UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO HIPOTÉTICO NO FUNGO *Neurospora crassa*

KELY BRAGA IMAMURA

Dissertação de Mestrado
2015

Instituto de Química

KELY BRAGA IMAMURA

CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DE UM FATOR DE TRANSCRIÇÃO HIPOTÉTICO NO FUNGO *Neurospora crassa*

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: **Profª. Dra. Maria Célia Bertolini**

Araraquara
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Imamura, Kely Braga
I31c Caracterização funcional de um fator de transcrição hipotético no fungo *Neurospora crassa* / Kely Braga Imamura – Araraquara : [s.n], 2015
107 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Maria Célia Bertolini
Coorientador: Rodrigo Duarte Gonçalves

1. Genética microbiana. 2. Morte celular. 3. Engenharia genética. 4. *Neurospora crassa*. 5. Estress oxidativo. I. Título.

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

KELY BRAGA IMAMURA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Araraquara, 03 de setembro de 2015.

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. MARIA CÉLIA BERTOLINI (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara

Prof. Dr. IRAN MALAVAZI
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde / UFSCar / São Carlos

Profª. Drª. MÁRCIA ELIANA DA SILVA FERREIRA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / USP / Ribeirão Preto

DADOS CURRICULARES

Dados Pessoais:

Nome: Kely Braga Imamura
Nome em citações bibliográficas: Imamura, K. B.
Formação: Tecnóloga em Alimentos (2011) e Especialista em Microbiologia (2013)
Sexo: Feminino
Endereço Profissional:
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP)
Instituto de Química (IQ)
Av. Prof. Francisco Degni, n° 55
Quitandinha – 14800-900
Araraquara-SP, Brasil.
Endereço eletrônico: kely.imamura@hotmail.com

Atividades acadêmicas relevantes no período do mestrado

- Trabalhos apresentados em congressos no período

Imamura, K. B., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Boni, A. C., and Bertolini, M. C. A novel transcription factor regulating oxidative stress response in *Neurospora crassa.* In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Foz do Iguaçu, PR, 2015

Imamura, K. B., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Montenegro-Montero, A. Larrondo, L. F., and Bertolini, M. C. The *Neurospora crassa* ORF NCU01629 encodes a transcription factor likely involved in the regulation of oxidative stress and apoptosis, 2014. In: 60º Congresso Brasileiro de Genética, Guarujá, SP.

Imamura, K. B., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Boni, A. C., Montenegro-Montero, A. Larrondo, L. F., and Bertolini, M. C. Involvement of the *Neurospora crassa* transcription factor encoded by ORF NCU01629 in the regulation of oxidative stress and apoptosis,

2014. *International Symposium on Fungal Stress*, São José dos Campos, SP.

- Resumos publicados em anais de Congressos

Imamura, K. B., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Boni, A. C., and Bertolini, M. C. A novel transcription factor regulating oxidative stress response in *Neurospora crassa.* In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Foz do Iguaçu, PR, 2015

Candido, T.S.; Imamura, K.B.; Bertolini, M.C. The ORF NCU08772 encodes a putative multifunctional cyclin involved in germination, cell cycle regulation, calcium stress, and glycogen metabolism in *Neurospora crassa*. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Foz do Iguaçu, PR, 2015

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*. In: 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, Foz do Iguaçu, PR, 2015

Mateos, PA; Imamura, KB; Bertolini, MC. Transcriptional and post-transcriptional regulation of ruv-1/2 genes under heat shock in *Neurospora crassa*. In: 61st Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindoia, SP, 2015

Imamura, K. B., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Boni, A. C., Montenegro-Montero, A. Larrondo, L. F., and Bertolini, M. C. Involvement of the *Neurospora crassa* transcription factor encoded by ORF NCU01629 in the regulation of oxidative stress and apoptosis. In: International Symposium on Fungal Stress, 2014

Imamura, K. B., Gonçalves, R. D., Cupertino, F. B., Montenegro-Montero, A. Larrondo, L. F., and Bertolini, M. C. The *Neurospora crassa* ORF NCU01629 encodes a transcription factor likely involved in the regulation of oxidative stress and apoptosis. In: 60º Congresso Brasileiro de Genética, 2014

Fernanda Z. Freitas, Pablo A. Mateos, Kely B. Imamura , Angelo J. Magro, Marcos Roberto M. Fontes & Maria Celia Bertolini. The *Neurospora crassa* NCU03482 encodes human RUVBL1 orthologous protein that binds to the Stress responsive element (STRE). In: 2nd International Workshop on Pontin and Reptin, Lisboa, Portugal, 2014.

- Cursos realizados no período

Bioestatística: Testes de hipóteses, 2015, Instituto de Biociências- Unesp- São José do Rio Preto-SP, 8h.

Fermentação Industrial- Processo de Cerveja artesanal, 2015, Instituto de Biociências- Unesp- São José do Rio Preto-SP, 8h.

RNA de interferência, RNAi, 2014, Sociedade Brasileira de Genética, 08 h.

qPCR, Análise de Expressão Gênica, 2014, Life Technologies, São Paulo-SP, 20 h.

Análise de expressão gênica de plantas: qPCR, 2014, Instituto de Biociências UNESP, Botucatu-SP, 06h

"Search for new drugs targets in Trypanosomatides", 2013, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara-SP, 8 h.

- Prêmios recebidos no período

Prêmio Silver. pôster apresentado no *International Symposium on Fungal Stress.*

Prêmio Painel- Pós-Graduação-Área: Genética de Micro-organismos. Menção honrosa no Prêmio Painel Pós-Graduação na área de Genética de Micro-organismos, Sociedade Brasileira de Genética - 61º Congresso Brasileiro de Genética.

- Participação em eventos no período

23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2015.

Workshop de sequenciamento de nova geração, 2015, Instituto de Química- Unesp-Araraquara-SP, 3h

Simpósio de Microbiologia, 2015, Instituto de Biociências- IBILCE- Unesp- São José do Rio Preto-SP, 16h

29º Reunião de Genética de Micro-organismos, 2014, Sociedade Brasileira de Genética, Guarujá, SP, 12 h.

XV Workshop de Genética, 2014. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP, 16h.

I Workshop em Empreendedorismo em Química e Biotecnologia, 2014, Instituto de Química, UNESP, Araraquara-SP, 12h.

60º Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Sociedade Brasileira de Genética, Guarujá, SP, 40 h.

International Symposium on Fungal Stress, 2014, São José dos Campos, SP, 60 h

- Artigos completos publicados em periódicos no período

Imamura, K.B.; Toni, J.C.V.; Giannoni, J.A. Ocorrência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea L*), beneficiado, no estado de São Paulo, no período de 2011 a 2012. Analytica (São Paulo), v. 75, p. 49-57, 2015.

Toni, J.C.V.; Imamura, K.B.; Hernandes, T. Caracterização Física e Química dos Efluentes Líquidos Gerados na Indústria Alimentícia da Região de Marília-SP. Analytica (São Paulo), v. 69, p. 58-66, 2014.

Artigos aceitos para publicação

Imamura, K. B.; Toni, J.C.V.; Bocche, M.A.L.; Souza, D.A.; Giannoni, J.A. Incidência de aflatoxinas no amendoim (*Arachis hypogaea L*) cru em casca da região da Alta Paulista-SP, durante o período de 2011 a 2012. Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso), 2014.

Ao meu noivo Jufner Toni, por todo amor e por sempre

acreditar que eu posso ir além .

Dedico.

"(...) Estamos apenas começando a portentosa aventura que aguarda nosso descobrimento de como as células lidam com o estresse"

Wynn et al, 1994.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Agardeço de coração à minha orientadora, Profª Drª Maria Célia Bertolini, por ter me aceitado como aluna de mestrado, ter me apoiado, confiado e acreditado no meu trabalho.

Ao pessoal do laboratório, Thiago Candido, Stela Virgílio, Ana Carolina Boni, Pablo Acera Mateos, Amanda Ventura, Fernanda Cupertino, Fernada Zanolli, aos técnicos Tarcicio e Sandra e em especial ao meu co-orientador Rodrigo Duarte Gonçalves por sempre me ajudar, me ensinar técnicas e pelas discussões sempre positivas sobre o mestrado e ao mundo da ciência: rumo ao Nobel!

Ao Profº Dr. Larrondo pelos dados de PBM e pela colaboração ao longo do trabalho.

Ao Profº Dr, Gustavo Henrique Goldman, por ter aberto as portas do seu laboratório para o *Neurospora crassa* e para que eu pudesse realizar os experimentos de microscopia e a Patria Alves de Castro, pela paciência e ajuda todo o tempo em que eu estive no laboratório da USP.

A minha família por todo apoio, carinho, amor, incentivo, e conselhos que eles me deram todos esses anos.

Agradeço com toda a minha alma ao meu noivo Jufner Toni, por seu amor, carinho, dedicação, ajuda, paciência, por ter me ensinado a mexer no Corel, montar figuras e painéis, pelo frango com macarrão do começo do mestrado e por ficado ao meu lado durante todos esses anos me apoiando e me ajudando em tudo sempre.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e a Biblioteca do Instituto de Química. A todos os funcionários da seção de pós-graduação pela paciência e colaboração.

Aos amigos que fiz em Araraquara.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida durante o período que estive desenvolvendo a pesquisa e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

Resumo

O fungo *Neurospora crassa* tem sido amplamente utilizado como organismo modelo para o estudo de alguns aspectos da biologia em eucariotos. O sequenciamento de seu genoma permitiu analisar funcionalmente diversos fatores de transcrição e, portanto, atribuir função a proteínas anotadas como hipotéticas. Neste estudo, está sendo investigado o papel funcional do produto de ORF NCU01629, um fator de transcrição que pertence à família *zinc-finger* sem homólogos funcionais nos bancos de dados de fungos filamentosos. Análises de interação DNA-proteína *in vitro* foram previamente realizadas por pesquisadores colaboradores, permitindo a identificação do seu *motif* de ligação ao DNA, bem como os genes provavelmente regulados por este fator de transcrição. A partir destes dados, estes genes foram classificados pelo FunCat. Os resultados revelaram o envolvimento do fator de transcrição em eventos celulares relacionados ao estresse oxidativo, bem como morte celular, entre outros processos celulares. Análises do crescimento radial do fungo foram realizadas em placas de Petri contendo agentes indutores de diferentes tipos de estresse, tais como osmótico, térmico e oxidativo. A linhagem mutante mostrou crescimento semelhante à linhagem selvagem, em condições de estresse osmótico (NaCl 0,1-1,5M e sorbitol 1-1,5M), pH (4,2 e 7,8) e térmico (45ºC). Entretanto, o crescimento da linhagem mutante foi influenciado quando a linhagem foi exposta a diferentes agentes indutores de EROs, como o paraquat (10 µM), menadiona (50 µM), H_2O_2 (2 mM) e farnesol (10 µM). A linhagem mutante mostrou crescimento radial reduzido, quando comparado à linhagem selvagem no tratamento com diferentes concentrações de paraquat e farnesol e aumento da resistência quando expostos a H_2O_2 e menadiona. A expressão de genes relacionados a EROs (*cat-1, cat-2, cat-3, gst-1, gst-2, sod e nox*) e genes apoptóticos (*bax, metascaspases, e p53*) foi analisada por RT-qPCR. Os resultados mostraram que o fator de transcrição está envolvido na regulação da resposta ao estresse oxidativo, controlando a expressão de todos os genes testados. O gene que codifica glutationa-S-transferase omega-1 (*GST-om*) não foi encontrado como alvo de regulação do produto da ORF NCU01629, sendo usado como controle negativo. Este gene não mostrou ser regulado pelo fator de transcrição pelas análise de RT-qPCR. A fim de avaliar a produção de EROs, após exposição à paraquat, menadiona e H_2O_2, análises foram realizadas por microscopia de fluorescência usando o reagente de 2',7'-diacetato dichlorodihydrofluorescein (H_2DCFDA). Os resultados mostraram que houve grande produção de EROs intracelular quando o fungo foi submetido a condições de estresse oxidativo. Considerando os resultados obtidos neste trabalho, o gene foi denominado *ore-1* (*oxidative stress regulator*). Análises de localização celular indicaram que a proteína ORE-1 está provavelmente localizada na mitocôndria quando as células foram expostas a estresse oxidativo.

Palavras-chave: Fator de transcrição. Morte celular. Estresse oxidativo. ChIP-qPCR. RT-qPCR. Localização celular. *Woronin body. N. crassa*

Abstract

The fungus *Neurospora crassa* has been widely used as a model organism for the study of some aspects of biology in eukaryotes. The sequencing of its genome has enabled functionally analyze various transcription factors and therefore, assign function to hypothetical proteins. In this study, we investigated the functional role of the ORF NCU01629 product, a transcription factor that belongs to the zinc-finger protein family without functional homologues in fungi database. *In vitro* analysis of DNA-protein interaction, allowed the identification of its DNA binding motif and, as a consequence, the most likely genes regulated by this transcription factor. The genes were classified by FunCat. The results revealed the involvement of the transcription factor in multiple cellular processes including the response to oxidative stress and cell death. Analyses of radial growth were performed in Petri dishes containing agents that induce different types of stress such as osmotic, thermal and oxidative. The knockout strain showed similar growth to the wild type strain when exposed to osmotic (NaCl 0,1-1,5M and sorbitol 1-1,5M), pH (4.2 and 7.8) and heat (45°C) stresses. However, growth of the knockout strain was influenced when the strain was exposed to different ROS inducing agents, such as paraquat (10 µM), menadione (50 µM), H_2O_2 (2mM) and farnesol (10 µM). The knockout strain showed reduced radial growth, compared to the wild-type strain, when exposed to different concentrations of paraquat and farnesol and increased resistance to H_2O_2 and menadione. The expression of genes related to ROS (*cat-1, cat-2, cat-3, gst-1, gst-2, sod,* and *nox*) and apoptotic genes (*bax, metascaspases,* and *p53*) were analyzed by RT-qPCR. The results showed that the transcription factor is involved in the regulation of the oxidative stress response, controlling the expression of all genes. The gene encoding glutathione-S-transferase omega-1 (*GST-om*) was not found as target of regulation by the transcription factor and was used as negative control. The expression of this gene was not regulated by the transcription factor in RT-qPCR analysis. To evaluate the production of ROS after exposure to paraquat, menadione and H_2O_2, the cells were incubated with 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) and analyzed by fluorescence microscopy. The results showed high production of intracellular ROS when cells were subjected to oxidative stress conditions. Considering the involvement of the transcription factor in oxidative stress response, the gene was named *ore-1* (*oxidative stress regulator*). Cellular localization assays indicated that the ORE-1 protein is likely localized in the mitochondria when cells are exposed to oxidative stress.

Keywords: Transcription factor. Cellular death. Oxidative stress. Cell death. ChIP-qPCR. RT-qPCR. *Woronin body.* Filamentous fungus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa*..... 27

Figura 2 - Mapa físico do plasmídio pTSL91-A..... 57

Figura 3 - Confirmação do nocaute gênico e formação de protoperitécio e peritécio da linhagem mutante na ORF NCU01629..... 64

Figura 4 - Caracterização morfológica das linhagens selvagem e mutante..... 65

Figura 5 - Identificação do domínio de ligação do fator de transcrição Δ*ore-1* de *N. crassa* através da análise de PBM..... 66

Figura 6 - Categorização Funcional (FunCat) dos potenciais alvos de Δ*ore-1*..... 67

Figura 7 - Sensibilidade da linhagem mutante (Δ*ore-1*) ao estresse osmótico em comparação à linhagem selvagem (WT)..... 69

Figura 8 - Sensibilidade da linhagem mutante (Δ*ore-1*) ao estresse térmico e de pH em comparação à linhagem selvagem (WT)..... 70

Figura 9 - Aumento do crescimento radial da linhagem (Δ*ore-1*) na presença de Mena e H_2O_2, comparada à linhagem selvagem (WT)..... 72

Figura 10 - Inibição do crescimento radial da linhagem (Δ*ore-1*) na presença de Para, comparada à linhagem selvagem (WT)..... 73

Figura 11 - Sensibilidade das linhagens selvagem (WT), mutante (Δ*ore-1*) e complementada (ORE-1::GFP) na presença de FOH..... 74

Figura 12 - Teste de sensibilidades das linhagens selvagem (WT), mutante (Δ*ore-1*) e complementada (ORE-1::GFP)..... 75

Figura 13 - Perfil de expressão dos genes **(A)** *cat-1,* **(B)** *cat-3,* **(C)** *cat-2,* **(D)** *gst-1,* **(E)** *gst-2,* **(F)** *sod,* **(G)** *nox-2,* **(H)** *bax,* **(I)** *metacaspases1-A,* **(J)** *p53,* e **(K)** *gstom-1* por RT-qPCR..... 78

Figura 14 - Perfil de expressão dos genes *cat-1, cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod, nox-2, bax, metacaspases1-A, p53,* e *gstom-1* por RT-qPCR agrupados de acordo com o agente de indução a EROs..... 80

Figura 15 - Representação esquemática dos promotores dos genes 81

identificados como alvos de regulação por ORE-1..... 83
Figura 16 - Ensaios de ChIP-qPCR..... 85
Figura 17 - Ensaios de ChIP-qPCR normalizado em relação ao controle negativo..... 89
Figura 18 - Acúmulo de EROs no interior das hifas na presença de H_2O_2, Para, Mena e FOH 91
Figura 19 - Acúmulo de EROs no interior das hifas na presença de H_2O_2 e Para..... 92
Figura 20 - Perfil de expressão do gene *hex-1* por RT-qPCR..... 94
Figura 21 - Localização subcelular da proteína ORE-1..... 95
Figura 22 - Localização mitocondrial da proteína ORE-1.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de *N. crassa* utilizadas neste estudo..... 45

Tabela 2 Soluções estoque dos agentes de estresse utilizados..... 47

Tabela 3 - Genes alvos utilizados na análise de RT-qPCR..... 55

Tabela 4 - Oligonucleotideos utilizados na análise de RT-qPCR..... 56

Tabela 5 - Oligonucleotideos utilizados na análise de ChIP-qPCR..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
±	mais ou menos
°C	grau Celsius
µL	microlitros
g	gramas
g	gravidade
$g.L^{-1}$	gramas por litro
Kb	kilo bases
KDa	kilo Daltons
M	Molar
L	litro
mL	mililitro
rpm	rotações por minuto
v/v	volume/volume
p/p	peso/peso
p/v	peso/volume
VM	meio mínimo de Vogel
PCR	reação da polimerase em cadeia
TF	Fator de Transcrição “Transcription Factor”
RT-qPCR	Real time PCR quantitativo
cDNA	DNA complementar
mRNA	RNA mensageiro
dNTP	dexoxirinucleotídeos trifosfato (dATP, dCTP,dGTP,dTTP)
ORF	fase aberta de leitura “open reading frame”
BSA	Albumina de soro bovino
DMSO	dimetilsulfóxido
SDS	dodecil sulfato de sódio
EDTA	ácido etilenodiamina
VM	meio mínimo de Vogel
pH	potencial hidrogeniônico
FOH	farnesol
Para	paraquat
Mena	menadiona

H_2O_2	peróxido de hidrogênio
Tunel	deoxynucleotidytransferase mediated dUTP biotin nicck end labeling
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride
H_2DCFDA	2'7' diclorodihidro fluoresceina diacetato
GFP	proteína fluorescente verde "green flourescent protein"
EROs	espécies reativas de oxigênio
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
GSH	glutationa reduzida
TRx	tiorredoxina
GPx	glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
GST	glutationa-s-transferase
SOD	superóxido dismutase
CAT	catalases
OH•	radical hidroxila
OH^-	ânion hidroxila
$O_2^{\bullet -}$	ânion radical superóxido
O_2^-	ânion superóxido
ROO•	peroxila
RO•	alcoxila
O_2	oxigênio
NO•	óxido nítrico
N_2O_3	óxido nitroso
$ONOO^-$	peroxinitritos
HNO_2	ácido nitroso
NO_2^-	nitritos
NO_3^-	nitratos
H2O2	peróxido de hidrogênio
wt	linhagem selvagem "wild type"
$p<0,01$	99% de significância TUKEY

SUMÁRIO

1. NTRODUÇÃO..... 25

1.1. O fungo *Neurospora crassa* como modelo experimental 26

1.2. O Estresse Oxidativo..... 29

1.3. Fontes intracelulares de EROs..... 31

1.4. Mecanismos de defesa antioxidante no organismo..... 34

1.5. A resposta celular ao dano do DNA..... 36

1.6. Fatores de transcrição de *N. crassa* relacionados a estresse e morte celular.. 38

2. OBJETIVOS..... 41

3. MATERIAL E MÉTODOS..... 44

3.1. Linhagens de *Neurospora crassa*..... 45

3.2. Meios de cultura 45

3.2.1. Meio Mínimo de Vogel (VM)..... 45

3.2.2. Meio *Synthetic Cross medium* (SC)..... 46

3.2.3. Meio VM contendo solução FGS 10X..... 46

3.2.4. Meios utilizados nos cruzamentos em *N. crassa*..... 46

3.2.4.1. Top ágar..... 46

3.2.4.2. Base ágar..... 46

3.2.4.3. Vm com higromicina..... 47

3.3. Soluções e tampões 47

3.3.1. Soluções estoque dos agentes de estresse utilizados..... 47

3.3.2. Soluções para análise de ChIP-qPCR..... 47

3.3.3. Soluções para análises de Microscopia..... 48

3.4. Propagação das linhagens de *Neurospora crassa*..... 49

3.4.1. Obtenção de conídios..... 49

3.5. Confirmação de nocaute gênico por PCR 49

3.5.1. Extração de DNA genômico..... 49

3.5.2. Análise por PCR 50

3.6. Confirmação do *mating type* da linhagem mutante..... 51

3.7. Análises morfológicas da linhagem mutante 51

3.7.1. Crescimento em meio sólido..... 51

3.8. Identificação do domínio de ligação do fator de transcrição..... 51

3.8.1. Categorização dos prováveis alvos..... 52

3.9. Determinação da sensibilidade a agentes de estresse..... 52

3.9.1. Estresse osmótico..... 52

3.9.2. Estresse térmico..... 52
3.9.3. Estresse de pH..... 53
3.9.4. Estresse oxidativo..... 53
3.9.5. Indução de morte celular utilizando FOH..... 53
3.10. Extração de RNA total e análise da expressão gênica..... 54
3.10.1. Condições do experimento..... 54
3.10.2. Extração de RNA total..... 54
3.10.3. PCR quantitativo (RT-qPCR)..... 55
3.11. Construção da linhagem complementada his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp..... 56
3.12. Ensaio de ChIP-qPCR..... 57
3.13. Medida do acúmulo de EROs intracelular..... 60
3.14. Co-localização nuclear e mitocondrial..... 60
3.14.1. Coloração dos germinantes com DAPI..... 60
3.14.2. Coloração dos germinantes com MitoTracker..... 61
3.15. Análise estatística..... 61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 62
4.1. Características do fator de transcrição ORE-1..... 63
4.2. Confirmação do nocaute e do *mating type* da linhagem mutante Δ*ore-1*... 63
4.3. Caracterização fenotípica da linhagem Δ*ore-1* 64
4.3.1. Crescimento em meio sólido e análise das extremidades das hifas. 64
4.4. Identificação dos prováveis alvos de ligação do fator de transcrição ORE-1..... 65
4.5. Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante Δo*re*-1 na presença de diferentes formas de estresse..... 68
4.5.1.Efeito do estresse osmótico, térmico e pH sobre o crescimento das linhagens..... 68
4.5.2.Papel do fator de transcrição na resposta ao estresse oxidativo. 68
4.6. Teste de sensibilidade com a linhagem complementada..... 75
4.7. Análises de expressão gênica por RT-qPCR 76
4.8. Ensaios de Imunopreciptação da cromatina-(ChIP-qPCR)..... 77
4.9. Acúmulo de radicais livres na linhagem selvagem e mutante..... 82
4.10. Localização celular de ORE-1..... 88
CONCLUSÕES..... 97
REFERÊNCIAS..... 99

Introdução

1.1. O fungo *Neurospora crassa* como modelo experimental

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 em organismos eucariotos. Dentre os fungos filamentosos, *Neurospora 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). O fungo pertence à classe dos *Eumicetos*, subclasse *Ascomiceta*, família *Sordariacea*, subfamília *Sphaeriales*, (ESSER; KUENEN, 1967), é um fungo saprófito, multicelular e não patogênico, embora seu genoma esteja intimamente relacionado com genomas de fungos fitopatogênicos (GALAGAN et al*.,* 2003).

Estudos iniciais com *N. crassa* datam da primeira metade do século XIX. O fungo foi descrito e utilizado em experimentos por microbiologistas franceses após sua infestação em padarias de Paris (PAYEN, 1843). Inicialmente denominada de *Monilia sitophila*, o gênero foi renomeado logo após a identificação de corpos de frutificação, demonstrando a ocorrência de um estágio sexual no fungo até então desconhecido (SHEAR; DODGE, 1927). Na década de 40, partindo do pressuposto de que o desenvolvimento e funcionamento de um organismo consistia essencialmente de um sistema integrado de reações químicas controladas de alguma maneira pelos genes, uma série de experimentos utilizando o fungo *N. crassa* foram realizados por Beadle e Tatum em 1941, o que resultou na hipótese “um gene, uma enzima”. Como reconhecimento, os autores foram laureados, em 1958, com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia. Estas pesquisas utilizando o fungo como organismo modelo nas primeiras décadas do século XX determinaram o destino da genética moderna e da biologia molecular. 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).

O ciclo assexual do fungo consiste na formação de estruturas denominadas de macro e microconídios. Macroconídios são células grandes, multinucleadas (3 a 6 núcleos) que são originados por brotamentos repetidos a partir da célula apical de conidióforo (blastoconidio) ou pela fragmentação do conidióforo (artroconídio) (SPRINGER; YANOFSKY, 1989). Estas estruturas são revestidas por proteínas fazendo com que os macroconídios assumam uma natureza hidrofóbica, que os mantem secos e leves facilitando sua dispersão pelo ar (DAVIS, 2000). Além dos macroconídios, existem

também os microconídios. Eles são menores, possuem natureza hidrofílica, possuem apenas um núcleo, são liberados diretamente de estruturas constituídas por pequenas células denominadas de microconidióforos. Em geral, os conídios germinam em condições adequadas para o crescimento pela formação de um tubo germinativo inicial, que se estende até formar uma hifa (DAVIS, 2000).

