28-*ruv-2* foi também confirmada por sequenciamento de DNA. As sequências obtidas foram analisadas no software BioEdit Sequence Alignment Editor. O cassete sequenciado foi alinhado com a sequência do gene *ruv-2* utilizando ClustalW2 e BoxShade. Ao fazer o alinhamento das sequências de DNA identificamos que o inserto havia sido corretamente inserido nas extremidades, entretanto o alinhamento mostrou que na posição de 312 pb após o ATG havia uma sequência adicional de 75 pb. Ao conferir a sequência obtida para o gene *ruv-2* com a base de dados de *N. crassa*, percebemos que a sequência adicional de 75 pb correspondia a um dos dois introns que o gene possui. Portanto, durante a obtenção do cDNA, os dois introns não foram completamente removidos. Devido a este problema, novas construções plasmidiais foram construídas usando a mesma metodologia e os mesmos sítios de restrição, mas utilizando diferentes preparações de cDNAs. As novas construções foram analisadas por análises de restrição, usando as mesmas enzimas, e as consideradas positivas (resultados não mostrados) foram enviadas para sequenciamento. As sequências analisadas que continham o intron foram descartadas e as sequências sem o intron foram selecionadas para a produção da proteína.

Para a produção da proteína recombinante, o plasmídeo pET28-*ruv-2* foi utilizado para transformar a linhagem de *E. coli* cepa BL21(DE3)PLysS. Inicialmente, o ensaio de indução da proteína recombinante foi realizado juntamente com um controle positivo (pET28a-3482), o qual produz a proteína RUV-1 (produto da ORF NCU03482) de *N. crassa* com tamanho de 50 kDa, e um controle negativo (pET28a vazio). As condições de indução foram 28°C, 0,4 mM de IPTG durante 4 h. O resultado obtido, quando analisado em gel corado com Coomassie, permitiu observar a produção da proteína (Figura 18A). Quando as mesmas amostras foram analisadas por *Western blot*, utilizando o anticorpo anti-His, observamos algumas bandas, as quais correspondem ao tamanho esperado (aproximadamente 52 kD) (Figura 18B).

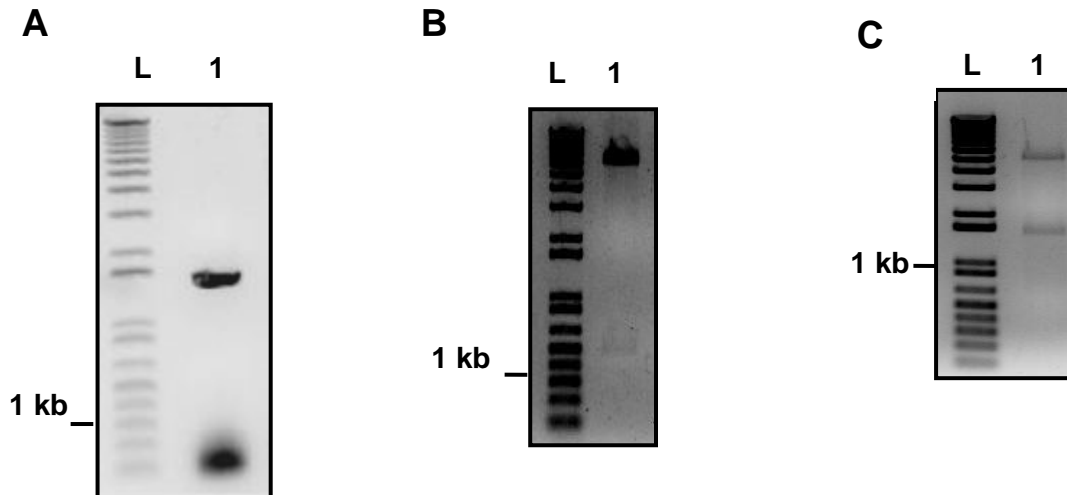


Figura 17. Amplificação do gene *ruv-2* e análises de restrição. A caneleta **L** mostra o indicador de peso molecular e a caneleta **1**, dependendo do caso, o gene ou o inserto digerido. **(A)** Amplificação do gene *ruv-2*. **(B)** Digestão da construção pET28-*ruv-2* com a enzima de restrição *Xba*I. **(C)** Digestão da construção pET28a-*ruv-2* com as enzimas *Nde*I/*Bam*HI. As análises foram realizadas por eletroforese em gel de agarose 0.8% em tampão TAE.

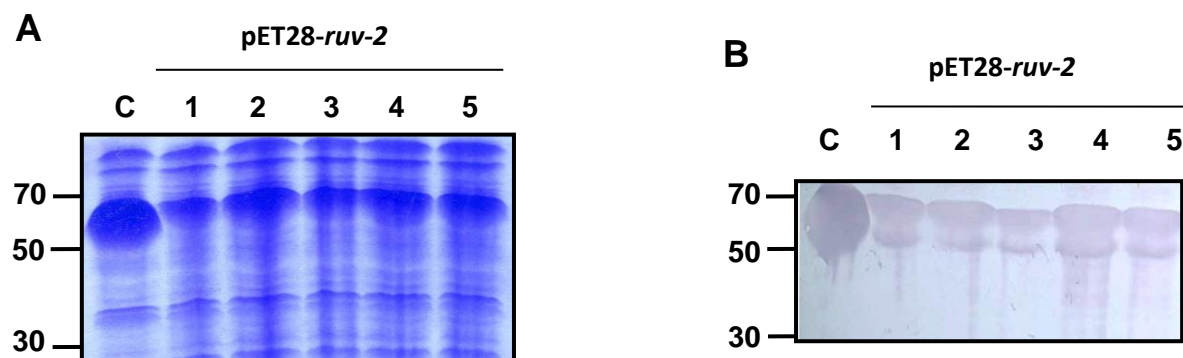


Figura 18. Expressão e análise por *Western blot* da proteína RUV-2 recombinante. Análise da expressão a partir de células transformadas com o vetor pET28-*ruv-2*. A canaleta **C** é o controle positivo, pET28a-*ruv-1*. **(A)** Gel de poliacrilamida corado com *Coomassie blue*. **(B)** *Western blot* utilizando o anticorpo anti-His.

Uma vez a proteína estava sendo produzida, foram realizados experimentos para analisar sua solubilidade. Estes experimentos foram realizados segundo descrito em Materiais e Métodos, primeiro usando uma condição de indução padrão, que consiste em 4 h a 28°C 150 rpm com uma concentração final de IPTG de 0.4 mM. Após a sonicação foi separado o sobrenadante contendo fração solúvel e o precipitado com os restos celulares. As proteínas das amostras sobrenadante e precipitado foram quantificadas e analisadas gel de poliacrilamida 12 % e por *Western blot* utilizando anticorpo anti-His. Os resultados do *Western blot* mostraram que parte da proteína recombinante na condição de indução acima mencionada ficava na fração insolúvel (Figura 19).

Nessa condição de indução a proteína provavelmente está formando corpos de inclusão, ou agrupações de proteínas insolúveis. Os mecanismos que explicam a formação dos corpos de inclusão não são completamente entendidos. Tem algumas variáveis que influenciam nessa formação, como limitações de solubilidade, tamanho da proteína e tipo do promotor do plasmídeo de expressão.



Figura 19. Análise da solubilidade proteína RUV-2 recombinante. Foram testados três clones diferentes expressando a proteína RUV-2 utilizando o vetor pET28-*ruv-2*. De cada um dos clones foi analisada a fração não induzida, **N.I** (antes da adição do IPTG), a fração solúvel, **S**, e o precipitado, **P**. As proteínas na membrana foram marcadas com anticorpo anti-His conjugado com fosfatase alcalina usando a técnica de *Western blot*.

Tem sido demonstrado que estes corpos podem ser devidos a interações hidrofóbicas entre proteínas enoveladas parcialmente, sem dar tempo suficiente para se enovelar corretamente. Um metabolismo celular muito ativo, produzido por algumas condições de temperatura e agitação altas são vários parâmetros que promovem agregação de proteínas recombinantes como corpos de inclusão. Frente a estas considerações, foram testadas três condições de indução diferentes, mas nesta vez usando as linhagens de bactérias produtoras das proteínas RUV-1 e RUV-2. A primeira condição testada foi a 150 rpm, 12°C durante 24 h com uma concentração final de IPTG de 0,4 mM. A segunda foi a 150 rpm, 25°C durante 8 h com uma concentração final de 0,4 mM, e na terceira os cultivos foram mantidos a 150 rpm, 30°C durante 4 h com uma concentração final de IPTG de 0,1 mM. Os resultados obtidos estão mostrados na figura 20.

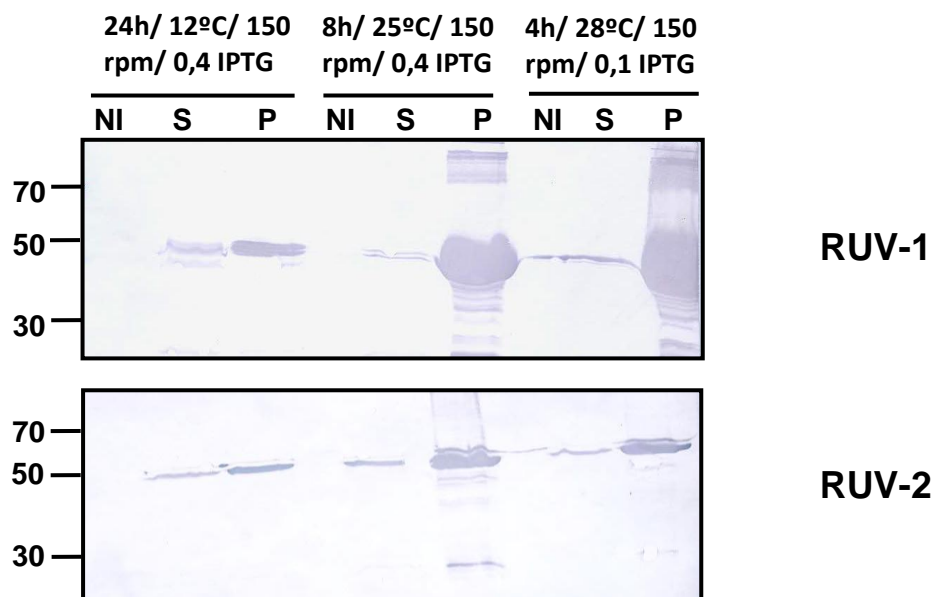


Figura 20. Análise da solubilidade das proteínas RUV-1 e RUV-2. Três condições de indução diferentes foram testadas com a linhagem produtora BL21(DE3)pLysS contendo as construções pET28a-*ruv-1* e pET28a-*ruv-2*. Foram analisadas a fração não induzida **N.I** (antes da adição do IPTG), o sobrenadante **S** e o precipitado **P**. As proteínas foram separadas por eletroforese e transferidas para membrana, em seguida foram incubadas com um anticorpo anti-His conjugado com fosfatase alcalina, usando a técnica de *Western blot*.

Os resultados dos ensaios de solubilidade utilizando diferentes condições de indução não foram muito promissores. Na figura podemos observar que a maior parte das proteínas continuava no precipitado. Parece que as melhores condições para a expressão da proteína solúvel será para a RUV-1 a condição de 12°C e para RUV-2 a condição de 25°C. Tendo em conta estes resultados, e que para fazer os experimentos de caracterização estrutural das proteínas é preciso uma boa quantidade da proteína solúvel, decidimos clonar ambos genes num plasmídeo bicistronico. Este tipo de plasmídeo permite a co-expressão das proteínas e aumenta a solubilidade delas devido à formação de complexos mais estáveis.

4.2- Clonagem e produção no vetor pETDuet-1

Como descrito anteriormente, o vetor de expressão pETDuet-1 permite a expressão concomitante de proteínas que sabidamente interagem entre si. Nossa estratégia consistiu em realizar duas construções: a construção pETDuet-1-*His-ruv-1-ruv-2* e a construção pETDuet-1-*His-ruv-2-ruv-1*. Com estes dois plasmídeos, teremos duas populações de células, cada uma delas produzindo ambas as proteínas, mas só uma das proteínas, em cada população, vai ser produzida na forma fusionada a His. Para verificar a interação entre ambas, a produção das proteínas será analisada futuramente usando um gel de poliacrilamida nativo. Neste tipo de géis as proteínas não são desnaturadas, portanto podemos ver complexos proteicos, e estimar o tamanho deles.