N. crassa possui dois tipos de compatibilidade sexual, chamados fatores de acasalamento "A" e "a". Ambos são competentes para cruzamento, sendo que qualquer um pode ser doador de núcleo (macho) como aceptor de núcleo (fêmea). Para que se inicie o ciclo sexual, é necessário que o fungo esteja em condição de limitação de nitrogênio, o que induz a formação de uma estrutura sexual especializada denominada de protoperitécio (estrutura feminina). A doação de núcleo ocorre quando um conídeo ou um pedaço de hifa de fator de acasalamento oposto entra em contato com o protoeritécio. Após o contato ocorre a fertilização do protoperitécio pela fusão das hifas (RAJU, 1980). Após a fusão dos núcleos ocorre uma mitose que resulta na formação de uma estrutura denominada de *crozier* dividida em 3 células, uma lateral e uma célula basal com um núcleo cada, e uma célula apical com dois núcleos. Hifas especializadas são formadas resultando em uma estrutura denominada peritécio. Uma representação esquemática do ciclo do fungo pode ser visualizada na figura 1.

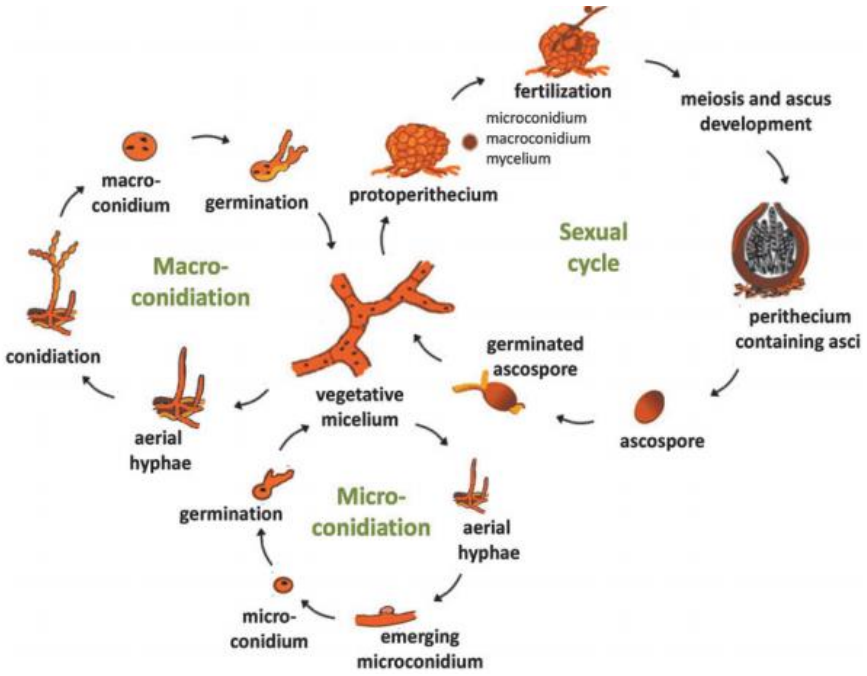

Figura 1 - Ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa* (Gyongyosi; Kaldi, 2014).

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 por Galagan et al., (2003), revelando ser constituído por aproximadamente 40 Mb, genoma este, considerado maior se comparado com outros fungos já conhecidos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe.* 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). O genoma dos organismos eucariotos possui uma grande diversidade de fatores de transcrição, tanto em relação à presença, quanto na variedade de famílias destas proteínas regulatórias. O genoma do fungo *N. crassa* possui 176 proteínas anotadas como fatores de transcrição, o que representa 1,7% dos genes codificadores de proteínas deste organismo (BORKOVICH et al., 2004).

Os fatores de transcrição interagem com sequências de DNA específicas presentes nos genes alvos por meio de um domínio de ligação ao DNA. Estas proteínas são classificadas em dois tipos: (i) proteínas denominadas fatores gerais da transcrição, que constituem a maquinaria multi-proteica da RNA polimerase II, requeridas para o reconhecimento do promotor e catálise da síntese de RNA no processo de transcrição e, (ii) proteínas que são ativadores/repressores transcricionais, modulando a expressão de genes específicos sob determinadas condições (LEVINE; TJIAN, 2003).

O sequenciamento do genoma de *N. crassa* (GALAGAN et al., 2003), aliado aos avanços das metodologias para a inativação de genes específicos (NINOMIYA et al., 2006) contribuíram para que as análises da genômica funcional neste fungo fossem iniciadas. Com a identificação de genes homólogos aos genes codificadores das proteínas Ku70 e Ku80 no genoma de *N. crassa, mus-51* e *mus-52,* respectivamente, Ninomiya et al. (2006) desenvolveram um procedimento, baseado na técnica de *Fusion*-PCR, para a construção de cassetes de DNA contendo o gene codificador da proteína higromicina B fosfotransferase (*hph*), conferindo ao fungo resistência ao antibiótico higromicina B. Sabe-se que a linhagem selvagem do fungo *N. crassa,* assim como outros fungos filamentosos apresenta uma taxa muito pequena de recombinação homóloga (<10%) (PAIETTA; MARZLUF, 1985). Entretanto, Ninomyia et al. (2006) mostraram que deleções únicas nos genes *mus-51* ou *mus-52,* que estão envolvidos em

processos de recombinação não homóloga, promovem um aumento expressivo nos níveis de recombinação homóloga (>90%).

O procedimento descrito por Ninomiya et al. (2006) foi utilizado para a construção de um banco de linhagens mutantes contendo os 10.000 genes codificadores de proteínas individualmente nocauteados pela inserção de uma marca de seleção. O nocaute de todos os genes de *N. crassa* tem como objetivo determinar a função de cada um deles, pois apenas 15% dos genes são associados com o fenótipo e pouco mais de um terço destes genes não possuem ortólogos em outros organismos, não existindo evidencias de suas funções (DUNLAP et al., 2007). Assim, linhagens contendo genes individualmente inativados foram disponibilizadas para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Linhagens mutantes de *N. crassa* em fatores de transcrição e em proteínas quinases foram adquiridas pelo laboratório e utilizadas com o objetivo de identificar proteínas reguladoras do metabolismo dos carboidratos de reserva glicogênio e trealose. Muitas proteínas foram identificadas, entre elas algumas apresentam ortólogos funcionais depositados em banco de dados e a grande maioria corresponde a proteínas anotadas como hipotéticas (GONÇALVES et al., 2011, CANDIDO et al., 2014). O papel funcional do produto de ORF NCU01629, um fator de transcrição que pertence à família *zinc finger* e sem homólogos funcionais caracterizados, até o momento, foi identificado em um destes estudos e será objeto de estudo neste trabalho.

1.2. O Estresse Oxidativo

O surgimento do oxigênio na atmosfera, ao longo da evolução, trouxe como consequência a sua toxicidade, já que seus metabólitos são muito reativos. Há afirmações que em consequência disso, alguns organismos morreram, alguns escolheram processos de obtenção de energia diferentes (anaerobiose) e outros, considerados oportunistas, utilizaram o oxigênio para extrair mais energia dos nutrientes, em decorrência de seu alto potencial eletroquímico e tiveram que se adaptar para se defender dos efeitos deletérios do oxigênio (FRIDOVICH, 1989).

A existência de espécies químicas na forma de radicais livres foi primeiramente descrita no ano de 1900. O oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons pelos organismos aeróbicos e permite elevada produção de energia na respiração, em consequência de seu alto potencial eletroquímico. Entretanto, devido a sua configuração eletrônica, o oxigênio pode sofrer reduções parciais e levar à formação de radicais

livres. A detecção de efeitos celulares e teciduais deletérios quando os radicais livres alcançam concentrações elevadas no meio fisiológico (FREEMAN; CRAPO, 1982), a associação do envolvimento de radicais livres com algumas condições patológicas (SIES, 1985) e a participação de espécies reativas (radicais livres ou deles derivadas) em vias de sinalização celular (HADDAD, 2002), fizeram a atenção e as pesquisas se voltarem para esses radicais livres.

Muitos autores adotam uma definição abrangente e definem radical livre como "espécie que tem um ou mais elétrons desemparelhados" (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; DREHER; JUNOD, 1996). Esta definição engloba o átomo de hidrogênio (que possui um elétron desemparelhado), a maioria dos íons de metais de transição e o oxigênio molecular. A terminologia Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) inclui as espécies radicais livres e outras que, embora não possuam elétrons desemparelhados, são muito reativas em decorrência de sua instabilidade. Por esta razão, esse termo tem sido mais utilizado. (BERGENDI et al., 1999).

A formação endógena de EROs, por meio das enzimas NAPDH oxidase (NOX) e mitocôndrias, é uma consequência do metabolismo aeróbico (MICHIELS et al., 1994). Em concentrações fisiológicas, as EROs têm funções biológicas definidas, atuando como moléculas de sinalização que regulam os processos biológicos e fisiológicos com o intuito de manter a homeostase celular, também conhecida como biologia redox (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). Entretanto, caso os elétrons escapem da membrana externa da mitocôndria ou sob adversidades ambientais, há o aumento de EROs no interior das células. Este excesso de espécies reativas de oxigênio pode ocasionar estresse oxidativo promovendo efeitos prejudiciais, tais como a oxidação dos lipídios de membrana, danos às proteínas e ao DNA e o rompimento da homeostase celular (SIES, 1985). Sendo assim, concentrações supra-fisiológicas devem ser evitadas pelo organismo, considerando que sua reatividade traz consequências celulares deletérias.

O estado de estresse oxidativo indica elevados níveis de EROs no interior das células. Desse modo, o que vai diferenciar a "biologia redox" do "estresse oxidativo" são os níveis e a compartimentalização de H_2O_2, baixos níveis de H_2O_2 estão relacionados com a homeostase celular e altos níveis de superóxido ou radicais hidroxila podem causar estresse oxidativo (SCHIEBER; CHANDEL, 2014). O H_2O_2 é necessário para a ativação de um certo número de vias celulares envolvidas no crescimento celular, sobrevivência, proliferação, metabolismo e angiogenese (Li et al., 2012). Para se defender da toxicidade das EROs, o organismo apresenta mecanismos de defesa, em

três níveis distintos (SIES, 1985): (i) Prevenção da formação de EROs; (ii) Eliminação de EROs formadas; (iii) Reparo de moléculas modificadas por EROs.

Nos últimos anos o interesse pelo estudo da resposta celular ao estresse oxidativo, vem crescendo, uma vez que as espécies reativas estão sendo relacionadas ao processo de envelhecimento e morte celular e a doenças como AIDS, câncer e aterosclerose. Em condições de homeostase, as EROs podem ser consideradas moléculas com funções de mensageiros secundários, exercendo (i) regulação da expressão de genes sensíveis aos sinais redox e (ii) alterações da homeostase celular, através da síntese de moléculas fisiologicamente ativas (DIZDAROGLU; JARUGA, 2012).

Em procariotos, existem mecanismos bem descritos em que EROs ativam diretamente os fatores de transcrição para a adaptação ao estresse (KILEY; STORZ, 2004). A regulação da expressão gênica baseada na oxidação-redução parece representar um mecanismo regulatório fundamental da célula, provavelmente por modulação da atividade de alguns fatores de transcrição (HADDAD, 2002).

Os fungos quando confrontados com o estresse oxidativo são capazes de aumentar a expressão de genes codificadores de proteínas específicas envolvidas na eliminação de EROs com o intuito de manter o equilíbrio da condição fisiológica da célula. Alguns desses genes codificam diretamente antioxidantes enzimáticos como catalases (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutationa-s-transferase (GST). Se este mecanismo não for suficiente, eventos relacionados à morte celular programada podem ser desencadeados (revisto em SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

1.3. Fontes intracelulares de EROs

As principais EROs distribuem-se em dois grupos, os radicalares: radical hidroxila (OH•), ânion hidroxila (OH^-), ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), ânion superóxido (O_2^-), peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•) e os não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ácido hipocloroso. Estas moléculas têm propriedades químicas inerentes que conferem a reatividade a diferentes alvos biológicos. As maiores fontes produtoras de EROs incluem a mitocôndria, retículo endoplasmático, membrana plasmática, peroxissomo e citosol. Dentre as ERN (espécies reativas de nitrogênio) incluem-se o óxido nítrico (NO•), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos ($ONOO^-$) (WISEMAN; KAUR; HALLIWELL, 1995; CADET et al., 1999;).

O O_2•− é produzido primariamente por oxidação de NADPH por enzimas NAD oxidase (NOXs) em NAD^+ ou por vazamento de elétrons a partir da respiração aeróbia nas mitocôndrias. O O_2•− é a primeira das espécies formadas pela redução do oxigênio por um único elétron, e pode agir como oxidante ou como redutor dando origem a outras espécies reativas. Do total de oxigênio consumido na cadeia respiratória, 95 a 98% é utilizado como aceptor final de elétrons pelas células animais, sendo totalmente reduzido. Entretanto, cerca de 2 a 5% do oxigênio é gerado como um intermediário reduzido por um elétron, formando o O_2•−.

O O_2•– ao contrário da maioria dos radicais livres é inativo e participa de alguns processos químicos importantes no contexto biológico. O principal deles é auxiliar na produção de radical HO•, através da redução de quelatos de Fe (III), formando $Fe+^2$. Além disso, o O_2•– possui a habilidade de liberar Fe^2+ das proteínas de armazenamento e de ferro-sulfoproteínas, tais como ferritina e aconitase, respectivamente. O O_2•– também reage com o radical HO• produzindo oxigênio singleto ($^1O_2$) e com o óxido nítrico (NO•) produzindo peroxinitrito (ONOO−). A atuação do O_2•– como oxidante direto é irrelevante. Dentre os aminoácidos, o único que sofre oxidação com o O_2•– é a cisteína. A partir dessa reação forma-se um superóxido e o tio-radical.

Apesar destes efeitos danosos, o O_2•– tem importância vital para as células de defesa e sem ele o organismo está desprotegido contra infecções causadas por vírus, bactérias e fungos. Este ânion-radical é gerado *in vivo* por fagócitos ou linfócitos e fibroblastos durante o processo inflamatório, para combater corpos estranhos. Os fagócitos o produzem com auxílio da enzima NADPH oxidase, que catalisa a redução por um elétron do O_2 com gasto de uma molécula de NADPH. O O_2•– formado é bactericida fraco, capaz de inativar proteínas ferro-sulfurosas das bactérias, mas gera alguns produtos que possuem forte atividade antimicrobiana, tais como ácido hipocloroso (HOCl), peroxinitrito (ONOO–) e (H_2O_2) que são os principais responsáveis pelo combate a corpos estranhos. Em casos específicos, o O_2•– age como antioxidante, Um exemplo é a redução da ubiquinona para ubiquinol, no interior da mitocôndria. Por fim, o O_2•– pode funcionar também como sinalizador molecular através da sua capacidade de oxidar grupos –SH em ligações dissulfeto.

O H_2O_2 é gerado *in vivo* pela dismutação do O_2•− por enzimas oxidases. As mitocôndrias são importantes fontes de O_2•− e, como a presença deste ânion-radical pode causar sérios danos, elas são ricas em enzimas superóxidos dismutases (SODs) que o converte em H_2O_2. Em pH fisiológico, a baixa concentração de prótons reduz a taxa de reação espontânea e o H_2O_2 formado, *in vivo*, é o produto da reação enzimática

para eliminação do O_2•− pela ação da SOD (HALLIWELL; GUTERIDGE, 1990). Assim, as vias geradoras de O_2•− formam subsequentemente H_2O_2. Entretanto, o peroxissomo é um compartimento celular em que há geração de grande quantidade de H_2O_2, através da atuação de oxidases envolvidas no catabolismo de aminoácidos e na oxidação de ácidos graxos. As flavoproteínas desidrogenases, responsáveis por introduzir duplas ligações, são reduzidas e imediatamente oxidadas pelo O_2•−, produzindo H_2O_2 (NELSON; COX, 2000).

O peróxido de hidrogênio gerado é então parcialmente eliminado por catalases (CAT), glutationa peroxidase (GPx) e peroxidases ligadas à tioredoxina (PRX), mas como essa eliminação tem baixa eficiência, grande parte do H_2O_2 é liberado para a célula (Babior; Am, 2000; Halliwell; Clement; Long, 2000). Estas enzimas convertem o H_2O_2 em H_2O e O_2. Quando os níveis de H_2O_2 aumentam desordenadamente, estas moléculas podem reagir com cátions metálicos (Fe^{2+}) gerando radicais hidroxila (OH•), podendo ocasionar danos irreversíveis às macromoléculas celulares (HUSAIN; CILLARD; CILLARD, 1987). O OH• oxida lipídios, proteínas e DNA.

A reação de Fenton (1) tem sido proposta como a principal via de geração do OH•, *in vivo,* através da decomposição do H_2O_2 catalisada por metal, principalmente ferro (SIES, 1985).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + .OH + OH^- \quad (1)$$

As observações de que a formação de OH• em sistemas geradores de elétrons é inibida pela adição de SOD mostraram que o radical superóxido está envolvido na produção de OH•. Assim, propôs-se a reação de Waber-Weiss (2), em que metais de transição catalisam a reação entre H_2O_2 e O_2•− (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

$$O_2\text{•}- + H_2O_2 \xrightarrow{Fe^{2+}} OH\text{•} + OH^- + O_2 \quad (2)$$

Proteínas que são sensíveis à inativação por superóxido ativam as vias de sinalização que promovem a adaptação para superóxido elevada ou iniciam a sinalização para os eventos de morte celular.

O H_2O_2 é mais estável que o OH•, e é pouco reativo frente às moléculas orgânicas na ausência de metais de transição. No entanto, exerce papel importante no estresse oxidativo por ser capaz de transpor as membranas celulares facilmente possibilitando a

ocorrência de reações com alvos biológicos em compartimentos distantes do seu local de formação e gerar o radical hidroxila (3) (HANCOCK; DESIKAN; NEIL, 2001).

$$Mn^{++}\ H_2O_2 \dashrightarrow M(n+1)^{++}\ OH\bullet + OH^{-} \quad (3)$$

Existem duas maneiras de controlar a presença do radical OH•: (i) reparar os danos causados por ele ou (ii) inibir a sua formação. O OH• é formado no organismo principalmente por dois mecanismos: reação de H_2O_2 com metais de transição e reação de H_2O_2 com reação de $O_2\bullet^-$. Em organismos eucariotos, os metais de transição mais importantes para a ocorrência dessa reação são Cu^{1+}e Fe^{2+}. Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada devido a sua maior biodisponibilidade e, no organismo, na maior parte do tempo ele encontra-se complexado com proteínas de transporte (ex. transferrina), e armazenamento (ex. ferritina e hemosiderina). O OH• causa danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial. No DNA ele ataca tanto as bases nitrogenadas quanto a desoxirribose e quase sempre leva à ruptura da cadeia de DNA.

Nos aminoácidos e proteínas, HO• pode reagir na cadeia lateral, onde ataca preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina podendo gerar perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular. O radical OH• é o mais deletério ao organismo, pois devido a sua meia-vida muito curta dificilmente pode ser sequestrado in vivo. Estes radicais frequentemente atacam as moléculas por abstração de hidrogênio.

Portanto, as células têm vários mecanismos para manter a homeostase celular com o intuito de prevenir a formação de radicais de hidroxila tóxicos e de diminuir eventos relacionados à apoptose. As grandes mudanças nesses parâmetros são geralmente um sinal de estresse oxidativo, causando toxicidade em vez de sinalização celular (MURPHY, 2012).

1.4. Mecanismos de defesa antioxidante no organismo

A maior fonte de energia para os organismos aeróbicos está na terceira etapa da respiração, que ocorre no interior da mitocôndria, onde uma molécula de O_2 é reduzida a duas moléculas de H_2O, com consumo de quatro elétrons. As mitocôndrias são conhecidas por mudar de forma dinâmica em relação às necessidades celulares,

permitindo assim que H_2O_2 mitocondrial seja gerado para ativar algumas vias de sinalização. Da mesma forma, o acúmulo de O_2•– na matriz mitocondrial é diferente do acúmulo de O_2•– no citosol, em parte, devido a um elevado teor de proteínas de fragmentação de ferro-enxofre na matriz mitocondrial.

As enzimas podem atuar diretamente contra os radicais livres, ou ainda, reparar os danos causados ao organismo por essas espécies reativas. Estes "antioxidantes" são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. Em uma situação de estresse oxidativo as células apresentam dois mecanismos de defesa importantes: (i) um tampão redutor tiol consistindo de pequenos peptídeos com moléculas sulfidrila redox-ativas, como a glutationa reduzida (GSH) e tiorredoxina (TRX) e, (ii) um sistema enzimático composto principalmente pela superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa peroxidase (GPx), glutationa redutase (GR) e glutationa-S-transferase (GST) (GABBITA et al., 2000).

Estas enzimas são capazes de remover EROs e ERNs. São conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes: o primeiro é composto por dois tipos de enzimas SOD, que catalisam a destruição do radical O_2•–, convertendo-o em O_2 e H_2O_2. A decomposição do O_2•– ocorre naturalmente, porém, por ser uma reação de segunda ordem, necessita que ocorra colisão entre duas moléculas de O_2•–, de forma que há necessidade de uma concentração maior do O_2•–. A presença da SOD favorece essa dismutação, tornando a reação de primeira ordem, eliminando a necessidade da colisão entre as moléculas. A ação desta enzima permite a eliminação do O_2•– mesmo em baixas concentrações. Existem duas formas de SOD no organismo, a primeira contém Cu^{2+} e Zn^{2+} como centros redox e ocorre no citosol, sendo que sua atividade não é afetada pelo estresse oxidativo. A segunda contém Mn^{2+} como centro redox, ocorre na mitocôndria e sua atividade aumenta com o estresse oxidativo (BABIOR; BRAZ, 1997). Em relação às enzimas superóxidos dismutases, o genoma de *N. crassa* contém genes codificadores das enzimas SOD-1, SOD-2, SOD 1 *copper chaperon* e SOD. A SOD-1 e SOD-2 são isoformas classificadas de acordo com o cofator inorgânico ligado ao sítio ativo, SOD-1 possui como cofator o Cu-Zn e é localizada principalmente no citosol e no espaço intermembranar mitocondrial, e a SOD-2 possui o cofator Mn^{2+} e está localizada na matriz mitocondrial. A SOD 1 *copper chaperon* pode atuar ativando as SOD-1 e SOD-2 (ZHU et al., 2013). Estas enzimas antioxidantes evitam o acúmulo de O_2•– formando H_2O_2.

O segundo sistema de prevenção é muito mais simples, sendo formado pela enzima catalase que atua na dismutação do H_2O_2 em O_2 e H_2O (BABIOR; BRAZ, 1997). A reação de detoxificação pelas catalases acontece quando H_2O_2 entra no sítio ativo da enzima e interage com os aminoácidos histidina e asparagina, liberando H_2O e O_2 para o meio. A levedura *S. cerevisiae* possui uma catalase A perixossomal (Cat1), cuja função principal parece ser eliminar H_2O_2, e uma catalase T citossólica (Ctt1), cujo papel ainda não foi completamente esclarecido. O fungo *N. crassa* possui as enzimas CAT-1, CAT-2, CAT-3 e CAT-4 e estão envolvidas na detoxificação de EROs (ZHU et al., 2013). As catalases e as superóxido dismutases atuam em conjunto na eliminação de EROs (revisto em SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

O terceiro sistema é composto pela GSH em conjunto com duas enzimas GPx e GR. A presença do selênio na enzima (selenocisteína) explica a importância desse metal e sua atuação como antioxidante nos organismos vivos. Esse sistema também catalisa a dismutação do H_2O_2 em H_2O e O_2, sendo que a glutationa opera em ciclos entre sua forma oxidada e sua forma reduzida (BABIOR; BRAZ, 1997). A GSH é um tripeptídio, formado por glicina, ácido glutâmico e cisteína e constitui o tiol redutor mais abundante no meio intracelular (SIES, 1985). A manutenção de níveis adequados de GSH é feita por meio da atividade da GR, que utiliza equivalentes redutores do NADPH para manter a glutationa na forma reduzida, como substrato para GPx, nos compartimentos citosólico e mitocondrial (REMACLE et al, 1992).

Sendo assim, as duas maiores defesas contra H_2O_2 são o ciclo redox GSH presente no citosol e na mitocôndria e catalase presente na fração peroxissomal. As enzimas apresentam cooperação sinérgica para manter a concentração de EROs dentro de limites fisiológicos. CAT e SOD agem principalmente em regiões hidrofílicas, enquanto o sistema GPx protege regiões hidrofóbicas, com especificidade para peróxidos de lipídios (MICHIELS et al., 1994).

1.5. A resposta celular ao dano do DNA

Diferentes tipos de estresse podem induzir alterações nas células e nos tecidos além dos processos de adaptação, lesão celular e morte. A condição fisiológica da célula exige equilíbrio entre as condições pró-oxidante e antioxidante. Se os mecanismos antioxidantes não conseguem impedir os danos ao DNA, ocorrem injúrias oxidativas, que incluem a modificação de bases, de açúcares e a formação de ligações cruzadas entre fitas duplas e simples (DIZDAROGLU, 1991). A lesão celular ocorre

quando as células são submetidas a um estresse tão severo que não são mais capazes de se adaptar, a célula sofre lesão celular “irreversível” e, consequentemente, morte celular.

Existem dois tipos de morte celular, necrose e apoptose. Quando o dano às membranas é severo, as enzimas lisossômicas entram no citoplasma e digerem a célula e os componentes celulares vazam, resultando em necrose. Alguns estímulos nocivos, especialmente aqueles que danificam o DNA, induzem outro tipo de morte celular, a apoptose, que se caracteriza pela dissolução celular sem perda total da integridade das membranas. Enquanto a necrose é sempre um processo patológico, a apoptose ocorre em várias funções normais e não está necessariamente associada à lesão celular. Pelo menos alguns tipos de estímulos podem induzir tanto a apoptose quanto à necrose, dependendo da intensidade e duração do estímulo, da rapidez do processo de morte celular e das alterações bioquímicas induzidas na célula danificada (revisto em SHELTON; KRISHNAMURTHY; JOHNSON, 2004).

A todo instante estamos expostos às EROs, subprodutos da respiração celular. Além disso, radiações UV, poluição e vários outros fatores ambientais promovem a formação de espécies pró-oxidantes, que em excesso, levam ao estado de estresse oxidativo (PIWOCKA et al., 2001). Uma enorme quantidade de dados suporta o papel do estresse oxidativo no desencadeamento da morte celular programada (McCONKEY,1998).

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada que ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células. É um mecanismo rigidamente controlado por expressões genéticas decorrentes da interação célula e meio externo, levando à produção de várias moléculas com atividades específicas que resultam em alterações celulares funcionais (ISRAELS; ISRAELS, 1999).

Este processo de morte celular possui um papel essencial na manutenção da homeostase celular. A homeostase é dependente do perfeito balanço entre proliferação e morte celular, que são eventos intimamente acoplados. A relação entre ciclo celular e apoptose é reconhecida pelos genes que codificam as proteínas c-Myc, p53, pRb, Ras, PKA, PKC, Bcl-2, NF-κB, CDK, ciclinas e CKI, em eucariotos superiores. Após estimulação, estas proteínas podem induzir proliferação celular, parada do ciclo ou morte celular. A via mitocondrial é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, envolvendo a ativação de um membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Bax, Bid) ou anti-apoptótica (Bcl-2 e Bcl-x) que é regulada por multi-sítios de fosforilação

envolvendo interações entre várias proteínas da família (revisto em VERMEULEN; BERNEMAN; VAN BOCKSTAELE, 2003). Os membros pró- e anti-apoptótico da família Bcl-2 regulam a liberação de citocromo c a partir da membrana mitocondrial interna. Os membros anti-apoptóticos inibem a morte celular por apoptose impedindo a formação de poros na membrana mitocondrial, consequentemente, inibem o extravasamento do citocromo c para o citosol (GOTTLIEB, 2000).

A proteína p53 atua regulando alguns genes antioxidantes e o ciclo celular, com o intuito de diminuir os eventos relacionados à apoptose e em alguns casos atua ativando genes relacionados com reparo do DNA. Entretanto se não há reparo, a proteína p53 pode atuar ativando a apoptose em eucariotos superiores. A proteína *ATG17* de *S. cerevisiae* atua ativando a apoptose (NIGRO et al., 1992).

As caspases são membros da família de proteases que são ativamente envolvidas na morte celular (BASNET, MATSUNO, NEIDLEIN, 1997). Em *S. cerevisiae*, o gene YCA1 pode ser implicado na sinalização da morte celular em resposta a uma grande variedade de estímulos químicos e estresse oxidativo (revisto em MAZZONI; FALCONE, 2008).

Ao contrário do que ocorre em leveduras, em humanos e outros organismos modelos, incluindo fungos filamentosos, a resposta ao dano no DNA ainda não é bem caracterizada. Embora alguns aspectos dessa resposta em fungos filamentosos devam ser semelhantes com o que se observa em humanos e em leveduras, alguns aspectos podem ser exclusivos dos fungos filamentosos, o que pode influenciar o modo de reparo ao dano e/ou sua tolerância ao agente estressor (GOLDMAN; MACCGUIRE; HARRIS, 2002).

1.6. Fatores de transcrição relacionados a estresse e morte celular

O controle da expressão gênica em organismos eucariotos resulta de uma série de mecanismos regulatórios existentes em diferentes etapas do processo de expressão gênica. A nível transcricional, inúmeros fatores de transcrição e diferentes sequências de DNA regulatórias, presentes nos genomas, participam deste mecanismo, dependendo das condições ambientais. Alguns fatores de transcrição foram descritos como importantes na resposta a EROs e morte celular em *N. crassa*.

Dinamarco et al. (2010), investigando o efeito apoptótico do fator de transcrição NDI1 sobre a expressão gênica, em *Aspergillus nidulans*, descobriram que o NDI1, está associado ao aumento na produção de EROs pela mitocôndria.

Em *N. crassa*, Glass; Dementhon, (2006), estudaram o papel do gene *aifA.* Neste estudo, descobriram por meio de análises funcionais e do perfil transcricional do gene *aifA,* que esta proteína está envolvida com eventos de incompatibilidade heterocária (HI), um processo de reconhecimento "nonself" que ocorre em fungos filamentosos e que pode ter relação com o estresse celular podendo desencadear morte celular em alguns casos. Os resultados revelaram ainda, que as EROs, são necessárias para HI ou morte celular programada (PCD). A morte das hifas durante a HI possui características semelhantes ao processo de apoptose que ocorre em células de mamíferos, incluindo encolhimento da membrana plasmática, formação de vesículas ligadas à membrana, a condensação de DNA. Essas informações foram corroboradas com análises de Tunel (*Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling assay*), obtendo-se núcleos positivos para apoptose.

Dinamarco et al. (2010), observaram que em *A. nidulans* mutantes em aifA, tiveram um aumento da sensibilidade ao farnesol. Estes resultados sugerem que existem diferenças no fator de transcrição AIF e na função mitocondrial relacionada com PCD em *N. crassa* e *A. nidulans.*

O perfil transcrional de *N. crassa* sob estresse oxidativo ocasionado por menadiona foi obtido e os resultados mostraram que este perfil foi semelhante ao de muitos outros fungos patogênicos (TAKAHASHI et al., 2010). Um estudo realizado por Michan, Lledias e Hansberg, (2003), relatou que a linhagem mutante no gene *cat-3* é hipersensível a tratamento com H_2O_2. O gene *cat-3* é muito importante na detoxificação do organismo, e a falta deste gene leva a uma diminuição na eliminação do H_2O_2 intracelular.

HU et al. (2013), estudaram os mecanismos de regulação de respostas ao estresse oxidativo, em *N. crassa.* Os autores realizaram testes de sensibilidade à menadiona em linhagens mutantes em genes regulados positivamente por menadiona e revelaram que a perda da regulação do fator de transcrição provoca hipersensibilidade à menadiona. Eles também selecionaram linhagens mutantes nos genes *mit-2* (menadione induced transcription fator-2) e *mit-4* (menadione induced transcription fator-4), e construíram um duplo mutante. O duplo mutante também se mostrou hipersensível à menadiona, e o duplo mutante *mit-2* e *sre* também mostrou efeitos aditivos na sensibilidade à menadiona, sugerindo que múltiplos fatores de transcrição podem conferir resistência ao estresse oxidativo de uma forma aditiva.

Gulshan et al. (2005) e Takahashi et al. (2010), observaram que em *N. crassa* o estresse oxidativo induz o acúmulo do fator de transcrição NAP-1 nos núcleos. Este

fator de transcrição regula a expressão do gene que codifica para a glutationa-S-transferase. Banno et al. (2007), caracterizaram linhagens mutantes no gene *sty-1,* homólogo a Hog1 de *S. cerevisiae* e mostraram que a perda de STY-1 aumenta a sensibilidade a agentes oxidantes (FERRIGNO et al., 1998).

Existem muitos fatores de transcrição sendo caracterizados em *N. crassa* e a correlação entre estas proteínas e EROs, é necessária, uma vez que muitos fatores de transcrição de *N. crassa* ainda não foram caracterizados funcionalmente, possam estar relacionados com os eventos de estresse oxidativo e morte celular.

Objetivos

O objetivo do trabalho é realizar experimentos visando à caracterização funcional do produto da ORF NCU01629 de *N. crassa*, um fator de transcrição anotado como proteína hipotética no banco de dados e sem homólogos funcionais descritos até o momento. Os estudos de caracterização deste fator de transcrição tiveram início em nosso laboratório após a determinação do *motif* de ligação do fator de transcrição ao DNA. Este dado foi disponibilizado por um grupo colaborador (Dr. Larrondo, Pontíficia Universidad Católica de Chile), juntamente com um grupo canadense realizaram um amplo estudo comparando as preferências de ligação de fatores de transcrição de diferentes organismos (WEIRAUCH et al., 2014). Neste estudo, os autores utilizaram a análise de PBM (*Protein binding microarray)* e, como consequência, os prováveis alvos de regulação dos diferentes fatores de transcrição foram determinados por análises de bioinformática. Com base nestes dados, os estudos com o fator de transcrição, produto da ORF NCU01629 foram iniciados. Especificamente, pretende-se realizar os seguintes estudos:

Objetivos específicos

- Analisar e categorizar os prováveis alvos de ligação do fator de transcrição. Neste passo, o objetivo é classificar os prováveis alvos pelo FunCat e identificar vias especificas em que o fator de transcrição pode atuar.

- Analisar a expressão de genes possivelmente regulados pelo fator de transcrição. Genes relacionados com os eventos de estresse oxidativo e morte celular foram encontrados como prováveis alvos de regulação do fator de transcrição. Portanto, pretende-se analisar a expressão dos genes codificadores das principais proteínas envolvidas nestas vias metabólicas.

- Analisar *in vivo* os alvos de ligação do fator de transcrição por ChIP-qPCR. As análises serão realizadas através de imunoprecipitação de cromatina seguida da amplificação da sequência alvo por análises de qPCR. Estes resultados irão confirmar o *motif* de ligação do fator de transcrição e as análises de RT-qPCR.

- Analisar por microscopia de fluorescência a produção de EROs intracelular na linhagem mutante. O objetivo é identificar diferenças ao longo das hifas sob microscopia de fluorescência após submeter as linhagens a diferentes formas estresses

oxidativo. A fluorescência será observada utilizando o reagente de 2',7'-diacetato dichlorodihydrofluorescein (H_2DCFDA).

- Analisar a localização celular do fator de transcrição. Uma vez identificadas as prováveis vias metabólicas alvos de regulação do fator de transcrição é importante determinar a localização celular do fator de transcrição quando o fungo é submetido a uma condição de estresse.

Material e Métodos

3.1. Linhagens de *Neurospora crassa*

Tabela 1. Linhagens de *N. crassa* utilizadas neste estudo.

Linhagens	Genótipo	Referência
FGSC#9718	a, *mus51*::Hyg^r	Collot et al., 2006
FGSC#11101	A, *Δore-1*::Hyg^r	Collot et al., 2006
FGSC#9716	a, his-3	Ahmed et al., 1964
FGSC#2489	WT, A	FGSC
his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp	A	Este Trabalho
FGSC#4347	a, *fluffy*	FGSC

Todas as linhagens, com exceção da linhagem *his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp*, foram adquiridas junto ao *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC), Kansas City, MO, USA.

O gene correspondente à ORF NCU01629 foi denominado como *ore-1* (*oxidative stress regulator*) neste estudo.

3. 2. Meios de cultura

3.2.1. Meio Mínimo de Vogel (VM)

O meio de cultivo utilizado para o crescimento e manutenção das linhagens foi o meio mínimo de Vogel (VM) (VOGEL, 1956), acrescido de sacarose 2%, biotina (0,1 mg/mL), e, para o cultivo em meio sólido, 2% de ágar. O meio VM é um meio quimicamente definido, com pH 5,8, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 50x concentrada. Esta solução estoque é feita a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 ml de água destilada: 125 g $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$, 250 g KH_2PO_4, 100 g NH_4NO_3, 10 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g $CaCl_2.2H_2O$ (pré-dissolvido em água destilada), biotina e 5 mL de solução de elementos traços.

A solução de elementos traços utilizada no preparo do meio VM é feita a partir da dissolução dos compostos apresentados abaixo em 95 mL de água destilada: 5 g ácido cítrico.H_2O, 5 g $ZnSO_4.7H_2O$, 1 g $Fe(NH_4)_2.(SO_4)_2.6H_2O$, 0,25 g $CuSO_4.5H_2O$, 0,05 g $MnSO_4.H_2O$, 0,05 g H_3BO_3 e 0,05 g $Na_2MoO_4.2H_2O$. Após a dissolução dos sais, o volume é ajustado para 1000 mL com de água destilada, são adicionados 300 µL de clorofórmio como agente conservante e a solução é armazenada a 4°C.

3.2.2. Meio *Synthetic Cross medium* (SC)

O meio utilizado nos experimentos de cruzamento foi o meio SC (WESTERGAARD; MITCHELL, 1947) em concentração 0,1 x, acrescido de sacarose 0,5 %, iodoacetato de sódio 1 mM e 2 % de ágar (EBBOLE; SACHS,1990). O meio SC é um meio quimicamente definido com pH 6,5. É 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 KNO_3, 1,4 g K_2HPO_4, 1 g KH_2PO_4; 0,2 g NaCl, 1 g $MgSO_4.7H_2O$, 0,2 g $CaCl_2.2H_2O$, 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 1L com água destilada, 667 µl de clorofórmio foram adicionados como agente conservante, e a solução foi armazenada a 4ºC.

3.2.3. Meio VM contendo solução FGS 10X

O meio de Vogel também foi utilizado adicionando a solução estoque FGS 10x. Esta solução é composta por frutose 0,05 %, glicose 0,05 % e sorbose 2 %, e é utilizada para possibilitar o crescimento colonial do fungo em placa de Petri. A solução FGS de trabalho foi diluída para 1x.

3.2.4. Meios utilizados nos cruzamentos em *N. crassa*

Estes meios foram usados nos experimentos de cruzamento.

3.2.4.1. Top ágar

Ágar 1,5%
Sorbitol 2M
FGS 2X

3.2.4.2 Base ágar

VM 1X
Ágar 1,5%
FGS 1X
4 µg/mL de higromicina (Invitrogen)

3.2.4.3 Meio Vm com higromicina

Foi adicionado 2% de sacarose e higromicina (4 µg/mL).

3.3. Soluções e tampões

3.3.1. Soluções estoque dos agentes de estresse utilizados

As soluções estoque dos agentes de estresse utilizados, bem como o mecanismos de ação estão descritos na tabela 1.

Tabela 2. Soluções estoque dos agentes de estresse utilizados.

Agentes de estresse	Mecanismo de ação	Solução estoque
Farnesol (FOH)	Inibidor da proliferação celular e indutor de apoptose	100 mM em metanol
Paraquat (Para)	Indutor de estresse oxidativo	100 mM em H_2O
Menadiona (Mena)	Indutor de estresse oxidativo	100 mM em DMSO
H_2O_2	Indutor de estresse oxidativo	p.a

3.3.2. Soluções para análise de ChIP-qPCR

- Solução SDS 10%

- Glicina 2,5M

- Tampão de lise

50 mM de HEPES pH 7,5

90 mM de NaCl

1 mM de EDTA pH 8,0

1% de Triton X-100

0,1% de deoxicolato de Na (Na-Doc)

Os inibidores de protease, PMSF (50 mM), antipaína (5 mg/µL), e pepstatina (1 mg/mL).

- Cloreto de lítio

10mM de Tris-HCl, pH 8,0
0,25M de LiCl
0,5% de Na-Doc
5% de NP-40
1mM de EDTA

- Tampão TE

1M de Tris-HCl, pH 8,0
0,5 M de EDTA, pH 8,0

- Tampão TES

50mM de Tris-HCl, pH 8,0
10mM de EDTA, pH 8,0
1% de SDS

3.3.3. Soluções para análises de microscopia

- Solução estoque H_2DCFDA

Foi preparado uma solução estoque 100 mM e, a partir desta, uma solução de uso 1 mM diluída em DMSO.

- Solução estoque MitoTracker

Foi preparado uma solução estoque de 150 mM e, a partir desta, uma solução de uso 1 mM diluída em DMSO.

- Solução estoque de DAPI (4,6-diamino-2-phenilindol)

Foi feita uma solução estoque de 100 µg/mL e, a partir desta, uma solução de uso 0,5 µg/mL em DMSO. Esta solução foi mantida fora do alcance da luz, -20^{o}C.

- Solução estoque de calcofluor

Dissolveu-se o equivalente a 100 µg/mL de calcofluor (Sigma), em uma gota de KOH 1 M e a seguir adicionou-se o volume adequado de água destilada. A solução foi mantida fora do alcance da luz a -20°C.

- Solução de fixação para microscopia I

3,7% (v/v) de formaldeido

50 mM de NaH_2PO_4 , pH 7,0

0,2% (v/v) de Tween 80

Dissolveu-se em água destilada.

- **Tampão PBS ("Phosphate buffered saline") 10X concentrado**

350 mM de NaCl

180 mM de KCl

25 mM de Na_2HPO_4

18 mM de KH_2PO_4

pH 7,4

3.4. Propagação das linhagens de *Neurospora crassa*

3.4.1. Obtenção de conídios

Para a obtenção de conídios, as diferentes linhagens foram cultivadas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM sólido, acrescido de sacarose 2 %, a 30ºC durante 2 dias. Em seguida, as linhagens foram expostas à luz e à temperatura ambiente por 8 a 9 dias Após esse período, os conídios das diferentes culturas foram coletados com água destilada estéril gelada e filtrados através de gaze estéril, e o número de células por mL das suspensões conidiais foram determinados em câmara de Neubauer.

3.5. Confirmação de nocaute gênico por PCR

A linhagem mutante na ORF NCU01629 foi adquirida pelo FGSC, sendo assim foi realizada a confirmação do nocaute da linhagem mutante por PCR. Para isto, o DNA genômico foi extraído e utilizado na reação de PCR.

3.5.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir dos micélios das linhagens selvagem e mutante obtidos após crescimento a 250 rpm, 30ºC por 24 h em meio de cultura VM

liquido, acrescido de 2 % sacarose. Para isto, uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo uma mistura de 500 µL de tampão de extração de DNA genômico (200 mM Tris-HCl, pH 8,0, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 1 % SDS) e 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e homogeneizado em vortex.

O sobrenadante foi separado por centrifugação (16.000 *x g*, 10 min, 4ºC) e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL. Em seguida, o sobrenadante foi precipitado em 50 µL de 3 M acetato de sódio, pH 5,2 e 950 µL de isopropanol a -80ºC por 30 min. O precipitado foi recolhido (16.000 *x g,* 10 min, 4ºC) e ressuspenso em 100 µL de água, e em seguida digerido com uma solução contendo RNAse A (10 mg/mL) a 37ºC, 30 min.

Foi realizada nova extração com 200 µL de fenol: clorofórmio:álcool:isoamílico na proporção 25:24:1, homogeneizado em vortex e centrifugado (16.000 *x g*, 10 min, 4ºC). A fase aquosa foi recolhida em novo microtubo e realizada uma nova precipitação a baixa temperatura com 40 µL de 7,5 M acetato de amônio e 750 µL de etanol absoluto gelado, e a seguir, recolhido (16.000 *x g,* 10 min, 4ºC) e lavado 3 vezes com 700 µl de etanol 70%, seco ao ar, e ressuspenso em 50 a 100 µL de água. A concentração de DNA foi quantificada em NANOVUE™ PLUS (GE) no comprimento de onda de 260 nm e a pureza da amostra foi analisada através da relação das absorbâncias a 260/280nm.

3.5.2. Análise por PCR

Após extração do DNA genômico da linhagem mutante e selvagem foram realizadas reações de amplificação utilizando os oligonucleotídeos NCU01629-F (5'-GCTAGCATGGCCCTCACTCCGCCCTC-3') e NCU01629-R (5'-GAATTCTCACCTCCCCCAAGAATGAC-3') em um termociclador *AB Applied Biosystems.* Foi utilizado 1 µL de DNA genômico (1 µg/µL), 0,5 µL (1,25 U) da enzima Phusion DNA Polimerase (Finnzymes), 1 µL dos oligonucleotídeos F e R (100 pmol/µL), 10 µL de 5 x Phusion Buffer GC, 1 µL de dNTP (10 mM cada) e 1,5 µL de DMSO.

A mistura foi homogeneizada e submetida a PCR, nos seguintes ciclos: desnaturação (98ºC/30seg), anelamento (64ºC/30seg) e extensão (72ºC/30 seg), por 34 ciclos, em um volume final de 20 µL de reação. Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão

TAE1x (400 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM ácido acético glacial, 10 mM EDTA), contendo brometo de etídio 0,5 µg/mL.

3.6. Confirmação do *mating type* da linhagem mutante

Para confirmar o *mating type* da linhagem mutante, a linhagem *fluffy* foi inoculada em placas de Petri contendo meio SC em concentração 0,1 x, acrescido de sacarose 0,5%. As placas foram incubadas a 30°C por 3 dias e, em seguida, mantidas à temperatura ambiente até a formação da estrutura feminina (protoperitécio). Em seguida, conídios da linhagem mutante (A, FGSC#11101) foram depositados sobre a linhagem *fluffy*, e as placas foram mantidas à temperatura ambiente até a formação de peritécio, indicando o cruzamento entre as linhagens.

3.7. Análises morfológicas da linhagem mutante

Foram realizadas análises fenotípicas nas linhagens selvagem FGSC#9718 e mutante *Δore-1*

3.7.1. Crescimento em meio sólido

Para analisar o aspecto macroscópico das linhagens, tais como produção do pigmento melanina, hifas aéreas e conidiação, as linhagens selvagem e mutante foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio VM sólido acrescido de 2 % sacarose e mantidas a 30°C por 2 dias. Em seguida, os frascos foram transferidos para temperatura ambiente por um período de 8 dias. Após esse período, o aspecto macroscópico das linhagens foi analisado. A visualização das hifas das linhagens foi realizada em placas de Petri contendo 30 mL de meio VM sólido acrescido de sacarose 2 %. Para tal, foram inoculados 10 µL de uma suspensão conidial (10^7 células/ mL) e em seguida as placas foram incubadas a 30°C por 24 horas. As imagens foram obtidas com o auxílio de um estereomicroscópio trinocular SteREO Discovery.V8 (Zeiss) com câmera fotográfica acoplada.

3.8. Identificação do domínio de ligação do fator de transcrição

O *motif* de ligação foi identificado pelo grupo do Dr. L Larrondo da Universidade Católica do Chile, por meio de uma abordagem de *Protein Binding Microarray* (PBM)

(WEIRAUCH et al., 2014). Resumidamente, os fatores de transcrição foram produzidos na forma recombinante fusionados a GST e hibrizados a arranjos de sequências promotoras correspondentes à região de 3 kb *upstream* ao códon de iniciação ATG de cada gene.

3.8.1 Categorização dos prováveis alvos

Os prováveis alvos de regulação pelo fator de transcrição hipotético codificado pela ORF NCU01629 foram identificados por bioinformática e classificados pelo FunCat (Catálogo Funcional), disponível em: (http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis/ resourcesservices/services/funcat-the-funct ional-catalogue/index.html). Em seguida, as sequências polipeptídicas foram comparadas com outras disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) utilizando a ferramenta Blastp (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/).

3.9. Determinação da sensibilidade a agentes de estresse

As condições de estresse testadas neste estudo foram definidas com base nos resultados obtidos após categorização dos prováveis alvos de ORE-1 por FunCat. Analisou-se a diferença de crescimento radial entre a linhagem selvagem e *Δore-1* em meio de cultura contendo diversas fontes de estresse, como estresse osmótico, térmico, pH e oxidativo. Para estes ensaios, foram inoculados 10 µL de uma suspensão conidial (10^7 células/mL) em placas de Petri contendo 20 mL de meio VM sólido acrescido de 2% de sacarose.

3.9.1. Estresse osmótico

Foram acrescidos ás placas de Petri: NaCl, nas concentrações: 0,1, 0,5, 1,0 e 1,5 M e sorbitol, nas concentrações de 1 e 1,5 M. O crescimento radial das hifas foi avaliado nas placas incubadas a 30ºC após 24 e 48h.

3.9.2. Estresse térmico

O crescimento radial das hifas foi avaliado nas placas incubadas em diferentes temperaturas: controle (30ºC) e estresse térmico (45ºC).

3.9.3. Estresse de pH

O crescimento radial das hifas foi avaliado nas placas incubadas em pH 4,8, 5,2 e 7,8 a 30ºC por 24 e 48h.

3.9.4. Estresse oxidativo

Foram analisadas três diferentes agentes indutores de EROs: paraquat, um herbicida ($C_{12}H_{14}N_{12}$) nas concentrações de 10, 50 e 300 µM, menadiona (2-metil, 1,4-naftoquinona) nas concentrações de 0,5, 5, 10, 50 e 300 µM e péroxido de hidrogênio (H_2O_2) nas concentrações de 1, 5 e 10 mM. paraquat e menadiona induzem estresse oxidativo pelo aumento da formação de ânion superóxido (O_2-). A fonte de estresse oxidativo foi adicionada às placas nas concentrações indicadas. O crescimento radial das hifas foi avaliado nas placas incubadas a 30ºC após 24 e 48 h.

3.9.5. Indução de morte celular utilizando FOH

O objetivo deste experimento foi analisar a resposta das linhagens após indução à apoptose, utilizando o reagente FOH nas concentrações de 1, 10, 25 e 50 µM. Para este experimento foi necessária a utilização de concentrações bem maiores de FOH, levando em consideração as possíveis perdas com a degradação pela utilização de FOH em meio sólido e pela exposição prolongada a 30ºC. Para a análise de crescimento apical das hifas, acrescentou-se às placas de Petri o FOH e o crescimento radial das hifas foi avaliado nas placas incubadas a 30ºC após 24h.

Este ensaio também foi realizado utilizando uma diluição seriada de células e meio VM sólido contendo a solução FGS 1 x para indução de crescimento colonial. Para isto, conídios foram previamente diluídos em placas de 96 poços. Em cada poço foram colocados 90 µL de meio VM líquido, com exceção do primeiro poço onde foi colocado 100 µL de meio VM líquido. Na primeira coluna, adicionou-se uma suspensão conidial concentrada para a obtenção de uma densidade inicial de 10^8 células/mL. Diluições seriadas (10x) foram realizadas a partir da amostra inicial até atingir uma densidade de 10^3 células/mL. Posteriormente, 5 µL de cada diluição foram transferidos para placas de Petri contendo meio VM acrescido da solução FGS 1x. As placas foram incubadas a 30ºC por 24 e 48 h. Após o período as placas foram fotografadas.

3.10. Extração de RNA total e análise da expressão gênica

3.10.1. Condições do experimento

Uma suspensão de conídios (aproximadamente 10^7 células/mL) foi inoculada em 30 mL de meio VM líquido contendo 2 % sacarose em frascos Erlenmeyer com capacidade para 125 mL. Os frascos foram colocados a 30ºC sob agitação constante de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro e armazenado a -80ºC. As análises foram realizadas em 3 réplicas biológicas para a amostra controle, não submetida a estresse e para as amostras submetidas aos diferentes tipos de estresses. Para as análises de qPCR, foi utilizado a dose mínima necessária de cada reagente utilizado para avaliação de estresse oxidativo, identificada nos experimentos de crescimento em placa, para observar diferenças de crescimento em placa de Petri.

3.10.2. Extração de RNA total

O procedimento utilizado para a extração de RNA total foi descrito por Sokolovsky et al. (1990). Uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para microtubos contendo uma mistura de 750 µL de tampão de lise (Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0, NaCl 0,6 M, EDTA 10 mM, SDS 4%) e 750 µL de fenol saturado em Tris-HCl 100 mM, pH 8,0. A suspensão foi homogeneizada em *vortex* durante 5 min, em temperatura ambiente e centrifugada a 10.000 x *g*, 10 min a 4ºC. 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 x *g*, 10 min a 4ºC. O RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de LiCl 8 M, mantido a 4ºC por 2 h e coletado a 10.000 x *g*, 10 min a 4ºC.