Até o momento, foram realizadas as clonagens dos genes *ruv-1* e *ruv-2*, ambos inseridos no MCS2 do vetor pETDuet-1, portanto para a produção de ambas proteínas na forma não fusionada. Foram feitas duas análises de restrição para a construção pETDuet-1-*ruv-2*. Na primeira, a enzima *Hind* III foi usada para a digestão, esta enzima corta no vetor 155 pb antes de começo do inserto, e dentro do mesmo na posição 472 pb. Tendo em conta que o vetor possui 5.420 pb, a digestão teria que dar duas bandas, uma de 627 pb e outra de 6.239 pb. A outra digestão foi feita usando a enzima *Nde*I, enzima usada para a inserção do gene, e *Eco*RV, enzima que corta 21 pb depois do final do gene, tendo assim a digestão que liberar um fragmento de 1.467 pb e outro de aproximadamente 5.399 pb. Para a construção pETDuet-1-*ruv-1*, a análise de restrição foi feita com as mesmas enzimas que foram usadas anteriormente para inserir o gene, ou seja *Nde*I e *Kpn*I, liberando um fragmento de 1.377 pb e outro de 5.420 pb. Os produtos da digestão foram

analisados em eletroforese em gel de agarose 0.8%. Todos os tamanhos das bandas tinham o tamanho esperado (resultados não mostrados), portanto continuamos para testar a produção da proteína recombinante. Quando trabalhando com um vetor biscistronico é recomendável depois de fazer a primeira inserção de um gene testar a produção da proteína recombinante.

Nossa estratégia de clonagem não inclui nenhum *tag* na proteína codificada pelo gene que fica no MCS2. O ensaio de indução da proteína recombinante foi realizado juntamente com um controle positivo (pET28-*ruv-1* no caso da construção pETDuet-1-*ruv-1* e pET28-*ruv-2* no caso de pETDuet-1-*ruv-2*) e um controle negativo (amostra antes da indução com IPTG). As condições de indução foram 28°C, 0,4 mM de IPTG durante 4 h. Como ambos os genes foram inseridos nessa mesma região do vetor, para analisar a produção da proteína, o gel foi corado com Coomassie Blue. O resultado obtido permitiu observar apenas a produção da proteína recombinante RUV-1 (Figura 21). Outras tentativas foram realizadas e, até o momento, não temos um clone produtor de ambas proteínas.

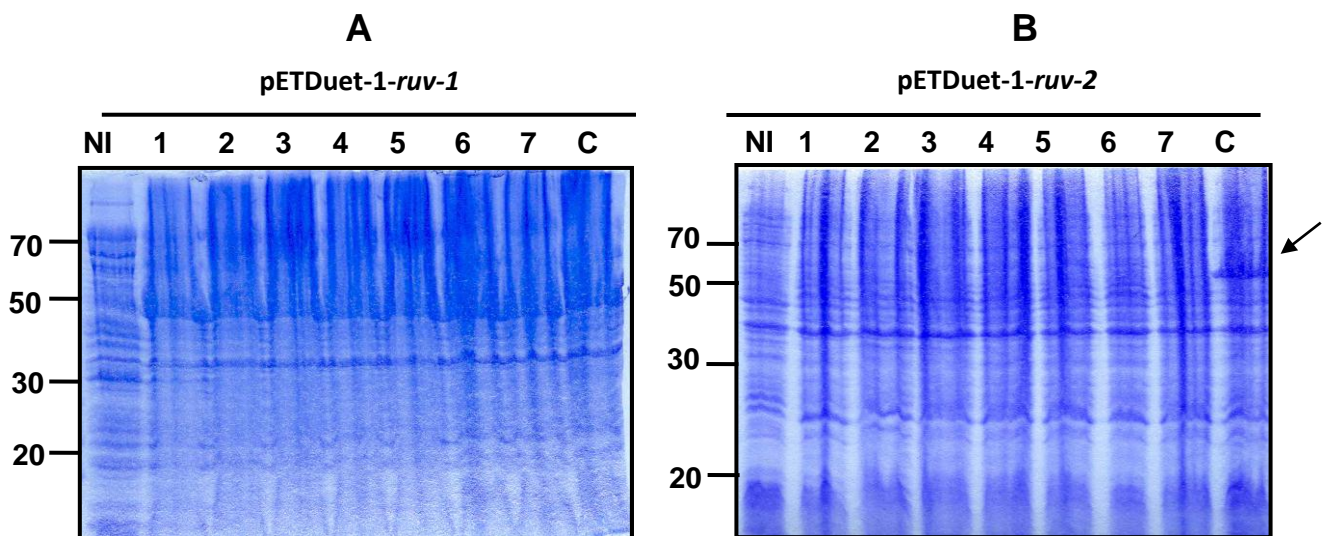


Figura 21. Análises da expressão das proteínas RUV-1 e RUV-2 utilizando os plasmídeos pETDuet-1-*ruv-1* e pETDuet-1-*ruv-2*. Foram testados 7 clones de cada construção, 1 ao 7 e não induzido, NI (sem IPTG) e o controle positivo (pET28a-3482) (A) Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie blue*, mostrando a produção da proteína RUV-1. (B) Gel de poliacrilamida 12% corado com *Coomassie blue*, mostrando a não produção da proteína RUV-2.

5- Inserção do *tag V5* no locus genômico de *N. crassa*

Para realizar a busca de proteínas parceiras da RUV-1 foi preciso realizar a construção de uma linhagem para a produção da proteína fusionada a um *tag* (epítipo V5) para ser utilizada nas reações de imunoprecipitação com a utilização do anticorpo anti-V5. O *tag V5* corresponde a um peptídeo de 15 resíduos de aminoácidos, para o qual existem anticorpos comerciais. Um esquema do procedimento utilizado está apresentado em Materiais e Métodos. Inicialmente, foram amplificados dois fragmentos de DNA, a partir do DNA genômico do fungo, correspondentes às regiões *upstream* e *downstream* ao *stop códon* (correspondentes a 1.066 e 1.059, respectivamente), os quais estão mostrados na Figura 22A e 22B. Para a amplificação do cassete de DNA contendo a sequência codificadora do *tag V5* bem como a sequência codificadora do gene *hph*, foram utilizados os oligonucleotídeos 10XGLY-F e LOXP-R e o vetor pZERO-V5-*hph* como DNA molde. Foi obtido um fragmento com 1,5 kb (não mostrado). Os fragmentos de interesse foram excisados do gel de agarose, purificados e quantificados. A síntese dos *splitmarkers* foi realizada a partir da técnica *fusion-PCR* (veja esquema na Figura 5) e os fragmentos obtidos estão mostrados na Figura 22C e 22D.