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 a 4ºC, durante 5 min. O RNA total foi coletado a 10.000 x *g*, 10 min a 4ºC, lavado duas vezes com uma solução de etanol 70 % gelada a 10.000 x *g*, 10 min a 4ºC, seco e dissolvido em 100-130 µL de água previamente tratada com DEPC. A concentração do RNA foi quantificada a 260 nm utilizando o espectrofotômetro

Beckman, modelo DU-640 e a pureza das amostras foi analisada através da relação das absorbâncias a 260/280 e 230/270 nm.

3.10.3. PCR quantitativo (RT-qPCR)

A análise da expressão gênica foi realizada pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR). Os genes alvos utilizados na análise de RT-qPCR estão descritos na tabela 1. Inicialmente, as amostras de RNA (20 µg) foram tratadas com DNAse RQ1 RNAse-Free (Promega®). Após essa primeira etapa, utilizou-se para a síntese do cDNA o kit SuperScript III First Strand (Invitrogen®) e oligo dT. As análises de 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)*. 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®).

Tabela 3 – Genes alvos utilizados na análise de RT-qPCR

ORF	Gene	Proteína
NCU08791	cat-1	Catalase-1
NCU00355	cat-3	Catalase-3
NCU05770	cat-2	Catalase-2
NCU05780	gst-1	Glutationa-S-Transferase-1
NCU04109	gst-2	Glutationa-S-Transferase-2
NCU09560	Sod	Superoxido dismutase
NCU10775	nox-2	NADPH oxidase 2
NCU02463	Bax	BAX
NCU09882	metacaspases1A	Metacaspases-1A
NCU08766	p53-like	Proteína hipotética
NCU00549	gstom-1	Glutationa-S-Transferase-Omega1

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados nas análises por RT-qPCR.

Primer	Sequência (5' → 3')	ORF
cat-1-F	TCACAGATGCCGTCAAGATT	NCU08791
cat-1-R	CAAGCCATCCAACTCTCTGT	NCU08791
cat-3-F	CCGTCCTAGCCAGATTCTTA	NCU00355
cat-3-R	CCTTGATAACCTCGTCCTGA	NCU00355
cat-2-F	GCAAGCTTACCAATGACTACT	NCU05770
cat-2-R	CGGTCATAGCCAATGAAGAC	NCU05770
gst-1-F	AGGAGGAGTATGATGAGGACAA	NCU05780
gst-1-R	CCACCAGCAGGAATCATGTTA	NCU05780
gst-2-F	AACTTCGAGGCTCAATTCCC	NCU04109
gst-2-R	CTCCTCCTCGCTCAACTTGT	NCU04109
sod-F	CTGATTACCCGTGCCAAC	NCU09560
sod-R	AGTACTCTGCCTTCCTGTT	NCU09560
nox-2-F	CTCTCTGTTGTTGGCTATCG	NCU10775
nox-2-R	CCTCAAGCCAGTAATGGTATC	NCU10775
bax-F	AGTATCATGTGGAGGAGGAG	NCU02463
bax-R	CTCAAGATAGCCAGAAACAGAT	NCU02463
metacaspases1A-F	GTAGCAAGGACGATCAGACT	NCU09882
metacaspases1A-R	CGTAGCTTTGCTTGGGATTC	NCU09882
plike-F	AGAGGGAGAGAGAGCATTTC	NCU08766
plike-R	CCATGTGCTTCCATCTCATAC	NCU08766
gstom-1-F	TGAGGTGGATGAGGAGATTT	NCU00549
gstom-1-R	TCCTCCGCATACCTCTTATAC	NCU00549
act-F	CCATGTACCCTGGTCTCTCCGAC	NCU04173
act-R	CCACCGATCCAGACGGAGTACTTG	NCU04173

3.11. Construção da linhagem complementada his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp

Para a construção da linhagem his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp, a ORF NCU01629 foi clonada no vetor pTSL91A, possibilitando a fusão ORE-1::GFP. O vetor pTSL91-A (Fig. 1), foi gentilmente cedido pela Dra. N. L. Glass (Department of Plant and Microbial Biology, UC Berkeley, USA). Este vetor permite a expressão da proteína ORE-1 fusionada à proteína fluorescente GFP versão superfolder (sfGFP) na sua extremidade

C-terminal de maneira constitutiva, uma vez que a expressão se encontra sob o controle do promotor do gene constitutivo de *N. crassa ccg-1*. Então, o vetor foi inserido, por transformação na bactéria *Escherichia coli* (DH10B), e após a seleção do clone positivo, o DNA plasmidial foi checado por reações de PCR gerando a construção plasmidial pTSL91A-*ore-1*. Este plasmídeo foi utilizado para transformação da linhagem WT#9718 de *N. crassa.* Dez transformantes foram selecionados em meio contendo higromicina. Em seguida, foi realizado um cruzamento entre a linhagem *Δore-1* (*mating type*, A) com a linhagem WT#9716 (*his*, a). os segregantes foram selecionados em meio contendo higromicina e histidina. Após a formação do peritécio, os transformantes foram selecionados. Um segundo cruzamento foi realizado com a linhagem WT#9718, para obtenção de homocários. Esta linhagem complementada foi utilizada para as análises de ChIP-qPCR, e para as análises de localização nuclear e localização mitocondrial.

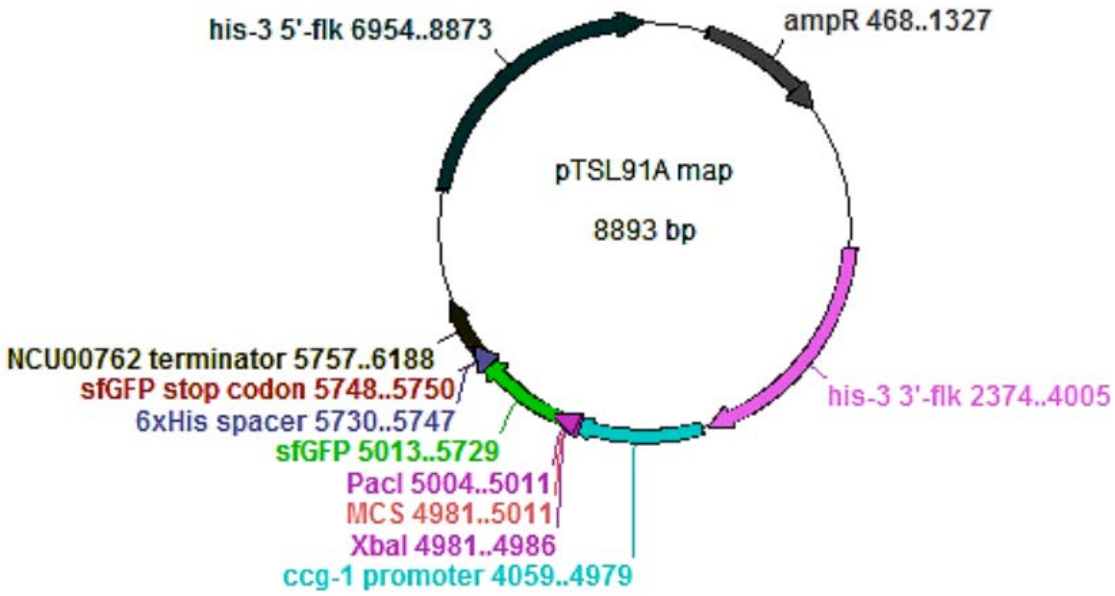

Figura 2. Mapa físico do plasmídeo pTSL91-A. O vetor pTSL91-A possui o gene sfgfp. A clonagem da sequência alvo *in frame* à sequência *sfgfp* possibilita a expressão da proteína de interesse fusionada à proteína fluorescente na extremidade C-terminal.

3.12. Ensaio de ChIP-qPCR

Os ensaios de ChIP foram realizados como descrito por Tamaru et al. (2003) com modificações. Resumidamente, conídios da linhagem *his3::Pccg1-ore-1-gfp* foram inoculados em meio VM acrescido de sacarose 2% e mantidos em agitação a 30ºC. Após 24 h, o micélio foi separado em frações e transferidos para outros frascos

contendo VM, sacarose 0,5% e os agentes estressantes Para, Mena, H_2O_2 e FOH. Após 1h foi adicionado formaldeído 1% e os frascos foram mantidos por 30 min a 30ºC com agitação. Em seguida, foram adicionados 125 mM de glicina (2,5 M) e os frascos foram mantidos por 10 min a 30ºC. Os micélios foram coletados, pulverizados com nitrogênio liquído e transferidos para 6 ml de tampão de lise.

O DNA foi sonicado utilizando o Sonics Vibra Cell (8-10 ciclos de: 1 mim, amplitude 40%, 8,0 seg ON, 9,9 seg OFF em gelo). Foram adicionados 35 µL de Dynabeads® Proteína G (Novex Life Technologies) a ambas amostras, seguido de incubação com rotação por 4 h a 4ºC (*pré-clear*). Em seguida, adicionou-se 4 µL de anticorpo anti-GFP (Sigma) e manteve-se as amostras com agitação suave durante 16 h a 4ºC. Como controle negativo, uma reação sem anticorpo foi incubada juntamente com o experimento.

As *beads* foram separadas da solução usando uma *rack* magnética e lavadas sequencialmente com 1,5 mL de tampão de lise ChIP sem inibidores de protease, tampão de ChIP com NaCl 0,5 M, tampão de ChIP com LiCl e 1x TE pH 7,5. Finalmente, as *beads* foram lavadas com 62,5 µL de TES, aquecidas a 65ºC por 15 min, com agitação periódica. Os sobrenadantes foram incubados a 65°C por 16 h. Extrato de cromatina sonicada (20 µL) mais 105 µL de TES também foram incubados a 65ºC por 16 h (Input da reação). Em seguida, 125 µL de água e 2,5 µL de RNAse A (10 mg/mL) foram adicionados as amostras, seguida de incubação por 2 h a 50ºC e adição de 6,25 µL de proteinase K (20 mg/mL). A mistura final foi incubada por 2 h a 50ºC. As amostras foram extraídas com 250 mL de fenol:cloroformo:álcool:isoamílico (24:24:1).

O sobrenadante foi precipitado com 10 µL de glicogênio (20 mg/mL), 25 µL de acetato de Na 3M pH 5,0 e 865 µl de etanol 100% por 2 h a -80ºC. As amostras foram centrifugados a 14000 rpm a 4ºC por 30 minutos, o precipitado foram lavados com 650 µL de etanol 75% e novamente centrifugado por 5 min. O Input foi resuspenso em 150 µL de água, e os DNAs imunoprecipitados com anticorpo e sem anticorpo foram resuspensos em 50 µL de água.

O DNA foi quantificado por espectrofotometria utilizando o NanoVue Plus (GE). Primers foram desenhados para verificar a ligação do fator de transcrição ORE-1 a regiões promotoras dos genes *cat-1, cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod, nox-2, metacaspases 1A, bax, p53-like* e *gstom-1.* Input foi utilizado como controle positivo e 25 ng de DNA (Input, no Ab e IP) foram analisados por quantificação absoluta por PCR quantitativa (qPCR) no aparelho StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems) usando Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Todos os produtos de PCR foram analisados por curvas de melting, indicando a presença de um único amplicon. Os oligonucleotídeos utilizados para a análise de ChIP-qPCR estão na tabela 3.

Tabela 5. Oligonucleotides utilizados na análise de ChIP-qPCR

Primers	Sequências (5'→3')	Promotor	Posição
cat-1p-F	AGGCCATTGTCCAGAGA	*pcat-1*	-1471 to -1488
cat-1p-R	CTGCGGAGGACTTGAGA	*pcat-1*	-1577 to -1560
cat-3p-F	TTTCCTCGCCCTATGGT	*pcat-3*	-598 to -581
cat-3p-R	CTGATGGACATGGACTCTTG	*pcat-3*	-521 to -501
cat-2p-F	GGTTACGCGTTCCAGTTT	*pcat-2*	-1205 to -1187
cat-2p-R	GGAGAAGGAAGTCATGTGAAG	*pcat-2*	-1128 to -1107
gst-1p-F	GCTCATTCTCCTTTCTAAACCTT	*pgst-1*	-3228 to -3215
gst-1p-R	CGTATGGGTGCATTATATGTTGA	*pgst-1*	-2958 to -2935
gst-2p-F	GTGCATCAAGAAGAAGTACGA	*pgst-2*	-919 to -902
gst-2p-R	TTGCACATGCGACCATC	*pgst-2*	-1001 to -980
sodp-F	TGACAACTCCATCATGTGC	*psod*	-949 to -930
sodp-R	GGTAACGACGTTGTCCAAG	*psod*	-863 to -844
nox-2p-F	AGGCACTTCTCTTGTAGGT	*pnox-2*	-1110 to -1091
nox-2p-R	TTAACGCCGAGATCTGTTTC	*pnox-2*	-1031 to -1011
baxp-F	GTTTCTGTGCATTTCGGTTAG	*pbax*	-378 to -357
baxp-R	ATGGACATCATATCGACCTTG	*pbax*	-282 to -261
metacaspases1Ap-F	CGGAAGATGCCTGATGATG	*pmeta-1A*	-535 to -554
metacaspases1Ap-R	CTGCTATACACATAAAGTACCTCT	*pmeta-1A*	-478 to -454
plike-p-F	CACTTCTCTCCTCCGTCA	*pp53*	-298 to -280
plike-p-R	CACGGGATTGGGAGAAAC	*pp53*	-241 to -223
gstom-1p-F	CCAAGTTGACAGCTACCTC	*pgstom-1*	-616 to -597
gstom-1p-R	GCAGATAGTAGAGGCTTGAAA	*pgstom-1*	-541 to -520

3.13. Medida do acúmulo de EROs intracelular

A determinação de espécies reativas de oxigênio foi realizada com o reagente fluorescente 2'7' diclorodihidrofluoresceina diacetato (H_2DCFDA) (Sigma), segundo Liu et al., 2010), com adaptações. Os conídios de *N. crassa* da linhagem selvagem e mutante foram incubados por 5 h a 30ºC em meio VM líquido sob uma lamínula dentro de um aplaca de Petri. Em seguida o meio de cultivo foi descartado e os conídios incubados por mais 1 hora em meio VM contendo contendo o agente estressante. Em seguida, foi adicionado 5 µM do reagente H_2DCFDA por 30 min a 30ºC e a determinação da fluorescência do produto fluorescente DCF foi realizada em microscópio Zeiss (excitação 503 nm e emissão de 529 nm). As análises foram realizadas junto com o calcofluor com o intuito de corar os septos, para analisar se a fluorescência é capaz de passar pelos septos quando o fungo é submetido a diferentes formas de produção de EROs. O calcofluor foi visualizado em filtro DAPI.

3.14. Co-localização nuclear e mitocondrial

Neste experimento, as células de *N. crassa* foram coradas com DAPI, para os experimentos de co-localização nuclear, e para os experimentos de co-localização mitocondrial, as células foram coradas com MitioTracker red 633. Todas as imagens de contraste de fase em campo claro e as imagens fluorescentes foram capturadas pela câmera Axion Cam (Carl Zeiss). Processamentos adicionais nas imagens foram realizadas com auxílio do programa Adobe PhotoShop CS2 (Adobe Systems Incorporated, CA). Os ensaios de localização mitocondrial foram realizados no laboratório do Prof. Dr. Gustavo H. Goldman, FCF, USP, Ribeirão Preto, com o auxílio da doutoranda Patrícia Alves de Castro.

3.14.1 Coloração dos germinantes com DAPI

Para a coloração dos núcleos foi utilizado o corante DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride). Este corante apresenta especificidade para o DNA, evidenciando os núcleos que se coram de azul, brilhante. Incubou-se 10^7 conídios sobre lamínulas estéreis dispostas no fundo de placas de Petri contendo meio de cultura VM 2% de sacarose líquido, a 30ºC. As amostras foram crescidas por 5h. Após o período de crescimento, as células foram tratadas com Para, Mena, FOH e H_2O_2 e mantidas por

mais 1h a 30ºC. Em seguida, o meio de cultura foi descartado e as placas de cultivo foram fixadas por 30 min com solução de fixação. As lamínulas foram lavadas em tampão PBS 1x, e em seguida coradas por 5 mim com 0,5ug/mL de DAPI (Sigma, EUA). Após o tempo de coloração, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS 1x para descoloração e então montadas em lâminas e levadas para o microscópio. As lâminas foram visualizadas utilizando microscópio Carl Zeiss (Jena, Alemanha) em objetiva de imersão em óleo 100x. A coloração com DAPI foi analisada com filtro DAPI, com excitação a 365 nm e emissão a 445 nm.

14.2. Coloração dos germinantes com MitoTracker.

Para a marcação das mitocôndrias e visualização da rede mitocondrial foi utilizado o marcador MitoTracker red 633 (Invitrogen Molecular Probes). Conídios foram inoculados em lamínulas dispostas no fundo de placas de Petri contendo meio de cultura VM 2% de sacarose líquido a 30ºC por 5h. Após o tempo de incubação o meio de cultura foi esgotado e adicionou-se a fonte de estresse, as placas foram incubadas por mais 1h a 30ºC. Em seguida, o meio de cultura com a fonte de estresse foi descartado e as placas de cultivo foram fixadas por 30 min com solução de fixação e coradas com MitoTracker red 633. Foram utilizados 0,5 µl da solução estoque 1Mm do marcador em PBS 1x por 5 min. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas e mantidas em PBS 1x para a visualização. As células marcadas com MitoTracker foram visualizadas em temperatura ambiente em microscópio Carl Zeiss (Jena, Alemanha) utilizando a lente objetiva de aumento 100x. A coloração foi analisada com filtro mRFP com excitação de 572 nm e emissão de 629 nm.

15. Análise estatística

Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, para todas as amostras. Os dados amostrais foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey e Kramer através do programa GRAPHPAD INSTAT (Rutgers University, Camden, New Jersey, 1995). Os tratamentos foram considerados significativos para $p < 0,01$.

Resultados e Discussão

4.1. Características do fator de transcrição ORE-1

Como a ORF NCU01629 codifica uma proteína anotada no banco de dados do fungo *N. crassa* como hipotética, inicialmente foi realizado uma busca por homólogos funcionais já caracterizados bioquímica ou funcionalmente. A sequência polipeptídica foi comparada com outras disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (http:/ /www.ncbi. nlm.nih.gov) utilizando a ferramenta BlastP (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). O resultado desta busca revelou que o produto da ORF NCU01629 não apresenta homologia a nenhuma proteína funcionalmente caracterizada em outros organismos. Esta proteína possui 420 resíduos de aminoácidos, MM estimada de 45,91 kDa, ponto isoelétrico de 8,82 e dois domínios de ligação ao DNA *zinc finger* do tipo C_2H_2 na porção C-terminal.

4.2. Confirmação do nocaute e do *mating type* da linhagem mutante Δ*ore-1*

A linhagem mutante foi adquirida no FGSC *(Fungal Genetics Stock Center*), portanto foi confirmado o nocaute na ORF NCU01629. Esta confirmação foi realizada por PCR. A figura 3A mostra a presença de um fragmento de 1345 pb, correspondente à ORF NCU01629, amplificado somente na linhagem selvagem e ausente na linhagem mutante, confirmando o nocaute gênico.

Para a confirmação do fator de acasalamento *"*A" da linhagem mutante*,* foi realizado o cruzamento com a linhagem *fluffy "*a". A linhagem *fluffy* foi inoculada primeiro no meio de cruzamento SC, para indução da formação da estrutura sexual feminina (protoperitécio). As placas foram incubadas à temperatura ambiente. A formação do protoperitécio foi acompanhada com visualização em estereomicroscópio trinocular com um aumento de 100x. Após a formação da estrutura feminina, aproximadamente sete dias, a linhagem mutante foi depositada sobre o tapete e a placa novamente observada até a formação do peritécio, em média três dias, indicando o cruzamento entre as linhagens (Figura 3B). Foi realizado um controle negativo, cruzando a linhagem mutante com a linhagem *fluffy "*A". Neste caso não houve a formação de peritécios, confirmando que a linhagem mutante é de *mating type* "A" (dados não mostrados).

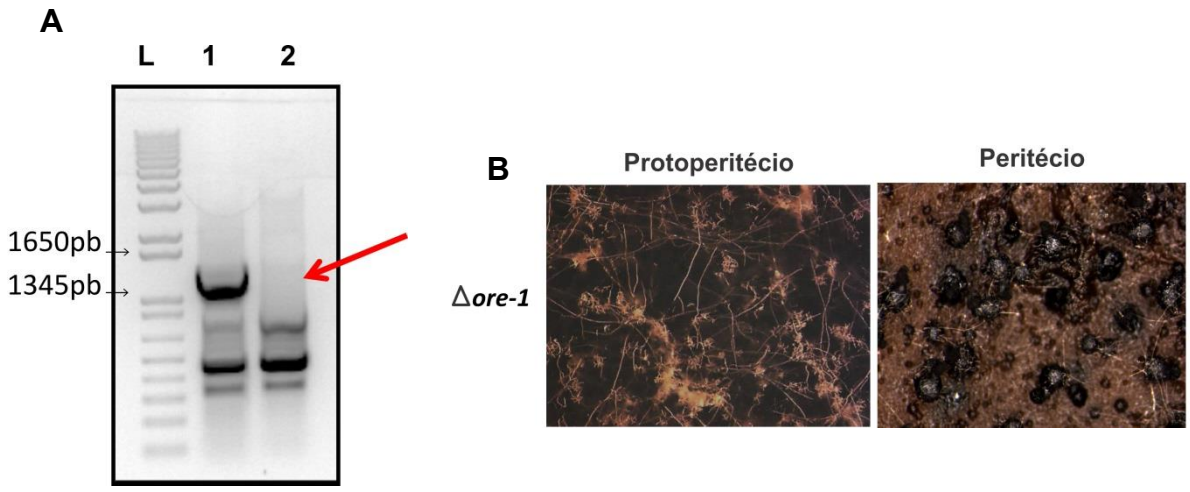

Figura 3- Confirmação do nocaute gênico e formação de protoperitécio e peritécio na linhagem mutante na ORF NCU01629. (A) Amplificação do fragmento da ORF NCU01629 (1345 pb). Canaleta 1- fragmento amplificado por PCR a partir do DNA genômico da linhagem selvagem. Canaleta 2- fragmento amplificado a partir da linhagem mutante. PM, ladder 1kb. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo 0,5 µg/mL. A seta vermelha indica a ausência do fragmento de 1345 pb na linhagem mutante Δ*ore-1*. **(B)** Formação de protoperitécio e peritécio após cruzamento com a linhagem *fluffy* em meio de cultura SC após 10 dias.

4.3. Caracterização fenotípica da linhagem Δ*ore-1*

4.3.1 Crescimento em meio sólido e análise das extremidades das hifas

A análise de crescimento da linhagem mutante em frascos Erlenmeyers contendo meio de cultura VM adicionado de 2% de sacarose teve como objetivo analisar a presença de alterações morfológicas na linhagem mutante. Os resultados obtidos após os primeiros três dias de crescimento mostraram um aspecto semelhante entre a linhagem mutante e a linhagem selvagem (Figura 4A). Após um período de 8-9 dias foi possível observar que não houve diferença também na produção do pigmento β-caroteno em relação à linhagem selvagem. A linhagem mutante também não apresentou redução de hifas aéreas (Figura 4B). Os conídios foram coletados, inoculados em meio VM e as placas foram incubadas a 30°C por 24 h. Os resultados demonstraram que a linhagem mutante também não apresentou alterações fenotípicas relacionadas ao crescimento e desenvolvimento quando comparada a linhagem selvagem (Figura 4C).

Ambas apresentaram o mesmo crescimento radial (em centímetros) em meio de cultura VM 2% de sacarose.

A análise da extremidade das hifas na linhagem mutante foi realizada com o intuito de verificar se a falta do fator de transcrição poderia alterar a micro-morfologia das hifas na linhagem nocauteada. As imagens apresentadas na figura 4D mostram que não houve diferença em relação à ramificação e a micro-morfologia das hifas entre as linhagens, sugerindo que o nocaute não reflete em anomalias na morfologia das hifas.

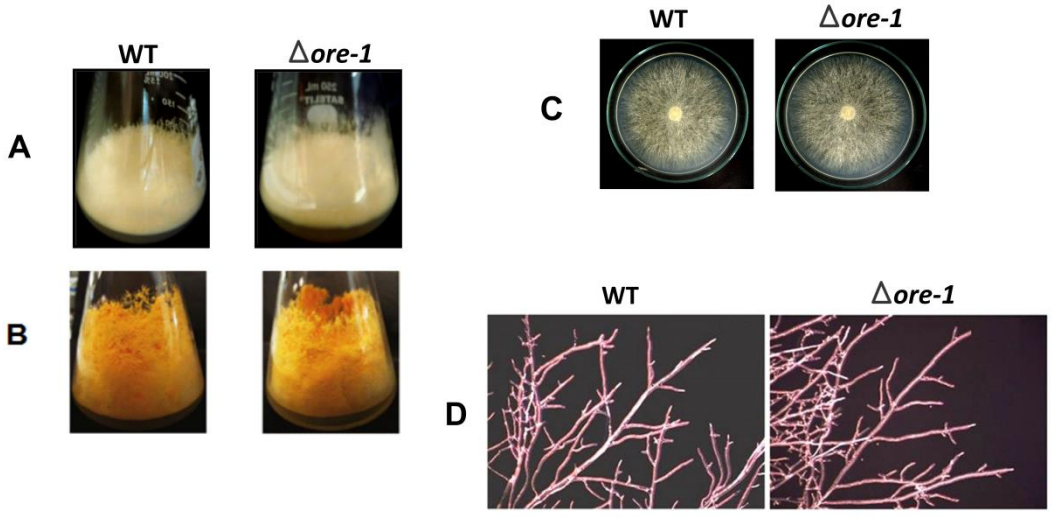

Figura 4– Caracterização morfológica das linhagens selvagem e mutante (A) Conídios foram inoculados no centro dos frascos erlenmeyer contendo meio VM 2% sacarose, as linhagens foram mantidas inicialmente a 30°C por 2 dias e, **(B)** posteriormente, à temperatura e luminosidade ambiente por mais 6 dias. **(C)** Análise do crescimento das linhagens selvagem e mutante em meio sólido. Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas a 30°C por 24h. **(D)** Análise da extremidade das hifas. Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24h a 30°C. Imagens foram detectadas com estereomicroscópio trinocular SteREO Discovery.V8 (Zeiss) com aumento de 50x.

4.4. Identificação dos prováveis alvos de ligação do fator de transcrição ORE-1

Análises de interação DNA-proteína *in vitro* foram realizadas por Weirauch et al., (2014), permitindo a identificação do *motif* de ligação ao DNA do fator de transcrição ORE-1 (Figura 5), bem como os genes provavelmente regulados por este fator de transcrição.

Os dados gerados pela análise de PBM revelaram aproximadamente 2.480 genes que poderiam ser alvos de ORE-1. Estes prováveis alvos foram classificados

levando em consideração o *score* de cada gene encontrado como possível alvo (12,1 a 10,3) sendo que o maior *score* indica uma maior probabilidade de ORE-1 se ligar aquele gene e o menor *score* uma menor probabilidade (dados não mostrados). Os 500 primeiros genes dessa classificação foram categorizados pelo *Functional Catalogue* (FunCat). Dentre estes genes foram encontrados e categorizados genes envolvidos no metabolismo de DNA, RNA, no reparo do dano ao DNA, na mitocôndria, energia, estresse e morte celular. Além disso, alguns genes que codificam para proteínas lipídicas e de resgate celular também foram identificados demonstrando que ORE-1 pode estar envolvida de forma direta ou indireta em alguns destes eventos celulares.

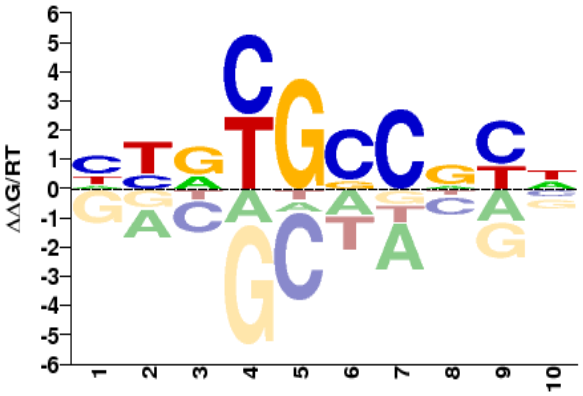

Figura 5- Identificação do domínio de ligação do fator de transcrição ORE-1 de *N. crassa* através da análise de PBM.

A figura 6 apresenta as categorias e subcategorias dos genes alvos. Nas maiores fatias do gráfico encontramos as classes de 01. metabolismo, 02. energia, 32. defesa/resgate celular-estresse, 40. morte celular e 70. mitocôndria. Dentro destas classes estão categorizados aproximadamente 190 genes.

As categorias selecionadas para análise de subcategorias estão destacadas em negrito (Figura 6A). As categorias selecionadas para análise de subcategorias foram energia, defesa/resgate celular-estresse, morte celular e mitocôndria. A análise de subcategorias (Figura 6B) revelou um grande número de genes relacionados com estresse, então alguns destes genes foram selecionados para maiores investigações (Figura 6C). Estes alvos são genes relacionados com EROs e morte celular.

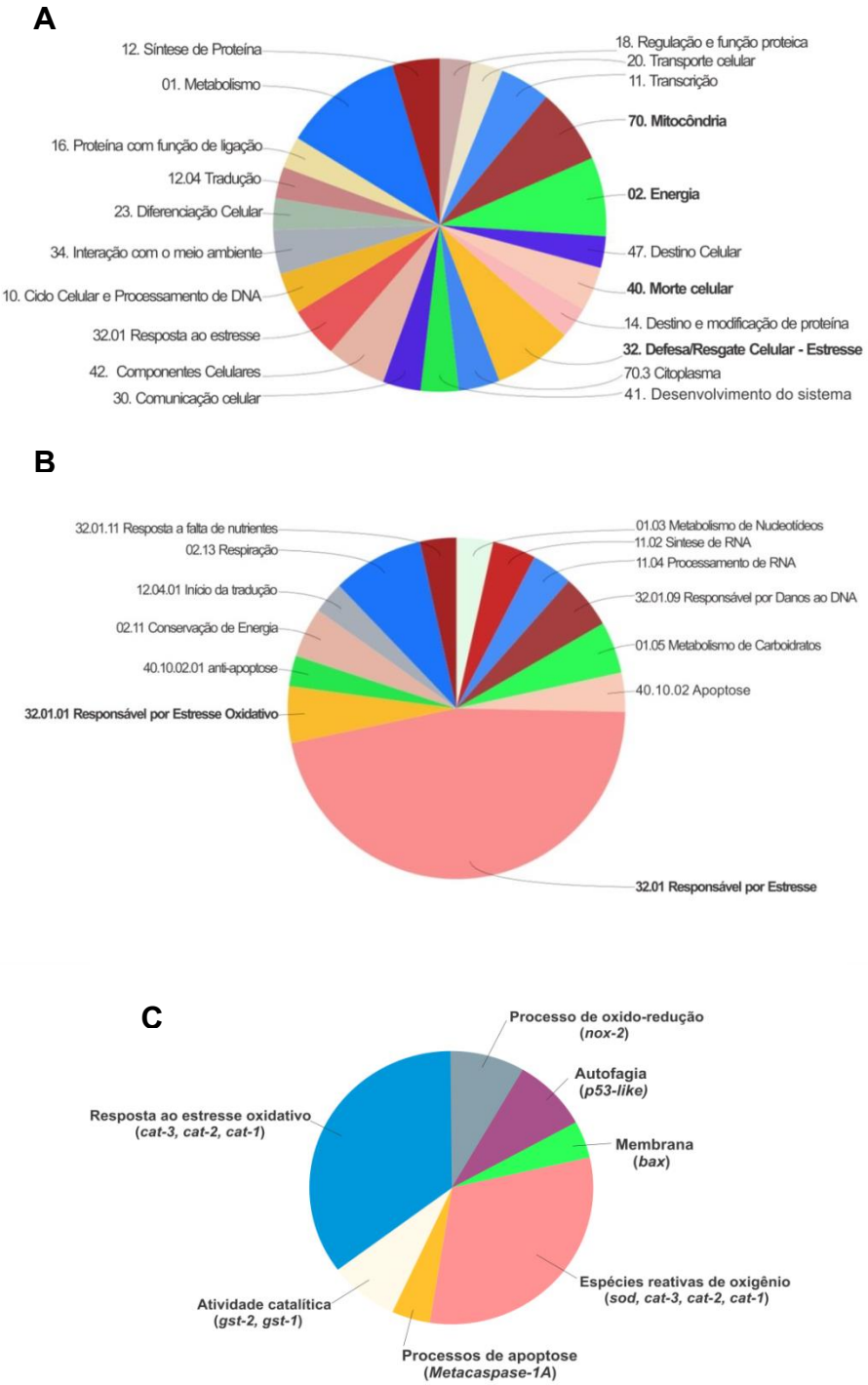

Figura 6- Categorização Funcional (FunCat) dos potenciais alvos de ORE-1. Categorização dos 500 genes, apresentando *scores* de 12 a 10,3 de acordo com análise de PBM. **(A) Categoria dos genes classificados.** Destes genes, 276 genes foram classificados nas categorias de metabolismo, transcrição, energia, mitocôndria, estresse e morte celular. As classes selecionadas para análises de subcategorias estão destacadas em negrito. **(B) Subcategorias dos genes selecionados como principais alvos.** Dentre os genes categorizados como responsáveis por estresse, a figura **(C)** mostra os alvos selecionados para maiores investigações. Estes alvos são genes relacionados a EROs e à morte celular. Análise dos genes por FunCat com FPKM >40.

4.5. Crescimento radial das linhagens selvagem e mutante Δo*re*-1 na presença de diferentes formas de estresse

Com o objetivo de investigar um possível envolvimento da ORE-1 de *N. crassa* na resposta ao estresse, o crescimento radial das linhagens selvagem e *Δore-1* foi avaliado na presença de agentes causadores de estresse osmótico (NaCl e sorbitol), térmico (45ºC), pH (4,2 e 7,8), oxidativo (Para, Mena e H_2O_2) e também na presença de um agente causador de morte celular por acúmulo de EROs intracelular (FOH).

4.5.1 Efeito do estresse osmótico, térmico e pH sobre o crescimento das linhagens

Neste estudo, as linhagens selvagem e *Δore-1* cresceram por 24 horas a 30ºC na presença de NaCl (0,1, 0,5 e 1 M), sorbitol (1 e 1,5 M), pH (4,2 e 7,8) e choque térmico de 45ºC em meio VM 2% sacarose, com o intuito de avaliar diferenças entre as linhagens.

Na ausência de agentes que causam estresse, a linhagem Δo*re*-1 cresceu igual à linhagem selvagem. Quando submetida ao estresse osmótico, térmico (45ºC) e de pH a linhagem mutante não apresentou alterações significativas de crescimento em relação à linhagem selvagem (Figuras 7 e 8). Sendo assim, foi possível concluir que a ausência do fator de transcrição não interfere no crescimento da linhagem em relação a estes tipos de estresses.

4.5.2 Papel do fator de transcrição na resposta ao estresse oxidativo

Em seguida, o efeito do estresse oxidativo sobre as linhagens selvagem e *Δore-1* foi avaliado. As análises de estresse oxidativo foram realizadas utilizando agentes (Para, Mena, H_2O_2 e FOH), que induzem a formação de espécies reativas de oxigênio no interior das células (ZHU et al., 2013) ocasionando os eventos de estresse oxidativo que podem induzir morte celular (SAVOLDI et al., 2008) em fungos filamentosos.

O paraquat é um herbicida de fórmula química $C_{12}H_{14}N_2$, que gera radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) no interior das células e induz, desta maneira, ao estresse oxidativo por aumentar a quantidade de EROs. A menadiona (2-metil, 1,4-naftoquinona), também induz estresse oxidativo, por gerar $O_2^{\bullet-}$ no interior das células. Entretanto, o paraquat, na maioria dos casos, gera ânions superóxidos na mitocôndria e a menadiona está mais

direcionada a gerar ânions superóxidos no citoplasma (revisto em CIRCU; AW, 2010). O H_2O_2 foi utilizado também como um agente estressante, pois o H_2O_2 age praticamente em todos os compartimentos celulares como mitocôndria, peroxissomo e citoplasma. O farnesol é um isopropenóide responsável por inibir a proliferação e induzir morte celular por gerar grandes quantidades de EROs no interior das células de fungos filamentosos (SAVOLDI et al., 2008; FIGUEIREDO et al., 2011).

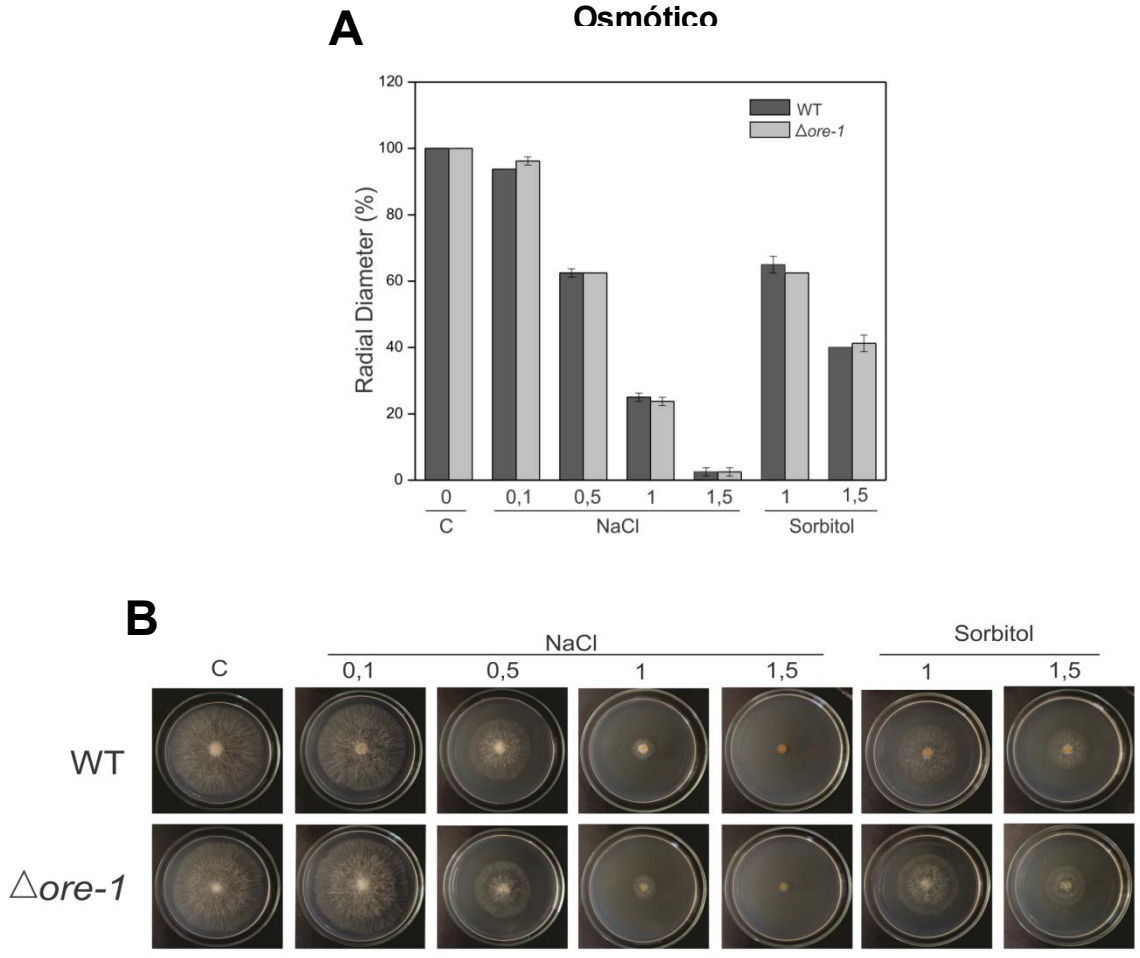

Figura 7- Sensibilidade da linhagem mutante (Δ*ore-1*) ao estresse osmótico em comparação à linhagem selvagem (WT). Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24h a 30°C, na ausência e na presença de NaCl e sorbitol. **(A)** Diâmetro radial medido em centímetros e o percentual de crescimento calculado em relação ao crescimento na ausência do agente estressante após 24h **(B)** Crescimento morfológico em placas de Petri. Os números se referem às concentrações em M. Controle (C). p>0,01.

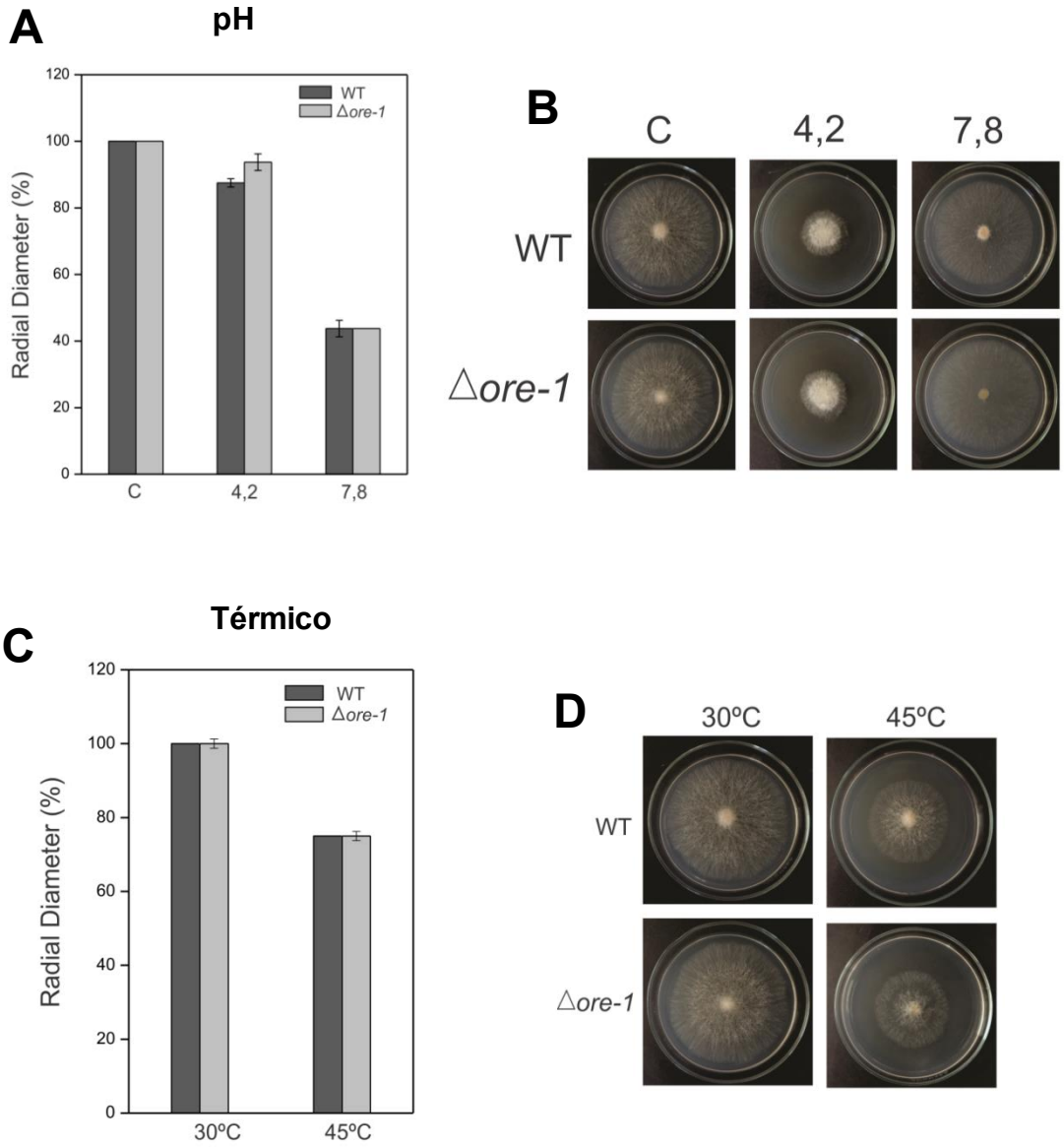

Figura 8- Sensibilidade da linhagem mutante (Δ*ore-1*) ao estresse térmico e de pH em comparação à linhagem selvagem (WT). Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24 h a 30°C e 45ºC, para os ensaios de estresse térmico e estresse de pH **(A e C)** Diâmetro radial medido em centímetros e o percentual de crescimento calculado em relação ao crescimento na ausência do agente estressante após 24 h (**B e D)** Crescimento morfológico em placas de Petri. Os números se referem ao pH. Controle (C). p>0,01.

Para avaliar o papel do fator de transcrição na resposta a diferentes formas de indução de EROs, as linhagens cresceram por 24 h a 30ºC na presença de Para (10, 50 e 100 µM), Mena (0,5, 5, 10, 50 e 100 µM), H_2O_2 (1, 5 e 10 mM) e FOH (1, 10, 25 e 50 µM) em meio VM 2% sacarose. Foi observado diferenças entre as linhagens quando submetidas ao estresse oxidativo (Figuras 9 e 10). Quando comparado com a linhagem selvagem, o crescimento de Δ*ore*-1 foi afetado por H_2O_2, Mena, Para e FOH. Estes dados sugerem que o fator de transcrição pode estar envolvido na resposta ao estresse oxidativo, pois existe fenótipo de sensibilidade e resistência no crescimento da linhagem *Δore-1.* Houve fenótipo de resistência quando submetida aos agentes Mena e H_2O_2 (Figura 9) e de sensibilidade quando *Δore-1* foi submetida aos agentes Para (Figura 10) e FOH (Figura 11A).

O estresse oxidativo pode ser quimicamente induzido por menadiona e paraquat, geradores intracelular de O_2•-, ou por H_2O_2 em *A. nidulans* (LIMA et al., 2008; MALAVAZI et al., 2006), em *S. cerevisiae* (CHEN, DUNIGAN, DICKMAN, 2003) e em *A. fumigatus* (DINAMARCO et al., 2012).

Neste estudo, buscou-se compreender o papel da ORE-1 no estresse oxidativo, investigando se a proteína está relacionada também com eventos de morte celular induzida por FOH ou se a morte celular ocorre por consequência da indução do estresse oxidativo. O crescimento irregular após tratamento com FOH ocorreu tanto na linhagem selvagem quanto na linhagem mutante. Entretanto, a linhagem *Δore-1* apresentou uma sensibilidade maior ao FOH quando comparada à linhagem selvagem (Figura 11A).

O segundo grupo de experimentos com FOH contemplou a diluição seriada das linhagens estudadas em placas com meio de cultura contendo FOH com o objetivo de analisar a sensibilidade da linhagem *Δore-1* ao FOH. Para este experimento foram utilizadas concentrações da droga até 1000 vezes maiores do que as utilizadas em meio liquido, considerando-se a possibilidade de algumas variações como degradação, inativação e evaporação do FOH pela incubação prolongada em meio sólido. Após a incubação a 30ºC por 50 h, a linhagem *Δore-1* apresentou uma diminuição de crescimento radial com o aumento da concentração de FOH, diferentemente do ocorrido na linhagem selvagem, que mostrou ser mais resistente nessas condições (Figura 11B). Em *A. nidulans* o farnesol desencadeia características morfológicas de apoptose nas linhagens (DINAMARCO, GOLDMAN, GOLDMAN, 2011) e em *S. cerevisiae,* o tratamento com farnesol aumenta a concentração de EROs nas mitocôndrias (FAIRIN, MacDONALD, McMASTER, 2006).

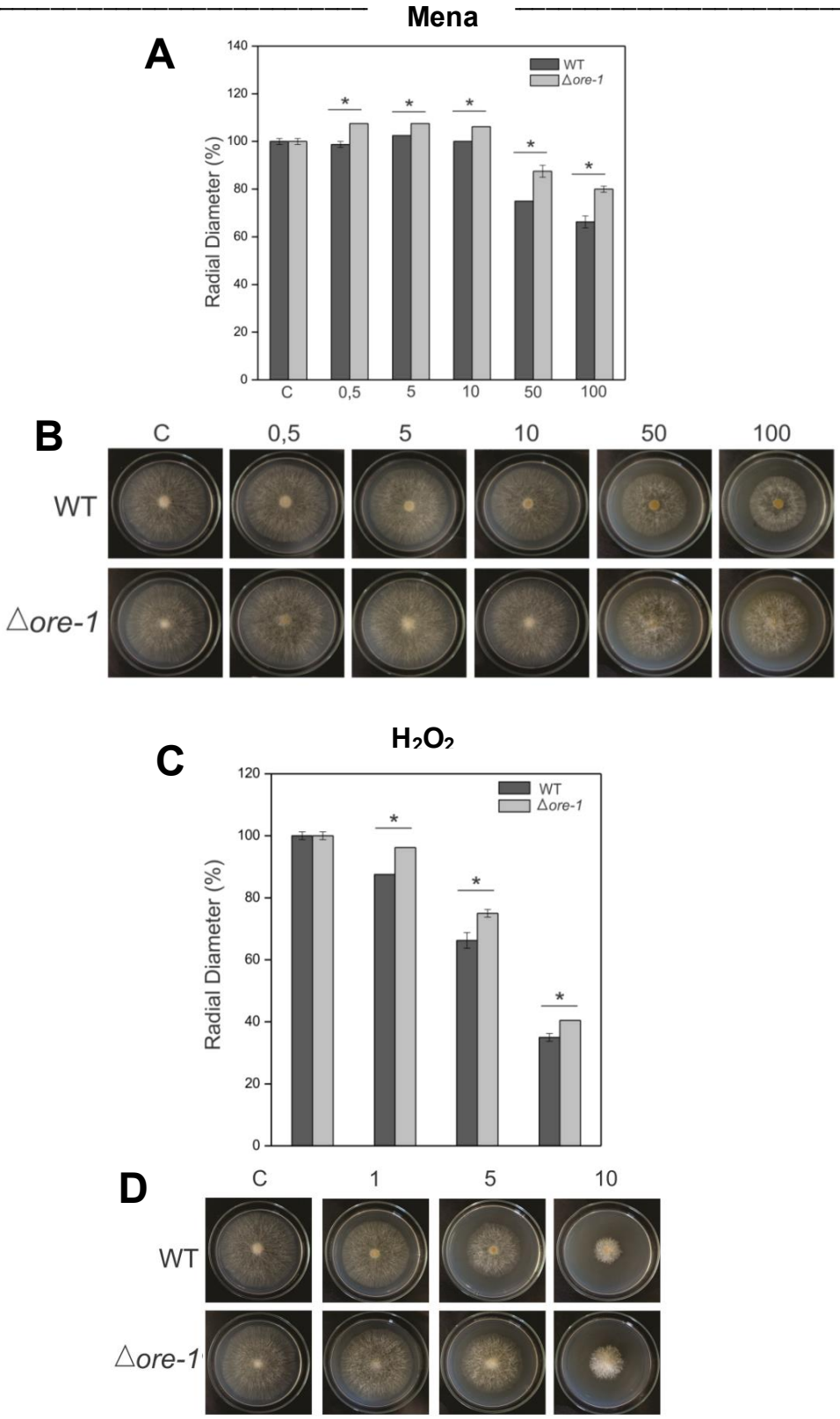

Figura 9- Aumento do crescimento radial da linhagem (Δ*ore-1*) na presença de Mena e H_2O_2, comparada à linhagem selvagem (WT). Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24h a 30°C na presença e na ausência de Mena e H_2O_2. **(A e C)** Diâmetro radial medido em centímetros e o percentual de crescimento calculado em relação ao crescimento na ausência do agente estressante após 24 h. **(B e D)** Crescimento em placas de Petri. Os números se referem às concentrações em µM para Mena e mM para H_2O_2. Controle (C). Os experimentos foram considerados significativos para (*,p<0.01).