Após a síntese dos *splitmarkers*, foi feita a cotransformação de conídios da linhagem FGSC#9719 (*mus52::bar⁺*), como descrita em Materiais e Métodos. Seis transformantes foram aleatoriamente selecionados e crescidos em tubos com meio VM sólido acrescido de glicose 1,5% e higromicina (marca de seleção introduzida). Todos cresceram na presença do antibiótico. Um deles foi selecionado para o cruzamento com uma linhagem selvagem (FGSC#2489) para a obtenção do homocário. Em seguida, seis ascósporos foram aleatoriamente selecionados novamente com higromicina. Uma linhagem resultante foi comparada fenotipicamente com a linhagem selvagem, mostrando ausência de alterações fenotípicas entre as linhagens, o que indicou que a inserção do *tag V5* não modificou o desenvolvimento da linhagem (Figura 23).

O DNA foi extraído e utilizado para análise de inserção do *tag* por PCR e *Western blot*. Para isso, foi feita uma reação de PCR com os oligonucleotídeos *hph_SM-F* e 3482Lox-RP. Estes oligonucleotídeos amplificam a região que vai desde o gene que confere a resistência à higromicina até 1.000 pb após o códon STOP do gene *ruv-1*. Esta PCR foi realizada com o DNA genômico da linhagem

selecionada e com o DNA genômico da linhagem selvagem. Para esta última, a PCR não deveria amplificar nada já que a linhagem selvagem não possui no genoma o gene de resistência à higromicina. O resultado da PCR foi analisado em eletroforese em gel de agarose 0.8%, o qual mostrou a ausência do fragmento de DNA na linhagem selvagem e a presença do mesmo na linhagem com o *tag V5* (Figura 24 B).

Para fazer a confirmação por *Western blot*, as proteínas totais do fungo da linhagem transformada e da selvagem foram extraídas, quantificadas e 100 μ g de proteína total de cada linhagem foram aplicados em um gel de poliacrilamida 12%. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e a membrana incubada com o anticorpo primário anti-V5 e depois com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase. A membrana foi revelada seguindo o protocolo descrito em Materiais e Métodos. Os resultados mostraram claramente uma banda apenas na linhagem transformada, com Massa Molecular de aproximadamente 50 kDa, correspondente à proteína RUV-1. Podemos afirmar então a produção da proteína fusionada RUV-1::V5 (Figura 24A).

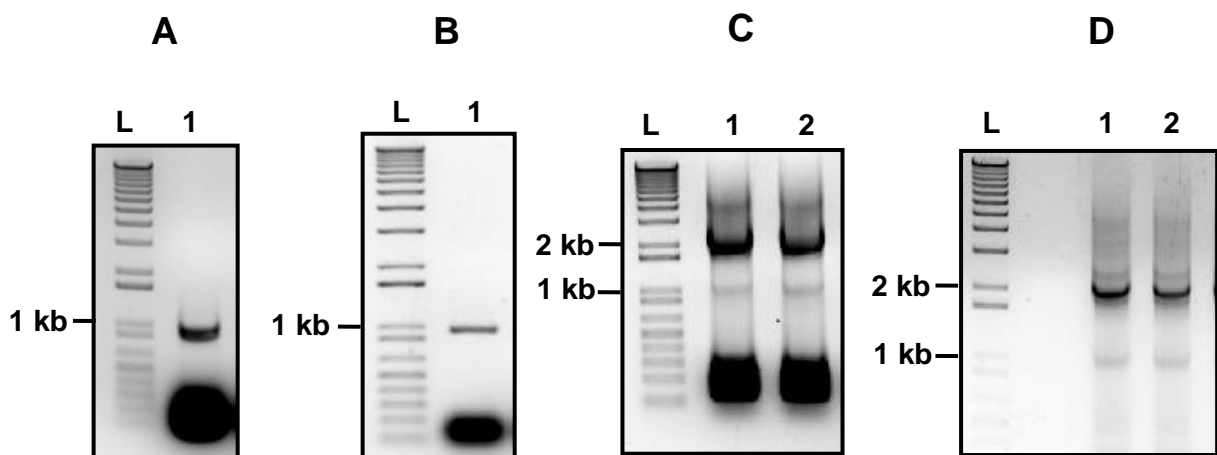


Figura 22. Amplificação dos fragmentos de DNA utilizados para a inserção do *tag V5*. (A e B) Geis de agarose 0.8% mostrando o resultado das PCR amplificadas do DNA genômico, região homologa 5' e 3' respectivamente. Gel de agarose 0.8% mostrando o resultado da *fusion-PCR* do *splitmarker 5'* (C) e do *splitmarker 3'* (D).

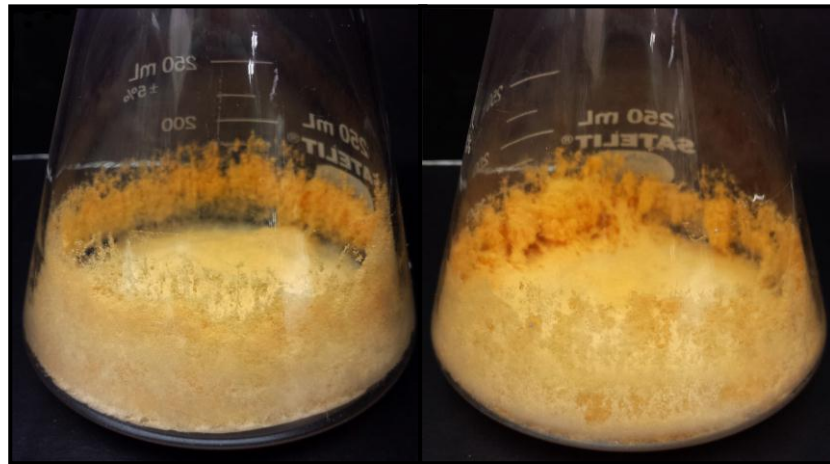


Figura 23. Comparação fenotípica entre as linhagens. Crescimento da linhagem selvagem FGSC#2489 sem *tag* (esquerda) e da linhagem produzindo RUV-1::V5 (direita). Ambas foram crescidas em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio sólido VM 2% sacarose.