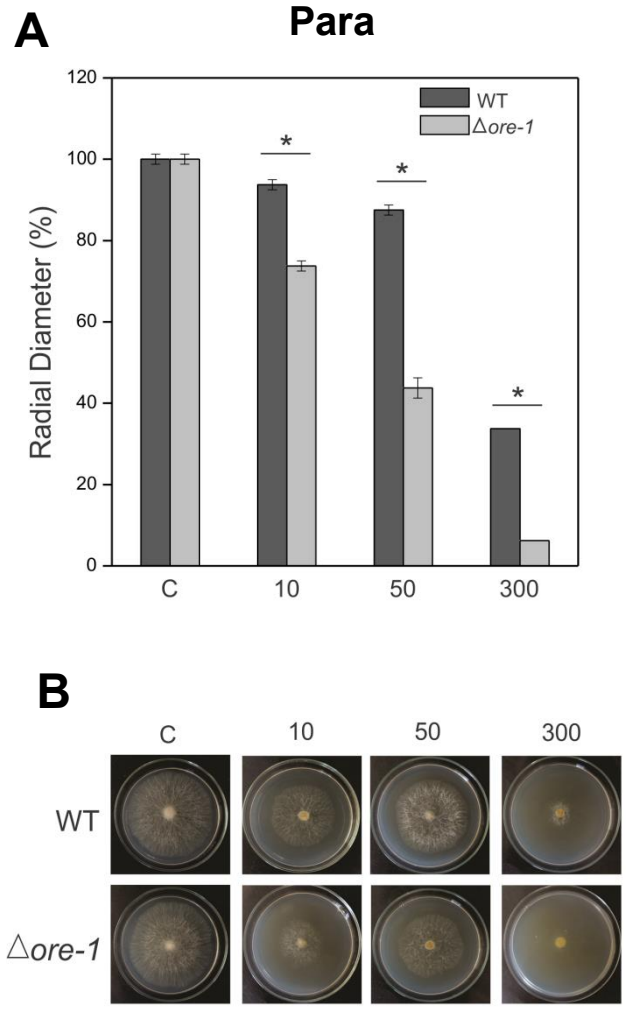

Figura 10- Inibição do crescimento radial da linhagem (Δ*ore-1*) na presença de Para, comparada à linhagem selvagem (WT) Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24h a 30°C na ausência e na presença de Para. **(A)** Diâmetro radial medido em centímetros e o percentual de inibição calculado em relação ao crescimento na ausência do agente estressante após 24h. **(B)** Crescimento em placas de Petri. Os números se referem às concentrações em µM. Controle (C). Os experimentos foram considerados significativos para (*,p<0.01).

Foi realizado, também um teste de sensibilidade ao FOH com a linhagem complementada ORE-1::GFP. A linhagem complementada se refere à construção *his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp.*, nesta construção, a ORF NCU01629 foi inserida no *locus his* permitindo a produção da proteína fusionada a GFP. Neste teste, foi possível observar que não houve diferenças entre a linhagem selvagem e a linhagem complementada, mostrando que a fusão a GFP não alterou o crescimento e o fenótipo da linhagem complementada (Figura 11B).

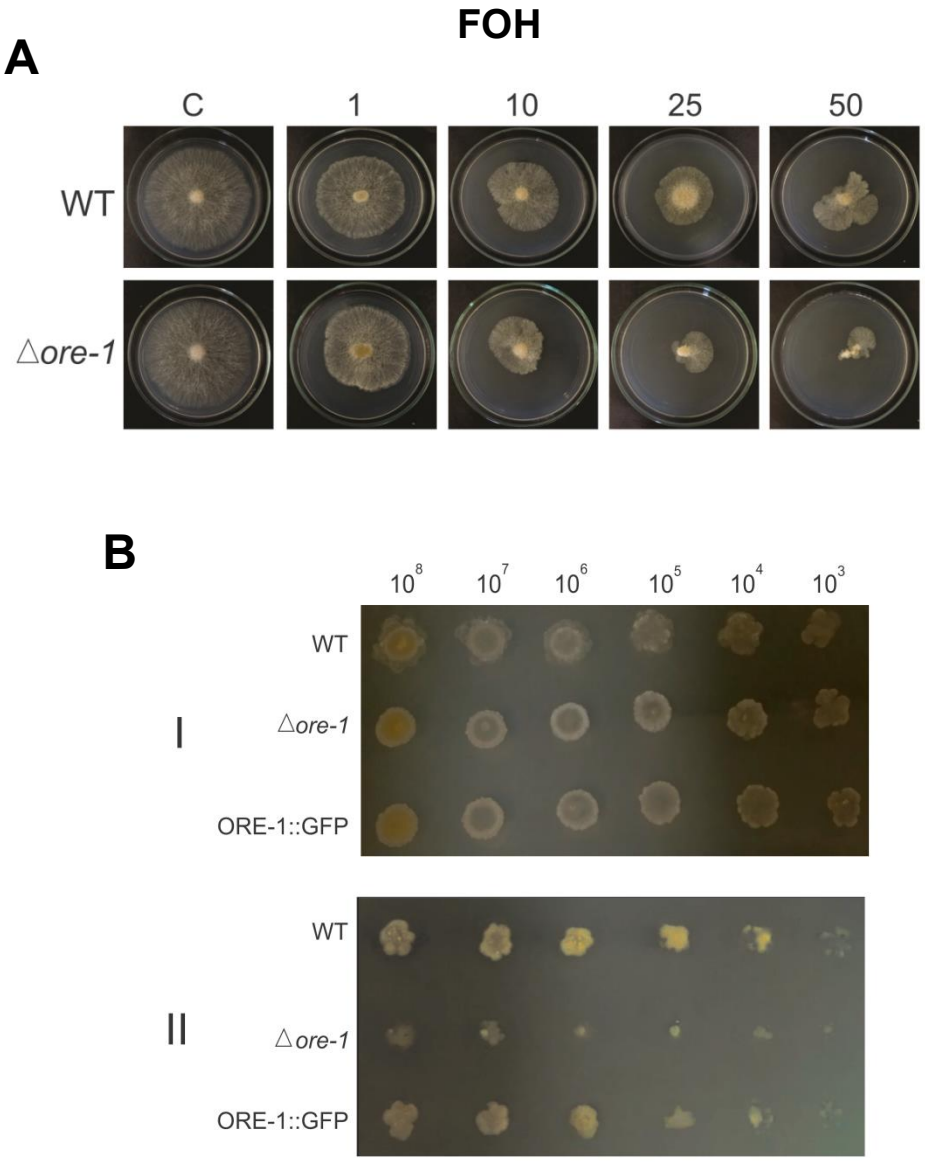

Figura 11- Sensibilidade das linhagens selvagem (WT), mutante (Δ*ore-1*) e complementada (ORE-1::GFP) na presença de FOH. Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24h a 30°C na ausência e na presença de FOH. **(A)** Crescimento das linhagens em placas de Petri. **(B) Diluição seriada 10^8 a 10^3 das células (I) Controle e (II) 50 mM.** Conídios foram inoculados em placas de Petri contendo meio VM 2% sacarose e FGS 1x. As placas foram incubadas por 50 h a 30°C na ausência e na presença de FOH. Os números se referem às concentrações em µM em **(A)** e mM em **(B).** Controle (C). A linhagem ORE-1::GFP refere-se à linhagem *his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp.*

4.6. Teste de sensibilidade com a linhagem complementada

A linhagem complementada (ORE-1::GFP) também foi testada quanto ao seu fenótipo e crescimento radial em comparação com a linhagem *Δore-1* e selvagem (Figura 12). Os testes foram realizados em placas de meio de cultura com Para (300 μM), Mena (100 μM) e H_2O_2 (10 mM). Não houve diferença de crescimento entre a linhagem selvagem e a linhagem complementada, demonstrado que a inserção do *tag* GFP não afetou o crescimento e o fenótipo da linhagem (Figura 12).

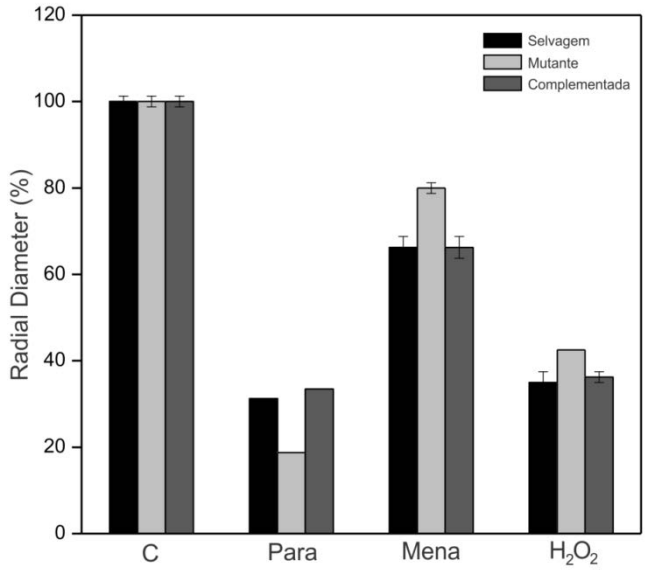

Figura 12- Teste de sensibilidade das linhagens selvagem (WT), mutante (Δ*ore-1*) e complementada (ORE-1::GFP). Conídios foram inoculados no centro das placas de Petri contendo meio VM e 2% sacarose e as placas foram incubadas por 24 h a 30°C na ausência de agente estressante. Controle (C) e na presença de Para (300 μM), Mena (100 μM) e H_2O_2 (10 mM). A linhagem complementada foi testada quanto ao seu fenótipo e crescimento radial em comparação com a linhagem Δ*ore-1* e WT.

A partir dos resultados obtidos podemos sugerir que a deleção da ORF NCU01629 causa mudanças na resposta de *N. crassa* frente a diferentes formas de estresse oxidativo. A ausência de ORE-1 provoca maior susceptibilidade celular no tratamento com drogas causadoras do aumento de EROs intracelular, como o Para e FOH e menor susceptibilidade celular no tratamento com Mena e H_2O_2, sugerindo uma possível atuação de ORE-1 na defesa ao estresse oxidativo.

4.7. Análises de expressão gênica por RT-qPCR

Visando verificar se os resultados de tolerância e sensibilidade mostrados pelo mutante *Δore-1* poderiam estar relacionados com o controle da expressão de genes relacionados com EROs, foram realizadas análises de expressão gênica por RT-qPCR. Os genes selecionados como potenciais alvos de ORE-1 estão apresentados na Figura 6C.

A indução dos genes *cat-1, cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod, nox-2, bax, p53-like e metacaspases-1A* ocorreu na ausência (controle) e na presença de estresse oxidativo utilizando os agentes Para, Mena, H_2O_2 e FOH. Os experimentos foram realizados utilizando as menores concentrações dos reagentes que induziram diferenças entre a linhagem selvagem e mutante. Para isto, as linhagens selvagem e *Δore-1* foram crescidas por 24 h em meio VM líquido com 2% de sacarose. Em seguida, o micélio foi coletado e transferido para meios de cultura contendo os agentes Mena, Para, H_2O_2 e FOH por 60 min. O RNA total foi isolado e utilizado nas análises de expressão gênica por RT-qPCR.

O envolvimento do fator de transcrição ORE-1 na resposta ao estresse oxidativo causado por diferentes drogas, ganhou forças após evidências de que os genes relacionados com estresse oxidativo (*cat-1, cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod e nox-2*) e morte celular (*bax, p53-like e metacaspases-1A*) tiveram suas expressões positivamente ou negativamente reguladas antes ou após o tratamento com as diferentes drogas (Figura 13).

O aumento da expressão gênica em alguns casos chegou a 300 vezes (gene *cat-2,* tratamento com H_2O_2 por 60 min) ou a diminuição da expressão foi 450 vezes menor na linhagem mutante (gene *gst-1,* tratamento com Para por 60 min). Conforme o esperado, as diferentes drogas testadas provocaram uma diminuição na expressão do gene *sod* após 60 min. O gene que codifica a *glutationa-S-transferase omega-1* (*gstom-1*) não foi encontrado como alvo de ORE-1. Sendo assim, este gene foi utilizado como controle negativo nas análises de expressão gênica. A figura 13K, mostra que o gene não mostrou ser regulado pelo fator de transcrição em todas as condições analisadas.

Estes dados sugerem um perfil transcricional complexo entre esses genes quando o fungo *N. crassa* é exposto a diferentes agentes que causam estresse oxidativo. De uma forma geral, a indução destes genes apresentou-se randômica, isto é, sem a dependência de um agente específico nos diferentes pontos de expressão, indicando que o fator de transcrição ORE-1 pode estar envolvido na resposta ao dano

celular causado por EROs, através da regulação direta ou indireta dos genes responsáveis pelos mecanismos antioxidantes. Os resultados também sugerem que a proteína pode participar da indução da morte celular por FOH, uma vez que o fator de transcrição regula a expressão de todos os genes testados.

De uma maneira geral, as mudanças nos perfis transcricionais ou traducionais na célula podem ser efeitos primários da resposta ao dano ou secundários aos processos celulares que respondem ao dano. Não existe uma única via, ou ainda uma única situação em que os eventos relacionados ao estresse oxidativo ou à morte celular podem ser desencadeados. O sistema modelo de estímulo à morte celular em fungos filamentosos vem sendo motivo de investigação com o objetivo de entender como e em que situações este evento é desencadeado (DINAMARCO, GOLDMAN; GOLDMAN, 2011). Em células de mamíferos, existem duas principais vias de morte celular: a via intrínseca, que necessita do envolvimento da mitocôndria e as vias extrínsecas, nestas vias as caspases são ativadas e a mitocôndria pode não participar do processo celular (ELMORE, 2007). Através da regulação da transcrição, o fator de transcrição CZT-1 confere resistência ao estresse oxidativo induzido por menadiona e H_2O_2 em *N. crassa* (GONÇALVES et. al., 2014).

Na figura 14, é possível verificar que na presença de Para ou FOH a proteína ORE-1 regula negativamente apenas um gene, *metacaspases-1A* e *gst-2*, respectivamente. Em ambos os estresses, a linhagem Δ*ore-1* apresentou maior sensibilidade no crescimento radial em comparação à linhagem selvagem. Na ausência de estresse oxidativo, os genes *gst-2* e *bax* não são regulados por ORE-1, esta regulação mostrou ser dependente de EROs nestes dois genes. O número de genes ativados pelo fator de transcrição foi maior do que o número de genes reprimidos.

4.8. Ensaios de Imunopreciptação da cromatina (ChIP-qPCR)

Os ensaios de ChIP-qPCR foram realizados com o objetivo de confirmar a ligação *in vivo* de ORE-1 à região promotora dos genes *cat-1, cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod, nox-2, metacaspases-1A, bax, p53-like* e *gstom-1.* Estes resultados também são muito importantes para confirmar os resultados de PBM obtidos por Weirauch (2014). Foram identificados muitos *motifs* para ORE-1 na região 5'-flanqueadora dos genes selecionados, e as regiões selecionadas para a análise por ChIP-qPCR estão destacadas com um quadrado pontilhado na Figura 15.

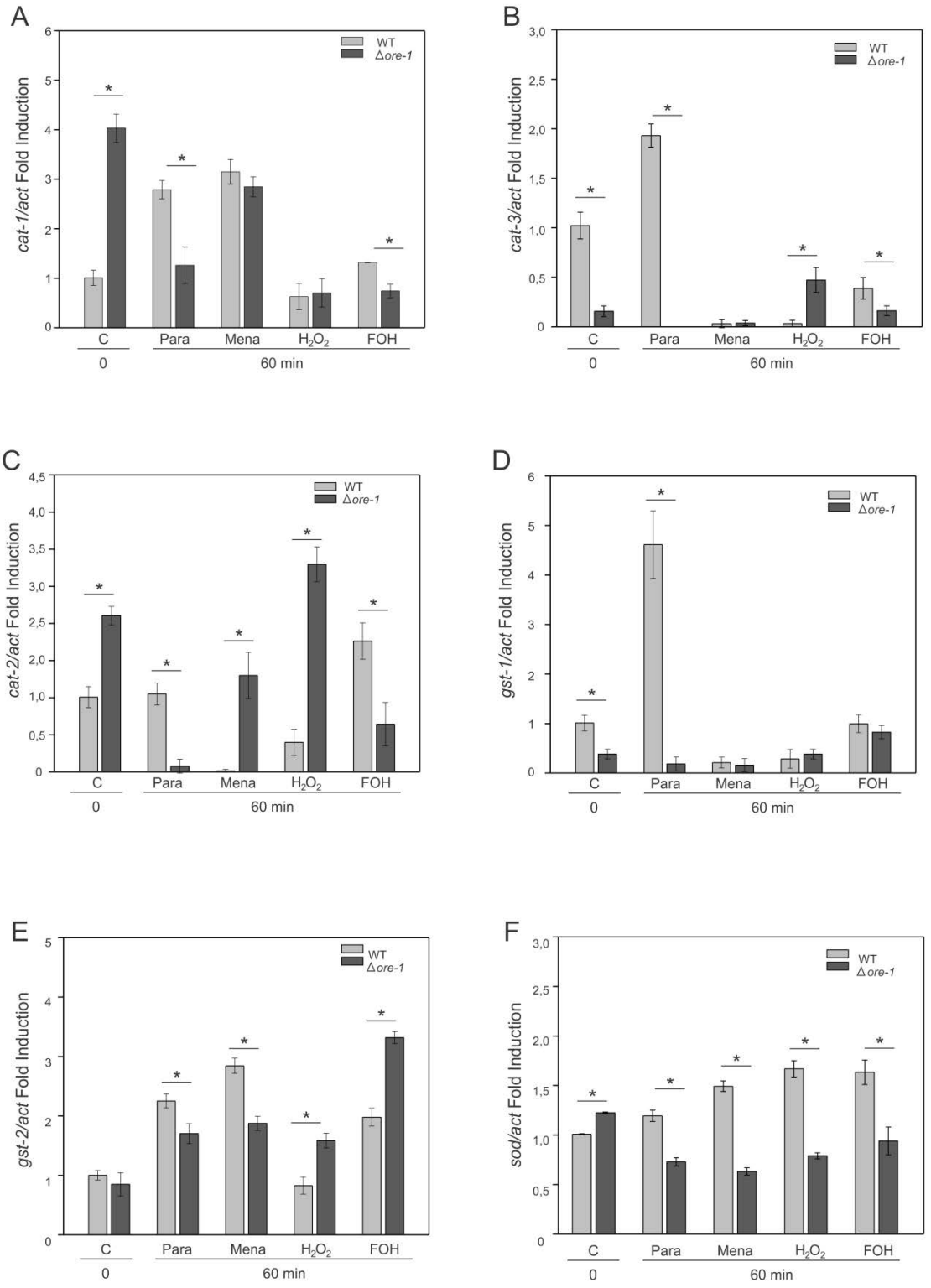

Figura 13– Perfil de expressão dos genes (A) *cat-1,* **(B)** *cat-3,* **(C)** *cat-2,* **(D)** *gst-1,* **(E)** *gst-2,* **(F)** *sod,* **(G)** *nox-2,* **(H)** *bax,* **(I)** *metacaspases1-A,* **(J)** *p53,* **(K)** *gstom-1*, *e* **(L)** *ore-1* **por RT-qPCR.** As análises foram realizadas na ausência (C) e na presença de Para (10 µM), Mena (50 µM), H_2O_2 (5 mM) e FOH (10 µM) por 60 min. Conídios foram inoculados em VM líquido com 2% de sacarose e incubados por 24 h. O micélio foi coletado e transferido para VM contendo os agentes estressantes e incubados por mais 60 min. Os micélios foram coletados e utilizados para a extração de RNA total e obtenção de cDNA. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados utilizando o gene actina (*act*) como gene de referência. Os dados foram anallisados utilizando StepOnePlus™Real-Time PCR System, Software v2.3 e correspondem às médias de resultados a partir de três réplicas biológicas. Os experimentos foram considerados significativos (*,$p<0.01$).

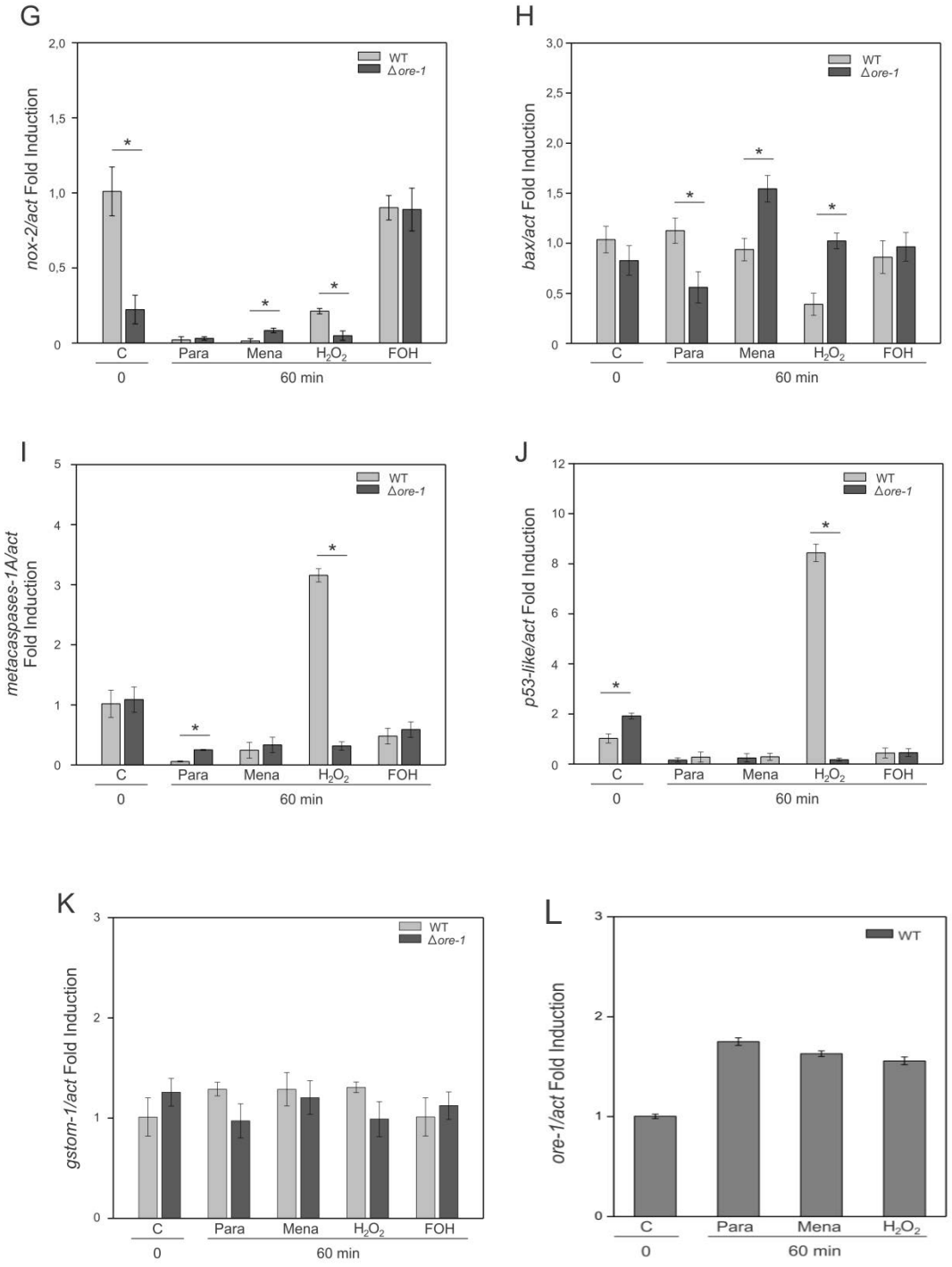

Figura 13– continuação

.

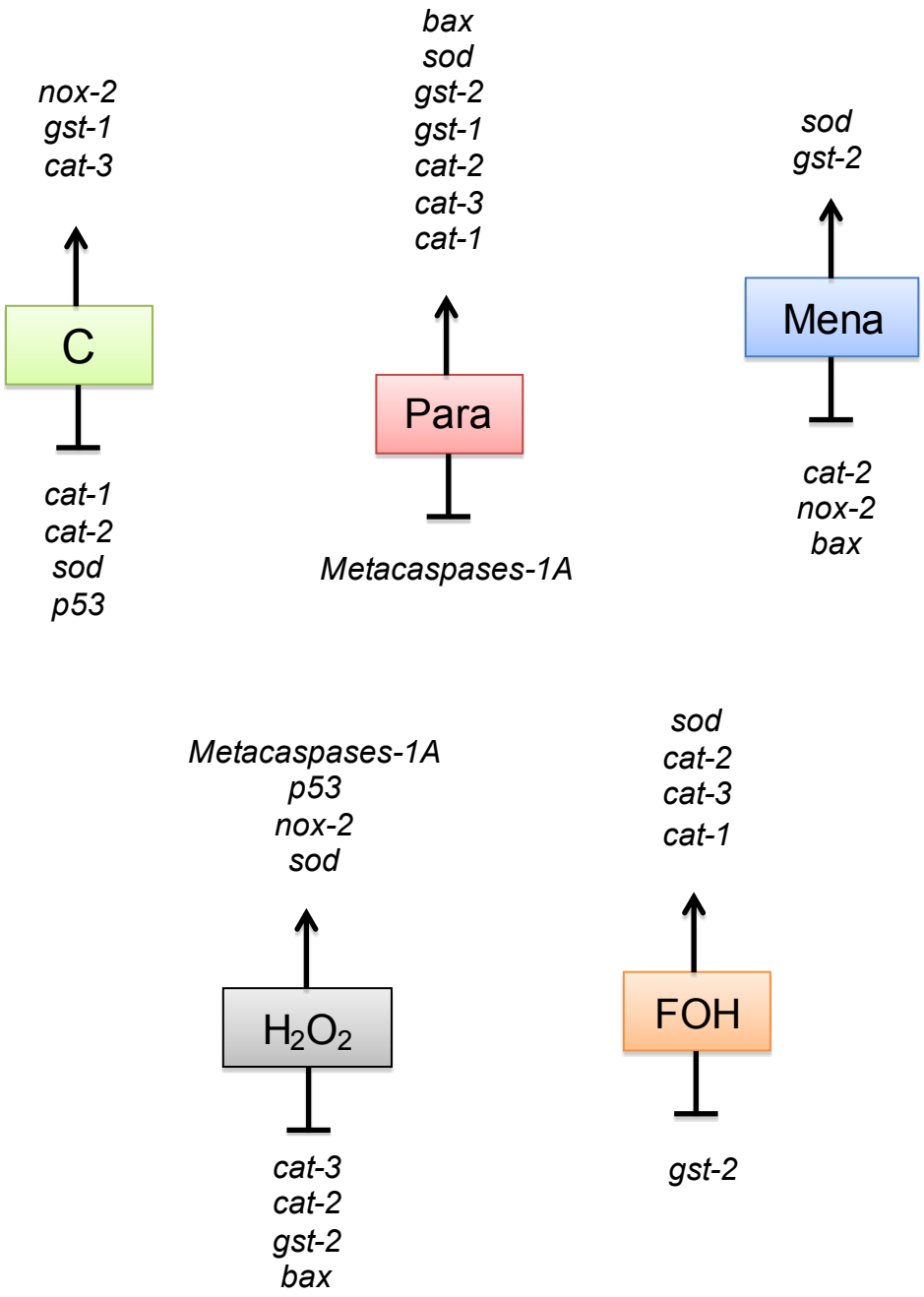

Figura 14– Perfil de expressão dos genes *cat-1, cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod, nox-2, bax, metacaspases1-A, p53,* e *gstom-1* por RT-qPCR agrupados de acordo com o agente de indução à EROs. A figura mostra os genes regulados positivamente (ativados) e os genes regulados negativamente (reprimidos) por ORE-1.

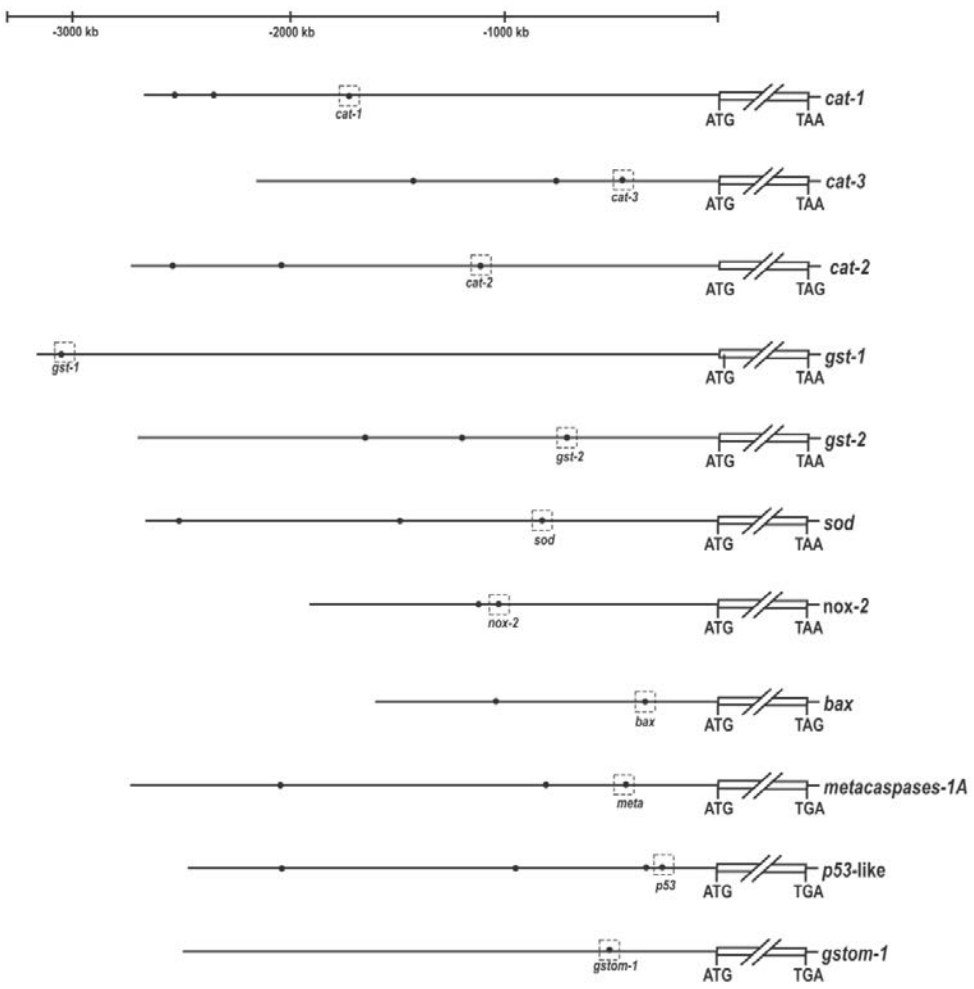

Figura 15- Representação esquemática dos promotores dos genes identificados como alvos de regulação por ORE-1. O motif 5'YRYGSCRY-3' de ORE-1 de *N. crassa* foi identificado nos promotores de todos os genes analisados. Os quadros pontilhados indicam as regiões selecionadas para análise por ChIP-qPCR. O tamanho das regiões *upstream* de cada gene representa o tamanho das regiões intergênicas.

Neste experimento, foi utilizada a linhagem complementada (*his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp*) e o anticorpo anti-GFP nos ensaios de imunoprecipitação. O micélio da linhagem foi obtido pelo crescimento por 24 h em meio VM líquido com 2% sacarose. Em seguida, o micélio foi transferido para o meio de cultura contendo os agentes Mena, Para, H_2O_2 e FOH por 60 min. O procedimento utilizado foi detalhadamente descrito em Materiais e Métodos. O *Input* foi utilizado como controle positivo e o *No Ab* como controle negativo.

A figura 16 mostra os resultados obtidos na análise de ChIP-qPCR. O fator de transcrição ORE-1 foi capaz de se ligar especificamente em todas as regiões de todos os genes analisados, com exceção de gstom-1. Foi possível verificar que o IP apresentou praticamente os mesmos níveis do *Input* em todas as situações testadas, evidenciando a afinidade de ORE-1 por estas regiões. Interessantemente, ORE-1 se ligou mais na região

promotora de *cat-1* quando comparada aos outros genes, assim podemos sugerir um papel regulatório maior de ORE-1 na regulação de *cat-1.* Estes resultados mostraram que ORE-1 reconhece e se liga *in vivo* em todas as regiões promotoras dos genes testados antes (gráficos controle) e após o tratamento com os agentes causadores de EROs.

A região promotora do gene *gstom-1* foi utilizada como controle negativo para os experimentos de ChIP-qPCR, assim como realizado nas análises de RT-qPCR. Embora esta região contém um *motif* para ligação de ORE-1, resultados das análises *in silico,* não foi observado a ligação *in vivo* da proteína (Figura 16K). Os gráficos da figura 17 representam a quantificação absoluta do IP normalizado com o controle negativo (*No Ab*). Curiosamente, ao analisar os valores de IP pode-se observar que o fator de transcrição ORE-1 se ligou muito menos na região promotora de sete (*cat-3, cat-2, gst-1, gst-2, sod, bax* e *metacaspases-1A*) dos dez genes analisados na presença de Mena. Na presença de FOH e H_2O_2, ORE-1 se ligou muito menos na região promotora do gene *cat-1*. Na ausência de estresse e na presença de Para o fator de transcrição se ligou menos na região promotora do gene *p53*-like.

4.9. Acúmulo de radicais livres na linhagem selvagem e mutante

Os mecanismos de ativação da morte celular por estresse oxidativo ainda não são amplamente entendidos e diversas proteínas de diferentes vias celulares parecem estar envolvidas neste processo. Higgins; Beart; Nagley, (2009), relataram a participação da nuclease EndoG em células mamíferas na morte celular programada de neurônios corticais em resposta a este tipo de estresse. Modificações no DNA causados por EROs tem sido frequentemente descritas em células de mamíferos, sendo sugerida como um importante mecanismo na carcinogênese e em diabetes (POULSEN, 2005).

A formação de EROs é um importante indício de estresse oxidativo. O aumento da sensibilidade da linhagem *Δore-1* ao FOH pode ser devido ao grande aumento do acúmulo de EROs, nessa condição de estresse. Para investigar esta hipótese foram realizados experimentos para avaliar a presença de radicais livres no interior das células das linhagens selvagem e mutante, após exposição a FOH e após a indução de estresse oxidativo utilizando Para, Mena e H_2O_2. O acúmulo de EROs foi verificado utilizando o reagente 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetato (H_2DCFDA), um indicador de radicais livres. Este reagente é permeável e não é fluorescente até que grupos acetatos sejam removidos da molécula H_2DCFDA; nesta condição, a molécula DCF torna-se verde fluorescente (LeBEL et al., 1992).

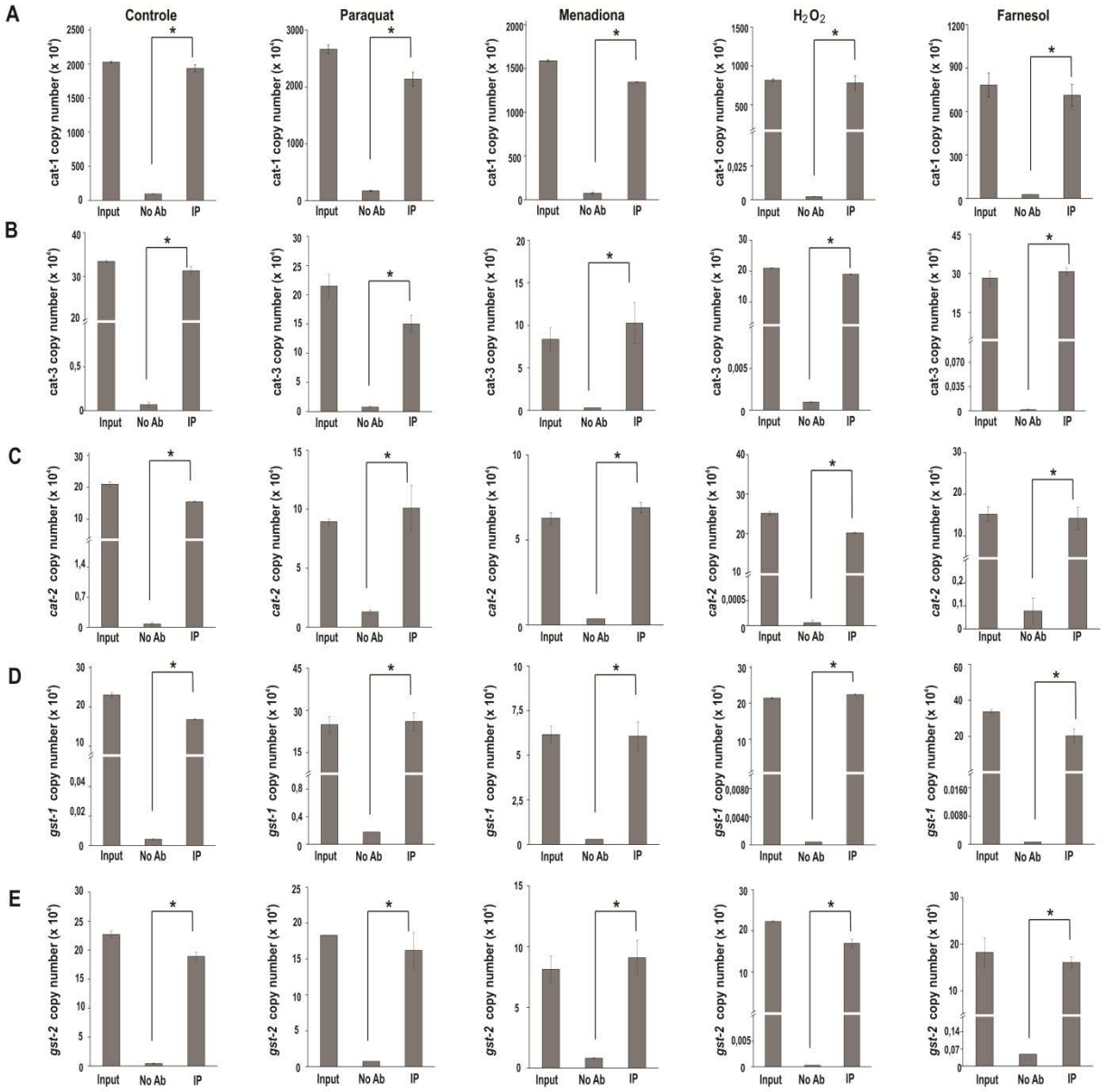

Figura 16- Ensaios de ChIP-qPCR. A análise por ChIP-qPCR mostra que ORE-1 pode se ligar *in vivo* aos promotores de genes relacionados com o estresse oxidativo atuando em todas as situações de indução de EROs. A linhagem *his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp* foi crescidas por 24 h a 30°C em VM com 2% sacarose e, em seguida, por 1 h nas condições de estresses com Para, Mena, H_2O_2 e FOH. Os micélios foram coletados, os DNAs genômicos foram extraídos, tratados com formaldeído, sonicados e os fragmentos de DNA imunoprecipitados com anticorpo anti-GFP. Os DNAs foram analisados por qPCR (quantificação absoluta) para confirmar os alvos de ORE-1 *in vivo*. Fragmentos de DNA foram analisados nas regiões promotoras dos genes **(A)** *cat-1,* **(B)** *cat-3,* **(C)** *cat-2,* **(D)** *gst-1,* **(E)** *gst-2,* **(F)** *sod,* **(G)** *nox-2,* **(H)** *bax,* **(I)** *metacaspases1-A,* **(J)** *p53,* e **(K)** *gstom-1*. O *Input DNA* foi usado como controle positivo e, como controle negativo, as reações de imunoprecipitação foram feitas sem anticorpo (*No Ab*). Resultados representam a média de triplicatas experimentais. Os resultados foram considerados significativos para (*,p<0.01).

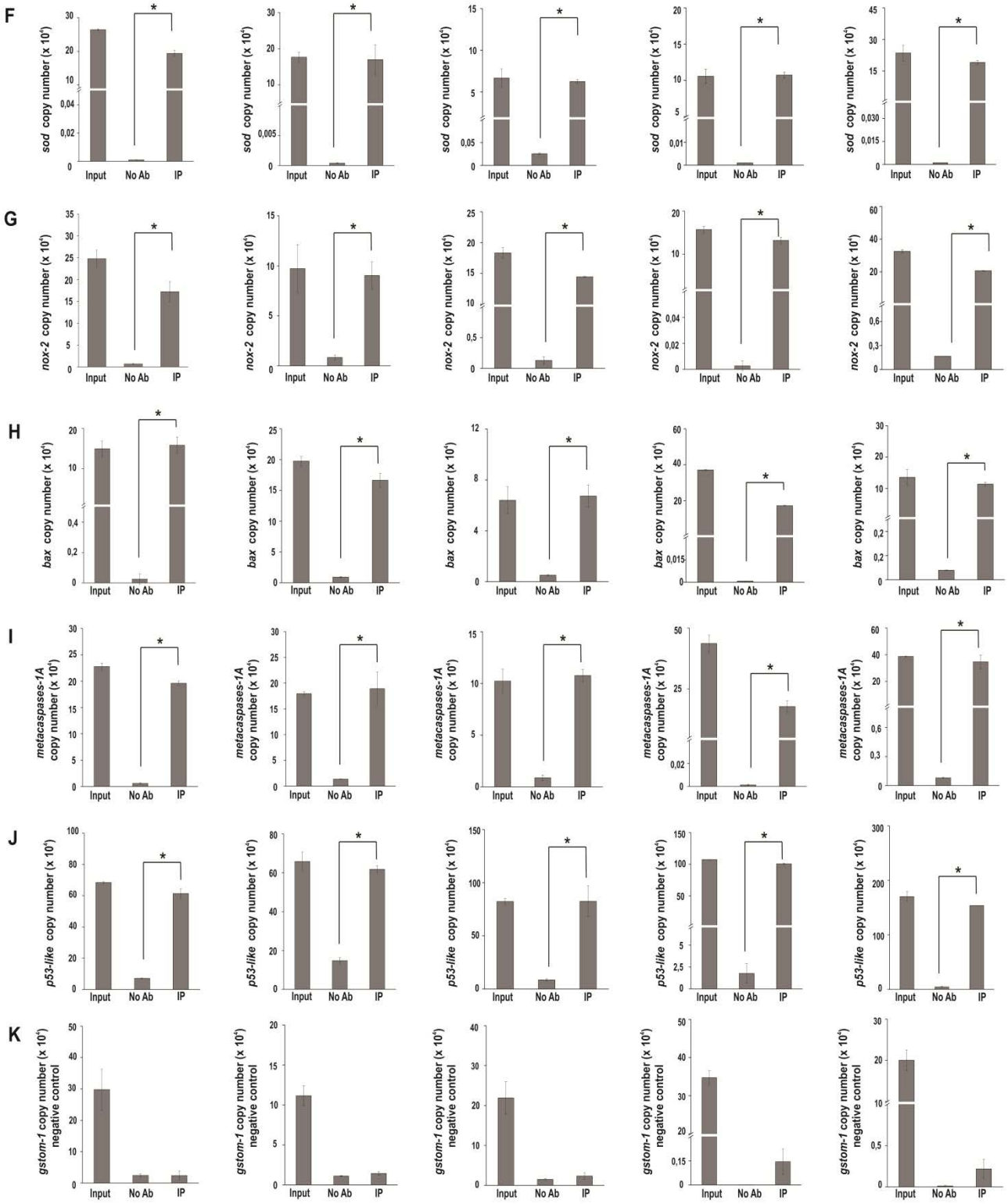

Figura 16- Continuação

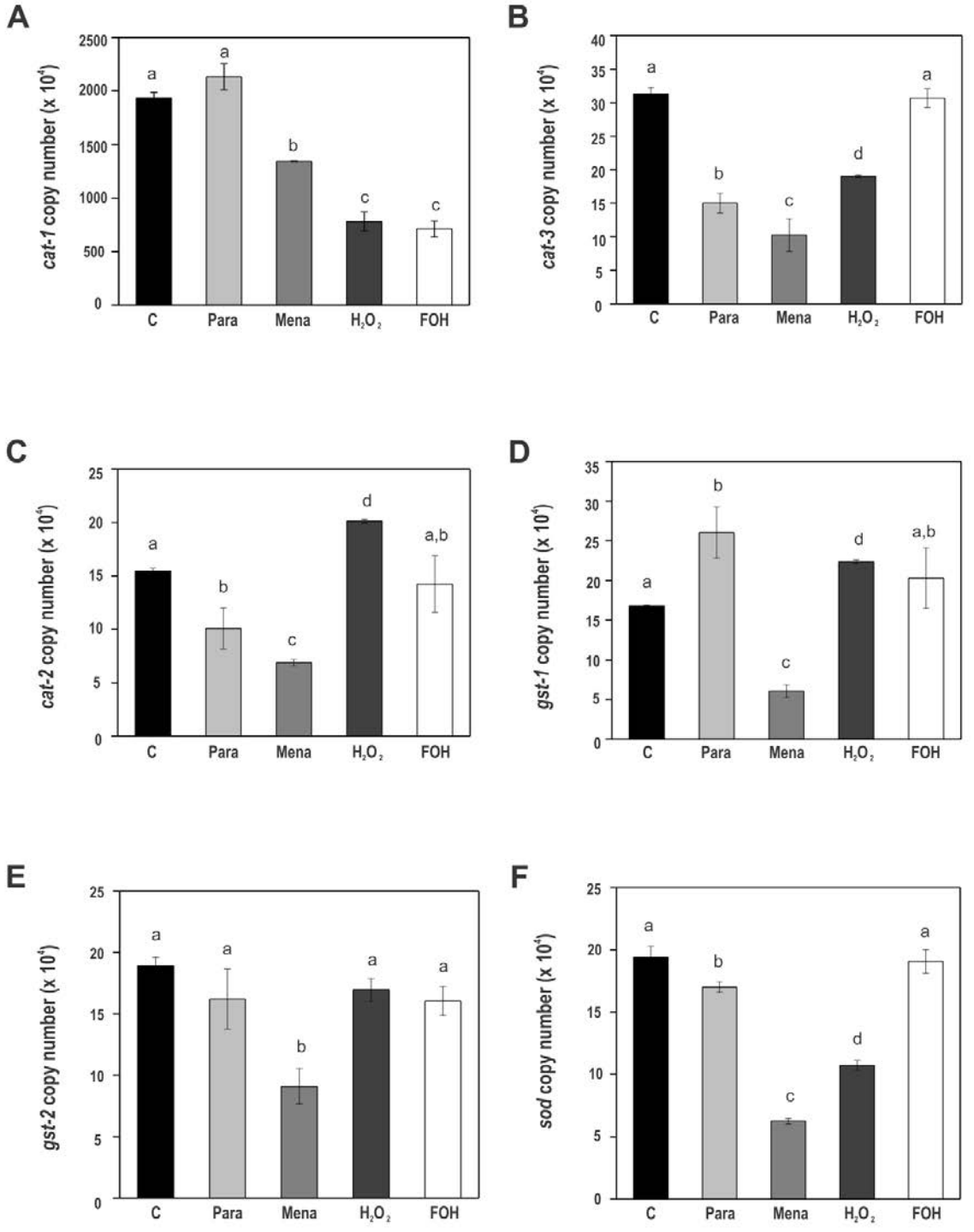

Figura 17- Ensaios de ChIP-qPCR. O TF ORE-1 se ligou diretamente *in vivo* aos genes **(A)** *cat-1,* **(B)** *cat-3,* **(C)** *cat-2,* **(D)** *gst-1,* **(E)** *gst-2,* **(F)** *sod,* **(G)** *nox-2,* **(H)** *bax,* **(I)** *metacaspases1-A,* **(J)** *p53,* e **(K)** *gstom-1* por meio de ensaios de ChIP-qPCR. Estes gráficos representam a quantificação absoluta do imunoprecipitado (IP) de cada gene normalizado em relação ao controle negativo (*No Ab*). Foi considerado um nível de significância 99%. Resultados significativos para (*,p<0.01). As letras diferentes (**a**, **b**, **c** e **d)** significam que as médias são diferentes entre si e as letras iguais (**a** e **a**, **b** e **b**) significam que as duas médias não diferem entre si.

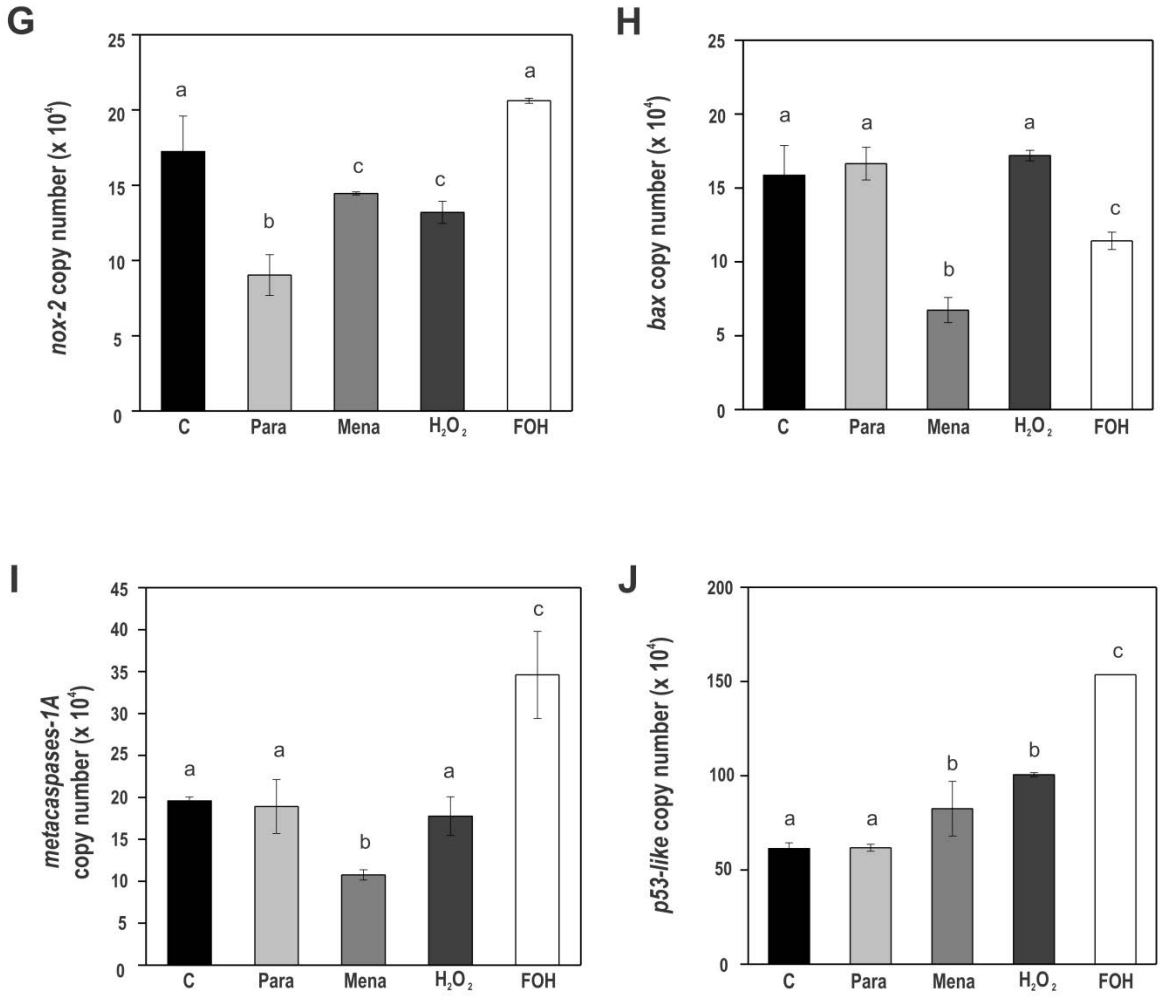

Figura 17- continuação.

Embora H_2DCFDA seja oxidado por diferentes EROs, este detecta principalmente ânion superóxido. Quanto maior for a quantidade de EROs nas hifas, maior será a intensidade da fluorescência emitida. Os resultados obtidos (Figura 18), mostraram acúmulo de EROs em ambas as linhagens após a exposição de diferentes agentes produtores de EROs (Mena, Para, H_2O_2 e FOH).

A linhagem mutante mostrou um padrão de fluorescência (intensidade e difusão) semelhante à linhagem selvagem na condição de estresse com Mena (Figura 18D), indicando que o tratamento com Mena não afetou o padrão de fluorescência na linhagem mutante. Para as condições de estresse oxidativo com Para, FOH e H_2O_2 a fluorescência se apresentou de forma diferente ao longo das hifas entre as linhagens. Na linhagem Δ*ore*-1 a marcação pelo H_2DFCDA foi mais intensa, na presença de H_2O_2 e Para, indicando um maior acúmulo de EROs em toda a extensão das hifas.

O fator de transcrição ORE-1 parece ser importante no monitoramento e reparo do estresse oxidativo causado por EROs o que explica a menor sobrevivência do mutante nulo nesta ORF ao FOH e Para (resultados mostrados anteriormente). Castro et al. (2011) mostraram um grande acúmulo de EROs durante a morte celular induzida por própolis em *S. cerevisiae* utilizando o reagente H_2DFCDA. Dinamarco et al. (2010) avaliaram a presença de EROs no interior das hifas de *A. nidulans* após exposição do fungo a FOH e detectaram um aumento no acúmulo de EROs na presença de FOH.