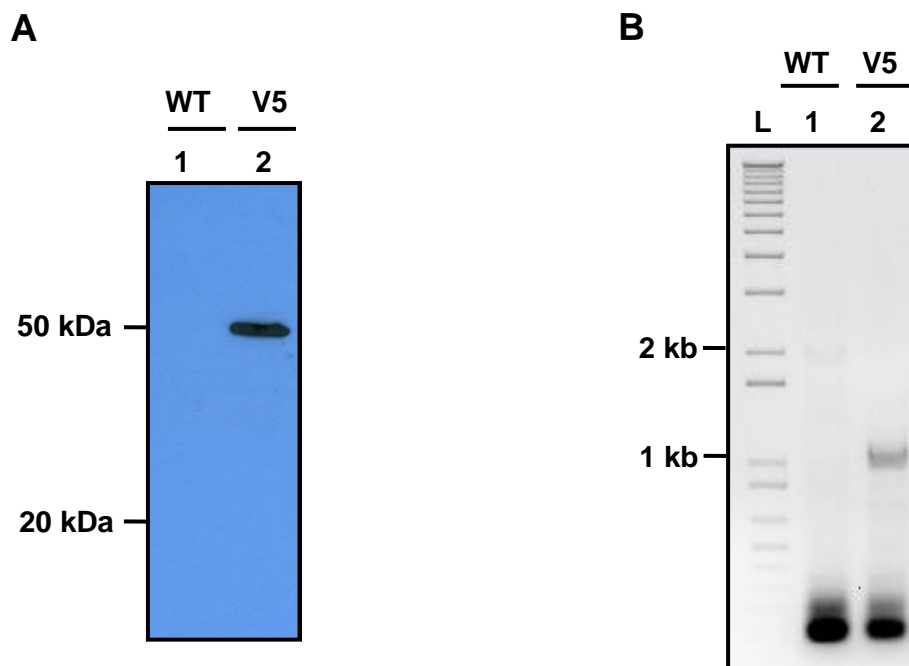


Figura 24. Confirmação da presença do *tag* V5 na linhagem transformada. (A) *Western blot* da linhagem selvagem e da linhagem transformada usando como anticorpo primário o anticorpo anti-V5, e como secundário anticorpo de mouse conjugado com peroxidase. (B) PCR da linhagem selvagem e da linhagem transformada usando os oligonucleotídeos *hph*_SM-F e 3482Lox-RP.

6- Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP-qPCR)

O experimento de ChIP-qPCR foi proposto uma vez que o resultado do ensaio de EMSA, realizado anteriormente no laboratório, mostrou que a proteína RUV-1 tinha a capacidade de se ligar *in vitro* no promotor do gene *gsn*. Para verificar se a ligação ocorre também *in vivo* o ensaio de ChIP-qPCR foi realizado com o objetivo de verificar se as proteínas RUV-1/2 seriam capazes de se ligar à mesma região do promotor *gsn*. Primeiramente, o experimento foi realizado com a linhagem RUV-1::V5, a qual produz a proteína nativa fusionada ao *tag* V5 e cuja expressão está sob o controle do promotor nativo. No experimento foram utilizados anticorpos anti-V5. É importante salientar que este experimento foi realizado com amostras de micélio crescido a 30°C e submetido ao choque térmico de 45°C. Nesta última condição seria esperada a ligação da proteína ao promotor do gene.

Os resultados de dois experimentos diferentes foram negativos para a ligação da proteína RUV-1::V5 no promotor de *gsn* nas condições analisadas. Uma possível explicação para o resultado negativo foi que o epítipo V5 é relativamente pequeno (14 aminoácidos) e talvez a proteína RUV-1 ao formar estruturas multiproteicas (como descrito para nas proteínas ortólogas) não deixaria o epítipo V5 suficientemente exposto para ser reconhecido pelo anticorpo, e assim não haveria a imunoprecipitação. O mesmo experimento foi realizado então com duas linhagens diferentes produzindo ambas proteínas fusionadas ao *tag* GFP: RUV-1::GFP e RUV-2::GFP. Estas linhagens foram construídas no laboratório, por outro estudante com o objetivo de analisar a localização celular de ambas proteínas na condição de estresse térmico. Ambas proteínas se localizam preferencialmente no núcleo nesta situação.

A figura 25 mostra os resultados obtidos para cada uma das proteínas e para cada fragmento de DNA. As proteínas RUV-1/2 não foram capazes de se ligar em nenhuma das condições analisadas em nenhum dos fragmentos de DNA analisados (STRE 1 e STRE 2). Em todos os casos o Input mostra a amplificação, mas nem a amostra “No Ab” nem o IP mostram amplificações. Com estes resultados podemos supor dois cenários; o primeiro que as condições experimentais não sejam as mais adequadas para fazer o experimento, ou que realmente nestas condições as proteínas não estão ligando no promotor do gene *gsn*. Finalmente, é importante salientar que as proteínas RUV-1 e RUV-2 não são fatores de transcrição, portanto

não apresentam domínios clássicos de ligação a DNA. Entretanto, apresentam domínios de ligação a nucleotídeos e, muito provavelmente, devem interagir com DNA quando na forma oligomérica, uma característica estrutural destas proteínas.

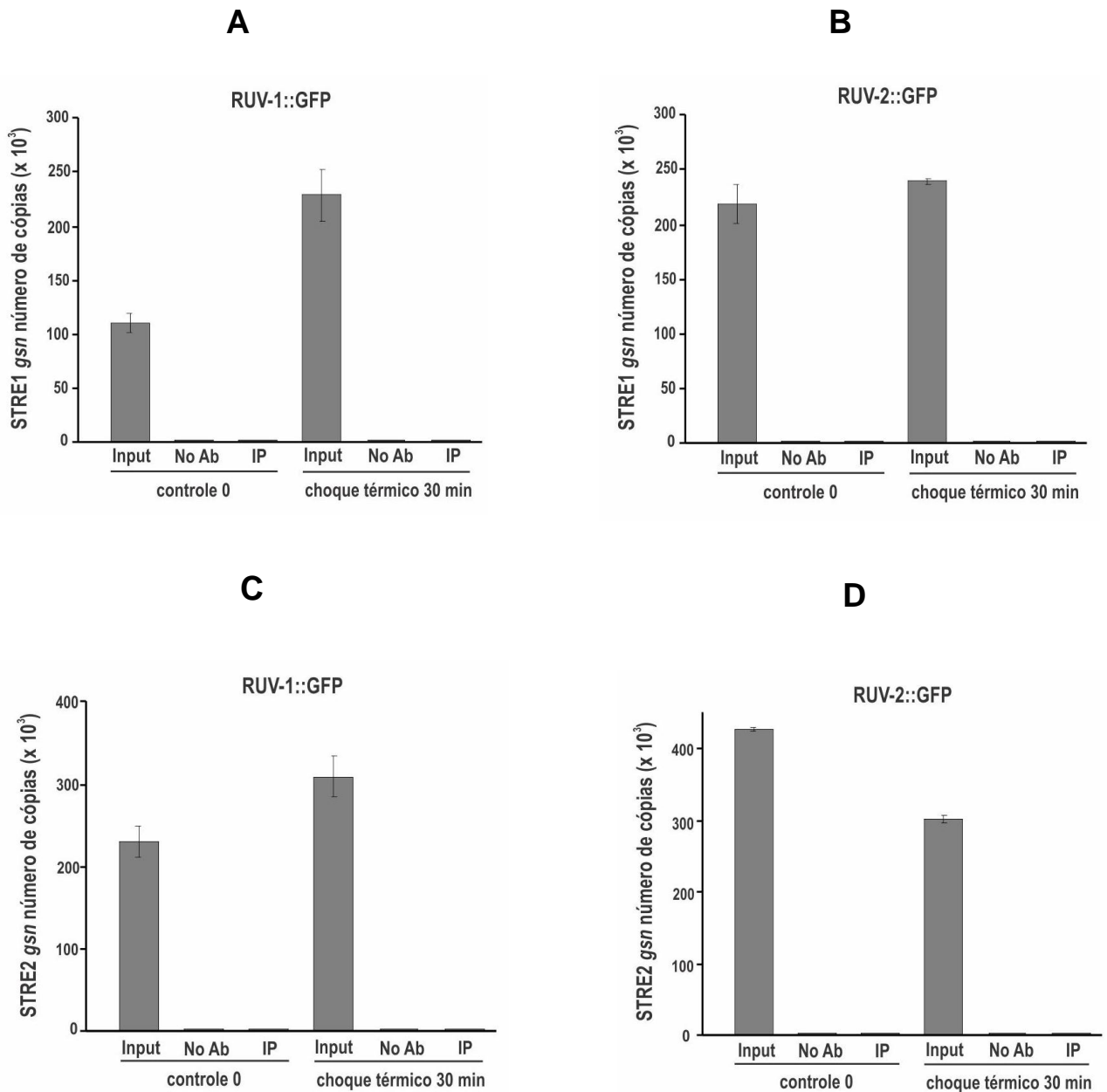


Figura 25. Ensaio de ChIP-qPCR. As reações de imunoprecipitação de cromatina foram realizadas com micélio crescido a 30°C (controle 0) e submetido ao choque térmico de 45°C por 30 min. O Input corresponde a amostra do DNA depois da sonicação (controle positivo), No Ab, amostra não imunoprecipitada (controle negativo) e IP amostra imunoprecipitada com anticorpo. As figuras **A** e **B** mostram os resultados da ligação das proteínas RUV-1 e RUV-2 respectivamente no motivo de DNA STRE 1. As figuras **C** e **D** mostram os resultados da ligação das proteínas RUV-1 e RUV-2 respectivamente no motivo de DNA STRE 2. As amostras de DNA foram analisadas por qPCR conforme descrito em Materiais e Métodos.

7- Ensaio de *Western blot* com as amostras de CHIP

Quatro diferentes amostras de cada condição ambiental (30 e 45°C) foram removidas ao longo do ensaio de imunoprecipitação de cromatina. As amostras foram: uma amostra corresponde ao extrato após lise celular (amostra T0), amostra após a sonicação e centrifugação (amostra Son), amostra correspondente ao *flow through* obtida após a imunoprecipitação (amostra FT) e, finalmente, foram separados 20 µl de cada amostra depois da lavagem com TES. Se a proteína fosse detectada na amostra amostra FT significaria que não foi imunoprecipitada com o anticorpo e se fosse detectada na amostra após lavagem com TES indicaria que o anticorpo reconheceu o *tag* imunoprecipitando a proteína.

Os resultados representados na figura 26 mostram a presença da proteína nas diferentes etapas do processo nas duas condições ambientais. Não foi detectada a presença da proteína na amostra T0 (canaletas 1 e 2), provavelmente devido a baixa quantidade de proteína. Por outro lado, a proteína foi identificada nas amostras após sonicação e imunoprecipitação (FT) coletadas no ensaio realizado na condição de 30°C (canaletas 3 e 5). A presença da proteína na amostra FT indicou que parte da proteína foi perdida no *flow through*, ou seja não se ligou na resina. Nas amostras IP podemos ver bandas de hibridização de dois tamanhos diferentes, uma de aproximadamente 20 kDa, muito provavelmente correspondente à cadeia leve do anticorpo utilizado e outra com massa molecular de aproximadamente 50 kDa, a qual coincide com o tamanho da proteína RUV, mas também com o tamanho da cadeia pesada do mesmo anticorpo (canaletas 7 e 8). Devido a este resultado não podemos afirmar que a proteína foi imunoprecipitada. Este é o resultado de apenas um experimento realizado.

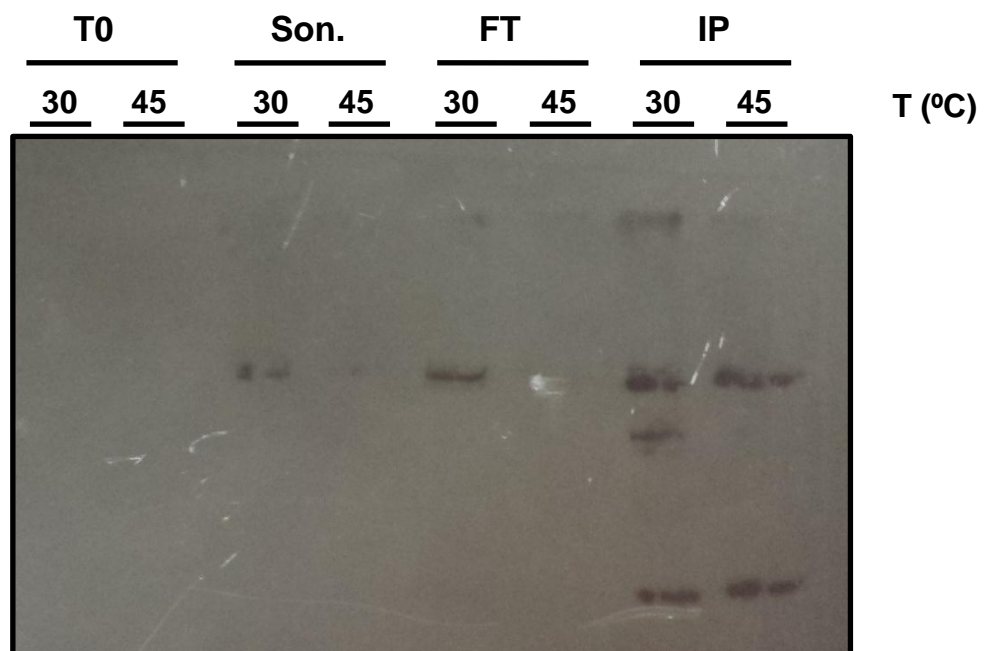


Figura 26. Western blot mostrando a proteína RUV-1 em diferentes etapas do ensaio de **ChIP**. Amostras de proteínas extraídas de micélios obtidos após crescimento a 30°C e 45°C. Cerca de 100 µg de proteína total foram aplicadas em cada canaleta. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE, transferidas para membranas de nitrocelulose e reveladas com anticorpo anti-V5. Amostras **T0**, alíquotas retiradas depois da lise, **Son.**, amostras coletadas depois da sonicação, **FT**, amostras coletadas do *flow through* após imunoprecipitação e **IP**, amostras após imunoprecipitação.

CONCLUSÕES

As principais conclusões deste trabalho são:

- Em relação à expressão dos dois genes analisados (*ruv-1* e *ruv-2*), podemos concluir que o gene *ruv-1* mostrou um aumento na sua expressão quando o fungo foi submetido à condição de choque térmico, portanto muito provavelmente a proteína RUV-1 possa estar envolvida na resposta do fungo a esta condição de estresse. A expressão do gene também mostrou ser influenciada pelo agente menadiona, o qual induz estresse oxidativo. Por outro lado, o gene *ruv-2* não mostrou ser regulado nas condições estressantes analisadas neste trabalho, indicando que provavelmente a proteína RUV-2 não atua na resposta do fungo a uma situação de estresse.
- Os resultados da modelagem e dinâmica molecular mostraram uma possível interação entre as proteínas RUV-1 e RUV-2, revelando também os possíveis resíduos envolvidos nesta interação.
- O transcrito primário do gene *ruv-2* mostrou ser parcialmente processado apresentando um fenômeno conhecido como *intron retention*, onde o segundo intron do gene não é removido. Este fenômeno somente foi observado quando o fungo foi submetido ao estresse térmico e não às outras formas de estresse. A manutenção do intron leva à introdução de códon stop prematuro durante a tradução, levando à síntese de uma proteína truncada contendo apenas 98 resíduos de aminoácidos. Esta proteína truncada pode não apresentar função biológica ou desempenhar uma função ainda não descrita.
- Embora o fenômeno de *intron retention* indique que a proteína RUV-2 não está sendo produzida a 45°C na sua forma original, os resultados da expressão proteica durante o choque térmico mostraram que a proteína continua sendo produzida no tamanho esperado até 4 h de exposição ao choque térmico. Outros experimentos devem ser realizados para entender melhor o fenômeno.
- As proteínas recombinantes RUV-1 e RUV-2 foram expressas individualmente em *E. coli*. Entretanto, a expressão simultânea das duas proteínas, necessária para análises de interação proteína-proteína ainda não foi obtida.

- Resultados obtidos previamente no laboratório mostraram que a proteína RUV-1 recombinante se liga *in vitro* a fragmentos de DNA contendo o motivo STRE, o qual está presente nos promotores de genes responsivos a choque térmico. A questão de se a mesma proteína seria capaz de se ligar *in vivo* ao mesmo fragmento de DNA foi analisada. Entretanto, um resultado preliminar não mostrou a ligação da proteína ao fragmento de DNA. Em função disto, temos que considerar que a proteína não é um fator de transcrição, portanto, não apresenta um motivo de ligação a DNA. O fato de não termos detectado a ligação DNA-proteína, através do ensaio utilizado, não significa que a mesma não se liga *in vivo*, ela pode se ligar à cromatina e para isto é necessário outro tipo de ensaio.

REFERÊNCIAS

- BAUER, A. et al. Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of β -catenin signalling activity. **EMBO J.**, v. 19, n. 22, p. 6121-6130, 2000.
- BROOKS, B. R. et al. A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **J. Comput. Chem.**, v. 4, p. 187-217, 1983.
- CHEN, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. **Acta Crystallogr. D: Biol. Crystallogr.**, v. 66, p. 12-21, 2010.
- CHEUNG, K. L. et al. Alternative oligomeric states of the Yeast Rvb1/Rvb2 Complex induced by Histidine Tags. **J. Mol. Biol.**, v. 404, n. 3, p. 478-492, 2010a.
- CHEUNG, K. L. et al. Comparison of the multiple oligomeric structures observed for the Rvb1 and Rvb2 proteins. **Biochem. Cell Biol.**, v. 88, n. 1, p. 77-88, 2010b.
- COLOT, H. V. et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, n. 27, p. 10352-10357, 2006.
- CUPERTINO, F. B. et al. Ambient pH controls glycogen levels by regulating glycogen synthase gene expression in *Neurospora crassa*. New insights into the pH signaling pathway. **PLoS One**, v. 7, n. 8, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0044258.
- DAVIS, R. H. et al. Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. **Methods Enzymol.**, v. 17, part A, p. 79-143, 1970.
- DUNLAP, J. C. et al. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Adv. Genet.**, v. 57, p. 49-96, 2007.
- ELBEIN, A. D. et al. New insights on trehalose: a multifunctional molecule. **Glycobiology**, v. 13, n. 4, p. 17R-27R, 2003.
- FISER, A.; SALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. **Methods Enzymol.**, v. 374, n. 461-491, 2003.
- FISER, A.; DO, R. K; SALI, A. Modeling of loops in protein structures. **Protein Sci.**, v. 9, n. 9, p. 1753-1773, 2000.
- 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**, v. 272, n. 5, p. 550-561, 2004.
- FREITAS, F. Z.; CHAPEAUROUGE, A.; PERALES, J. A systematic approach to identify STRE binding proteins of the gsn glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. **Proteomics**, v. 8, n. 10, p. 2052-2061, 2008.
- GALAGAN, J. E. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, 2003.

- GARCEAU, N. Y. et al. Alternative initiation of translation and time-specific phosphorylation yield multiple forms of the essential clock protein frequency. **Cell**, v. 89, n. 3, p. 469-476, 1997.
- GARTNER, W. et al. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. **Cell Motil. Cytoskeleton**, v. 56, n. 2, p. 79-93, 2003.
- GONÇALVES, R. D. et al. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 10, n. 11, 2011. doi:10.1074/mcp.M111.007963.
- GORYNIA, S.; BANDEIRAS, T. M.; PINHO, F. G. Structural and functional insights into a dodecameric molecular machine - the RuvBL1/RuvBL2 complex. **J. Struct. Biol.**, v. 176, n. 3, p. 279-291, 2011.
- GRIBUN, A. et al. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-dependent DNA helicases that form a heterohexameric complex. **J. Mol. Biol.**, v. 376, n. 5, p. 1320-1333, 2008.
- GRIGOLETTO, A. et al. The ATPase activity of reptin is required for its effects on tumor cell growth and viability in hepatocellular carcinoma. **J. Mol. Cancer Res.**, v. 11 n. 2, p. 133-139, 2013.
- GUO, J. et al. Biochemical methods used to study the gene expression and protein complexes in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Methods Mol. Biol.**, v. 638, p. 189-200, 2010.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Anal. Biochem.**, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.
- HOLMES, D. H. et al. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. **Anal Biochem.**, v. 114, n. 1, p. 193-197, 1981.
- HONDA, S.; SELKER, E. U. Tools for fungal proteomics: multifunctional neurospora vectors for gene replacement, protein expression and protein purification. **Genetics**, v. 182, n. 1, p. 11-23, 2009.
- IZUMI, N.; YAMASHITA, A.; OHNO, S. Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. **Nucleus**, v. 3, n. 1, p. 29-43, 2012.
- JOHANNES S.; BIEGERT A.; LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Res.**, v. 33, p. W244-W248, 2005.
- JONSSON, Z. O. et al. Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. **Mol. Cell**, v. 16, n. 3, p. 465-477, 2004.
- KAKIHARA, Y.; SAEKI, M. The R2TP chaperone complex: its involvement in snoRNP assembly and tumorigenesis. **Biomol. Concepts**, v. 5, n. 6, p. 513-520, 2014.

KANEMAKI, M.; KUROKAWA, Y.; MATSU-URA, T. TIP49b, a new RuvB-like DNA helicase, is included in a complex together with another RuvB-like DNA helicase, TIP49a. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 32, p. 22437-22444, 1999.

LAKOMEK, K. et al. Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ ATPases Rvb1-Rvb2. **Structure**, v. 23, p. 483-495, 2015.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

MACHADO-PINILLA, R. et al. Mechanism of the AAA+ ATPases pontin and reptin in the biogenesis of H/ACA RNPs. **RNA**, v. 18, n.10, p. 1833-1848, 2012.

MASTRANGELO, A. M. et al. Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. **Planta**, v. 221. p. 705-715, 2005.

MATIAS, P. M. et al. Crystal structure of the human AAA+Protein RuvBL1. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 50, p. 38918-38929, 2006.

NANO, N.; HOURY, W. A. Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B**, v. 368, n. 1617, p. 20110399, 2013. doi:10.1098/rstb.2011.0399.

NELSON, D. L.; COX, M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005. 1294 p.

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

NINOMIYA, Y. et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 33, p. 12248-12253, 2004.

NOVENTA, M. A. et al. Effect of temperature shifts on the activities of *Neurospora crassa* glycogen synthase, glycogen phosphorylase and trehalose-6-phosphatase synthase. **FEBS Letters**, v. 378, p. 32-36, 1996.

NWAKA, S.; HOLZER, H. Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.**, v. 58, p. 197-237, 1998.

OLDFIELD, C. J.; DUNKER A. K. Intrinsically disordered proteins and intrinsically disordered protein regions. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 83, p. 553-584, 2014.

PAULA, R. de et al. Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the gsn cDNA. **Mol. Genet. Genomics**, v. 267, n. 2, p. 241-253, 2002.

PERKINS, D. D. et al. *Neurospora* at the millennium. **Fungal Genet. Biol.**, v. 3, n. 3, p. 153-167, 2000.

QIU, X. B. et al. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 43, p. 27786-27793, 1998.

RAJU, N. B. Meiosis and ascospore in *Neurospora crassa*. **Eur. J. Cell. Biol.**, v. 23, n. 1, p. 208-223, 1980.

ROSENBAUM, J. et al. The emergence of the conserved AAA+ ATPases Pontin and Reptin on the signaling landscape. **Sci. Signal**, v. 6, n. 266, 2013.
doi:10.1126/scisignal.2003906.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. v. 1, paginação irregular.

SCHULTE, U. et al. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*. **J. Biotechnol.**, v. 94, n. 1, p. 3-13, 2002.

SOKOLOVSKY, V. et al. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41-43, 1990.

SPRINGER, M. L. et al. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa*. **Genes Dev.**, v. 3, n. 4, p. 559-571, 1989.

STRANDBERG, R. et al. Coexistence and expression profiles of two alternative splice variants of the pheromone receptor gene *pre-1* in *Neurospora crassa*. **Arch Microbiol.**, v. 195, n. 10/11, p. 773-780, 2013.

TORREIRA, E. et al. Architecture of the pontin/reptin complex, essential in the assembly of several macromolecular complexes. **Structure**, v. 16, n. 10, p. 1511-1520, 2008.

URIBARRI, M. et al. A new biomarker panel in bronchoalveolar lavage for an improved lung cancer diagnosis. **J. Thorac. Oncol.**, v. 9, n. 10, p. 1504-1522, 2014.

VOGEL, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora crassa*. **Microbiol. Genet. Bull.**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, T. Y. et al. A predicted protein-protein interaction network of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Mol. BioSyst.**, v. 7, n. 7, p. 2278-2285, 2011.

ZHANG, X. et al. Cytoplasmic expression of pontin in renal cell carcinoma correlates with tumor invasion, metastasis and patient's survival. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0118659.

ZHU, J. et al. Transcriptomic profiling-based mutant screen reveals three new transcription factors mediating menadione resistance in *Neurospora crassa*. **Fungal Biol.**, v. 117, n. 6, p. 422-430, 2013.