EROs são produzidos durante a Incompatibilidade Heterocária (HI) e estão sendo associados com *Woronin bodies* em *N. crassa* (HUTCHISON et al., 2009). O corpo de *Woronin* é uma organela fungo-específica que conecta os poros do septo, durante o estresse oxidativo, ou variações de pH (LEAL et al., 2008), protegendo a célula de vazamentos em caso de danos físicos. Em fungos filamentosos, o poro septal controla a troca entre os compartimentos de hifas vizinhas. A presença do corpo de *Woronin* está associada à presença dos septos. A conexão dos septos frente a variações no ambiente é um mecanismo muito utilizado em fungos filamentosos, principalmente em fungos patogênicos. Em hifas intactas, alguns corpos de *Woronin* foram encontrados em estreita proximidade com o septo, entretanto, a maioria foi encontrada distribuída no citoplasma. Em caso de danos, o corpo de *Woronin* é capaz de ligar os poros septais de *A. fumigatus* contribuindo para a resistência ao estresse e também para a virulência (BECK, ECHTENACHER, EBEL, 2013; BECK; EBEL, 2013).

As proteínas Hex são os maiores constituintes dos corpos de *Woronin* e são conservadas nos fungos filamentosos. A deleção do gene *hex-1* em *N. crassa* causa

redução no crescimento do fungo em meio mínimo e defeitos na esporulação (TENNEY et al., 2000).

Como descrito anteriormente, na linhagem Δ*ore*-1 a marcação pelo H_2DFCDA foi mais intensa nos tratamentos com Para e H_2O_2. Após o tratamento com estes agentes estressantes foi verificado que algumas hifas apresentaram um padrão de fluorescência compartimentalizado, com algumas regiões não mostrando fluorescência. Após a marcação com calcofluor foi verificado que a separação na fluorescência estava na região dos septos (Figura 19B e 19C), ou seja, os poros septais foram bloqueados, e a fluorescência foi encontrada dentro de um compartimento das hifas. Este bloqueio possivelmente ocorreu em consequência do posicionamento dos corpos de *Woronin* na região dos septos em condição de estresse oxidativo.

Para investigar o resultado observado nestas análises, ensaios de RT-qPCR foram realizados com o gene *hex-1* na presença de estresse oxidativo. Os resultados indicaram que ORE-1 regula o gene *hex-1* antes e após o tratamento com Para e H_2O_2 (Figura 20). A falta do fator de transcrição aumentou a expressão do gene *hex-1* na ausência e na presença de Para e H_2O_2, indicando que o fator de transcrição ORE-1 atua como repressor do gene nestas condições.

4.10. Localização celular de ORE-1

A fim de investigar a localização celular de ORE-1 em *N. crassa* em condições fisiológicas e também durante o estresse celular, foi construída uma linhagem (*his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp*) em que ORE-1 foi fusionada (na porção C-terminal) com a proteína fluorescente verde GFP. A linhagem construída apresentou fenótipo idêntico ao da linhagem selvagem (Figura 12). Neste experimento, as células de *N. crassa* foram coradas com DAPI, para os ensaios de co-localização nuclear e com MitoTracker red 633 para os ensaios de co-localização mitocondrial. O corante DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride) apresenta especificidade para o DNA, evidenciando os núcleos que se coram de azul brilhante. Os núcleos interfásicos apresentam uma cromatina característica, localizada em torno de um único nucléolo representado por um ponto escuro. Durante a mitose, estas regiões não podem ser distinguidas, já que a cromatina se condensa e o nucléolo desaparece. Portanto, o núcleo passa a ser visualizado como um ponto azul durante a mitose.

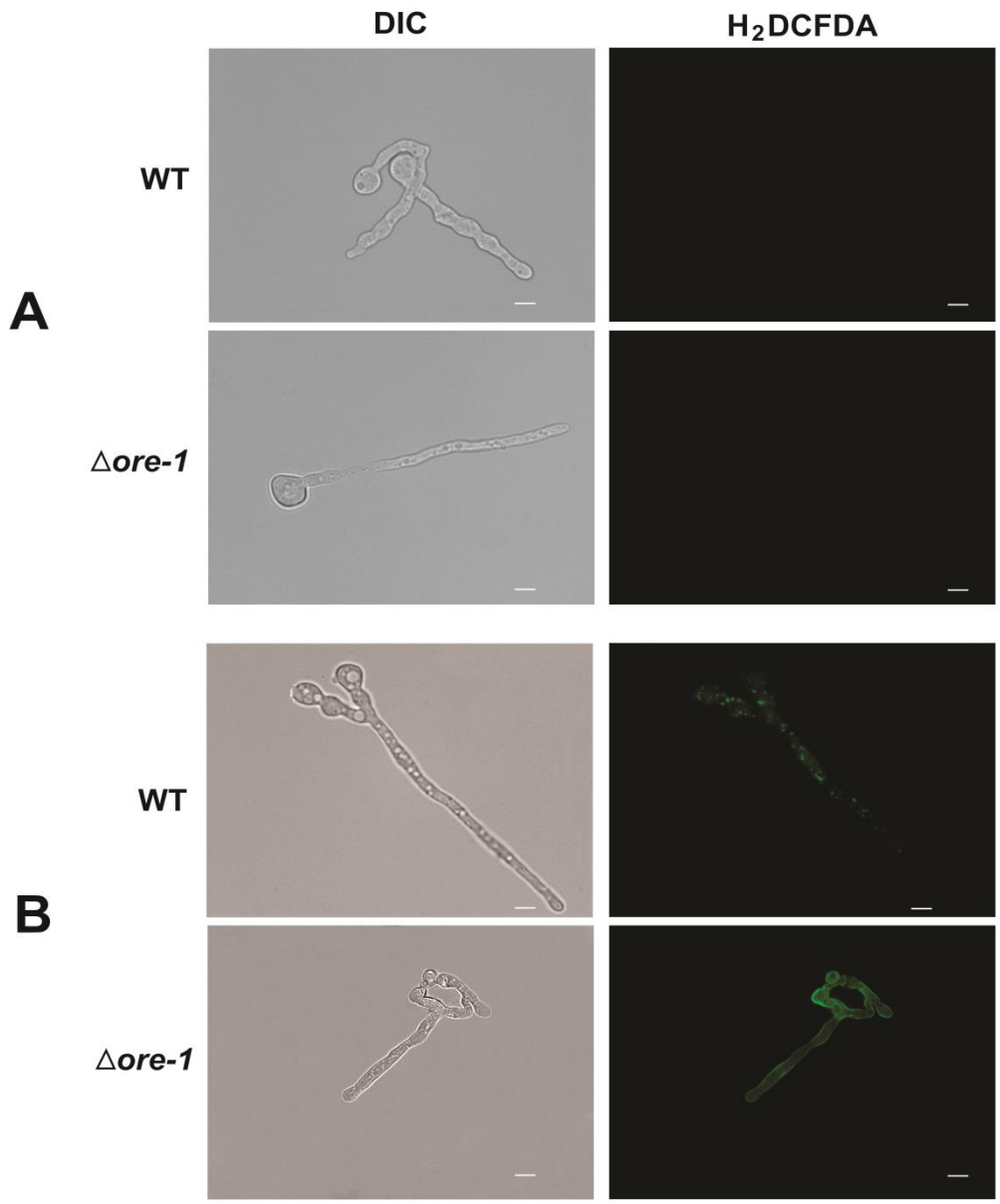

Figura 18. Acúmulo de EROs no interior das hifas na presença de H_2O_2, Para, Mena e FOH. Conídios foram inoculados em VM com 2% de sacarose e incubados a 30ºC por 5 h. O meio de cultura foi esgotado e adicionado os meios contendo os agentes estressantes, as placas foram incubadas a 30ºC por 60 min. Em seguida, as células foram coradas com reagente de 2',7'-diacetato dichlorodihydrofluorescein (H_2DCFDA) 10 µg/mL por 30 min, lavadas 3 vezes com PBS 1x e fixadas em lamínas para visualização em microscópio de fluorescência. **(A)** Controle **(B)** H_2O_2 **(C)** Para **(D)** Mena **(E)** FOH. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com aumento de 100x. As imagens foram capturadas com Axio Cam MRm câmera e processadas usando o software AxioVision. Processamentos adicionais nas imagens foram realizadas com auxílio do programa Adobe PhotoShop CS2 (Adobe Systems Incorporated, CA). Escala, 5 µM.

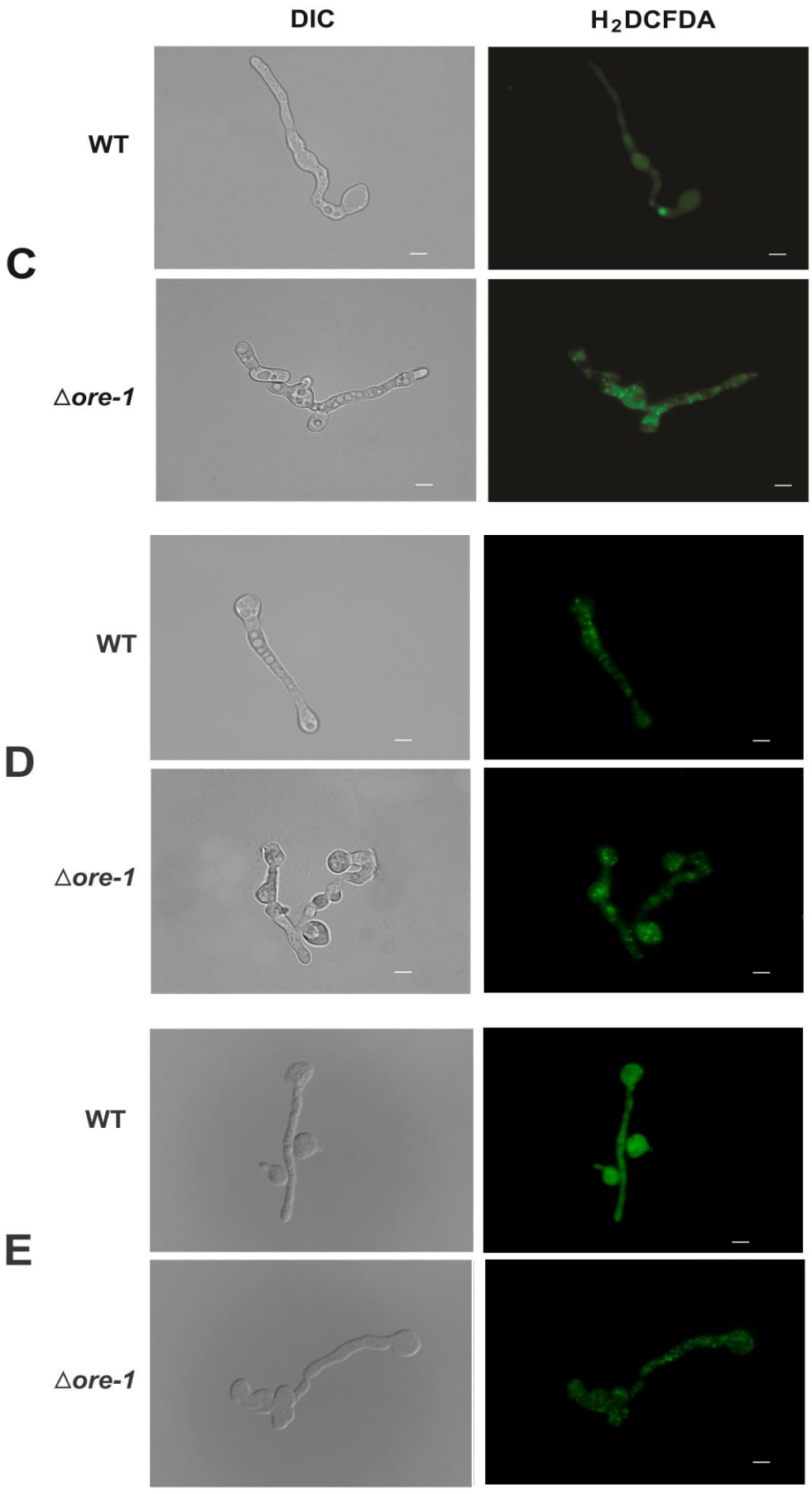

Figura 18. Continuação

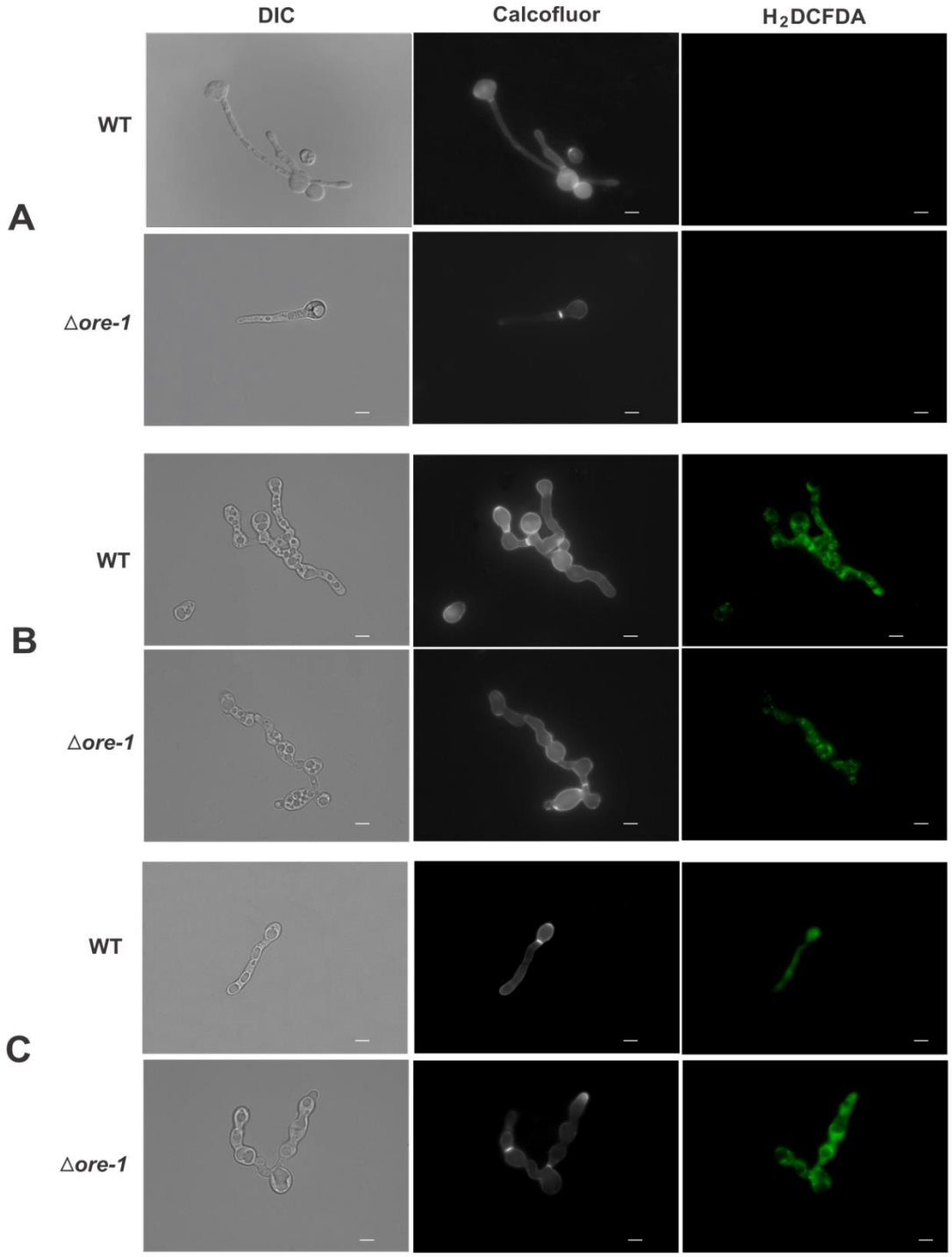

Figura 19. Acúmulo de EROs no interior das hifas na presença de H_2O_2 e Para. Conídios foram inoculados em VM 2% de sacarose e incubados a 30ºC por 5h. O meio de cultura foi esgotado e adicionado os meios estressantes, as placas foram incubadas a 30ºC por 60 min., em seguida as células foram coradas com o reagente 2',7'-diacetato dichlorodihydrofluorescein (H_2DCFDA) por 30 min., coradas com calcofluor por 10 min., lavadas 3 vezes com PBS 1x e fixadas em lamínas para visulaização em microscópio de fluorescência. **(A)** Controle **(B)** H_2O_2 **(C)** Para. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com aumento de 100x. As imagens foram capturadas com Axio Cam MRm câmera e processada usando o software AxioVision. Processamentos adicionais foram realizadas com auxílio do programa Adobe PhotoShop CS2 (Adobe Systems Incorporated, CA). Escala, 5 µM.

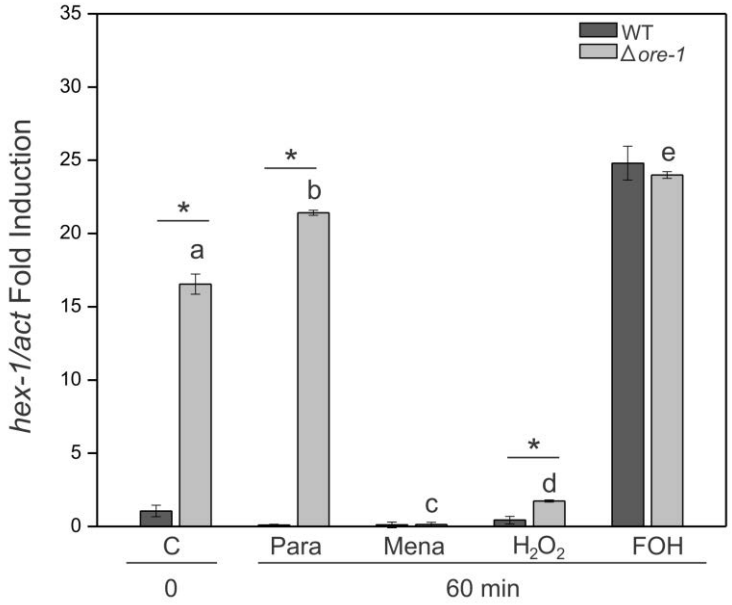

Figura 20– Perfil de expressão do gene hex-1 por RT-qPCR. Foram analisados antes Controle (C) e após indução de EROs utilizando Para (10 µM), Mena (50 µM), H_2O_2 (5 mM) e FOH (10 µM) por 60 min. Conídios foram inoculados em VM 2% de sacarose líquido e incubados a 30ºC/ 200 rpm por 24h. O micélio foi coletado e adicionado em outro frasco contendo VM 0,5% de sacarose e as fontes estressantes, por mais 60 min. Os micélios foram coletados e armazenados a -80ºC. Foi realizado extração de RNA total e obtenção de cDNA para os experimentos de RT-qPCR. Os ensaios de RT-qPCR foram realizados utilizando o gene actina (*act*) como gene referência. Os dados foram anallisados utilizando StepOnePlus™Real-Time PCR System, Software v2.3. Os dados mostram médias representativas de resultados obtidos a partir de três réplicas biológicas. Os experimentos foram considerados significativos para (*,$p<0.01$). As letras **a**, **b**, **c** e **d**: significam que as médias são diferentes entre si;

Não foi possível visualizar ORE-1 no núcleo em nenhuma condição analisada (Figura 21). Possivelmente, porque a fluorêncencia não se acumulou no núcleo em intensidade suficiente para ser detectada por microscopia.

Para comprovar o resultado observado nas análises de localização subcelular com DAPI, procedeu-se a coloração com MitoTracker (Figura 22), com o intuito de verificar se a proteína está localizada na mitocôndria nas condições analisadas, uma vez que a proteína possui um provável sinal de localização mitocondrial e assim pode ser direcionada para a mitocôndria (dados não mostrados).

O MitoTracker é um reagente fluorescente que se acumula no ambiente lipídico da mitocôndria e reage com grupos tióis livres de peptídeos, tornando-se fluorescente. Além de produzir a maior parte da energia celular em eucariotos, as mitocôndrias também estão envolvidas com PCD (morte celular programada) por meio da geração de EROs e liberação das proteínas mitocondriais.

Como esperado, a proteína ORE-1 está presente na mitocôndria, um resultado confirmado pela co-localização com marcação por MitoTracker (Figura 22). VIDEIRA et al., (2009), mostrou o perfil de mRNA de genes envolvidos em função mitocondrial, este ensaio revelou várias ORFs de *N. crassa* que poderiam estar relacionadas com a mitocôndria, entre eles estava a ORF NCU01629, objeto de estudo neste trabalho.

A proteína ORE-1 mostrou estar localizada na mitocôndria independente da exposição aos agentes estressantes (Para, Mena, FOH e H_2O_2). Surpreendentemente, não foi observada a translocação de ORE-1 para o núcleo, pois mesmo após a indução da morte celular por FOH a proteína permaneceu na mitocôndria.

Após o tratamento com Para, Mena, FOH e H_2O_2, as redes mitocondriais sofreram uma condensação, e ficaram em grumos (Figura 22), semelhante ao descrito por Savoldi e colaboradores em 2008 para *A. nidulans*. Um dos passos da apoptose é a fragmentação da mitocôndria, verificada por intensa distribuição de pontos fluorescentes no citoplasma da célula (YOULE; KARBOWSKI, 2005). Na ausência de agentes produtores de EROs verificou-se uma rede mitocondrial intacta (Figura 22).

A translocação de fatores de transcrição da mitocôndria para o núcleo foi descrita em vários organismos durante a morte celular programada. A proteína EndoG de *A. nidulans* é um exemplo, em condições de indução da morte celular a EndoG é translocada para o núcleo (FIGUEREIDO et al., 2011). Em *Saccharomyces pombe,* a atividade extramitocondrial de EndoG (Pnu1p) causa efeitos citotóxicos e a maneira como a proteína é liberada da mitocôndria está relacionada com a função exercida pela nuclease, porém não há comprovação da sua translocação para o núcleo (ODA et al., 2007). Em *A. nidulans*, Savoldi et al., (2008) observaram intensos pontos fluorescentes distribuídos nos germinantes, após tratamento com 100 µM de FOH, indicativo de fragmentação mitocondrial. Resultados semelhantes foram obtidos neste trabalho para o fator de transcrição ORE-1.

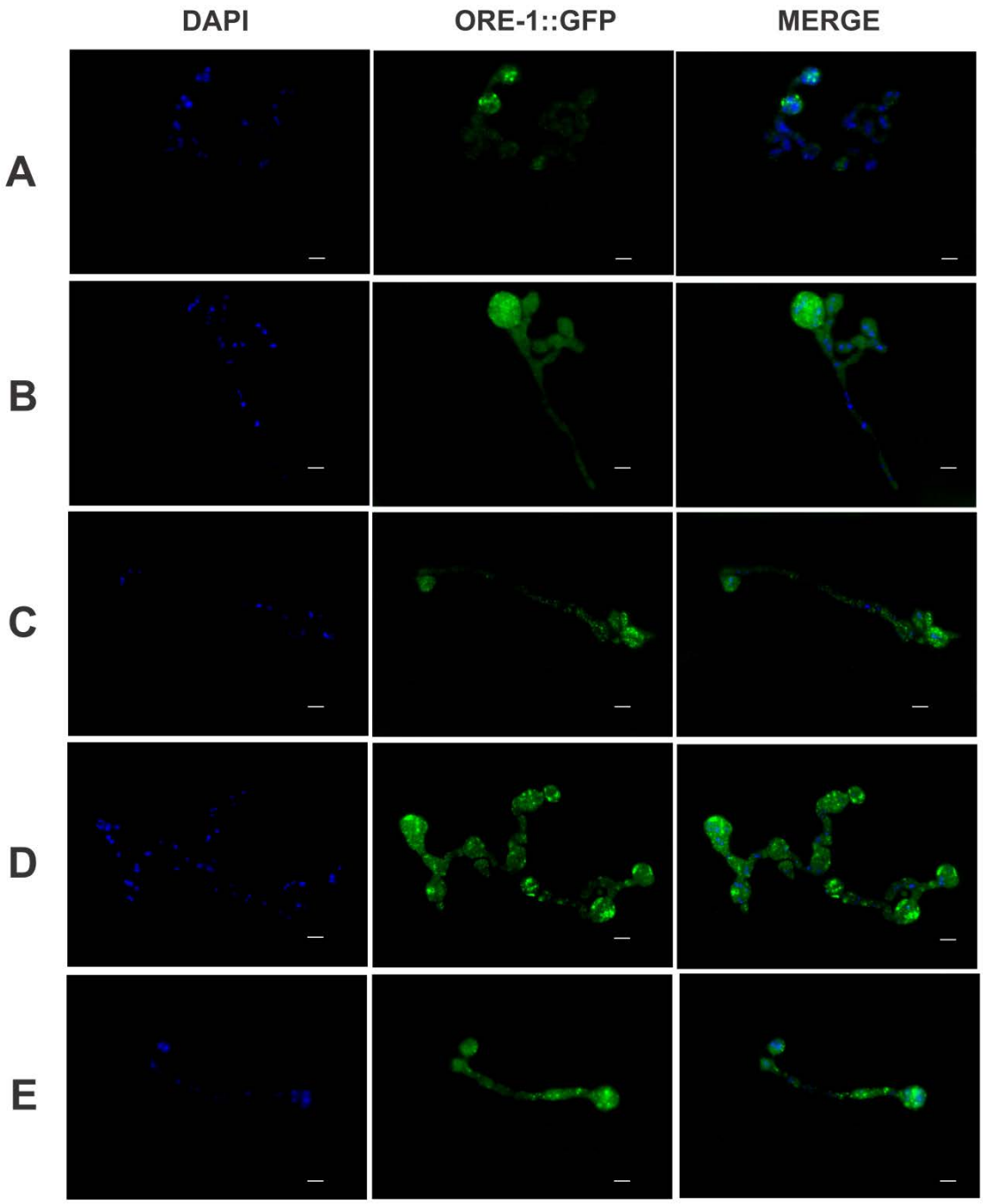

Figura 21- Localização subcelular da proteína ORE-1. Conídios foram inoculados em VM 2% com sacarose e incubados a 30ºC por 5 h. O meio de cultura foi esgotado e os meios com agentes estressantes (Para, Mena, H_2O_2 e FOH) foram adicionados. As placas foram incubados a 30ºC por 60 min, em seguida as células foram coradas com DAPI por 10 min. As células foram lavadas com PBS 1x por 3 vezes. **(A)** Controle **(B)** 5 mM de H_2O_2 **(C)** 10 µM de Para **(D)** 50 µM de Mena **(E)** 10 µM de FOH. A linhagem complementada (ORE-1::GFP) se refere à construção *his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp.* As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com aumento de 100x. As imagens foram capturadas com a câmera AxioCamMRm e processada usando o software AxioVision. Processamentos adicionais nas imagens foram realizadas com auxílio do programa Adobe PhotoShop CS2 (Adobe Systems Incorporated, CA). Escala, 5 µM.

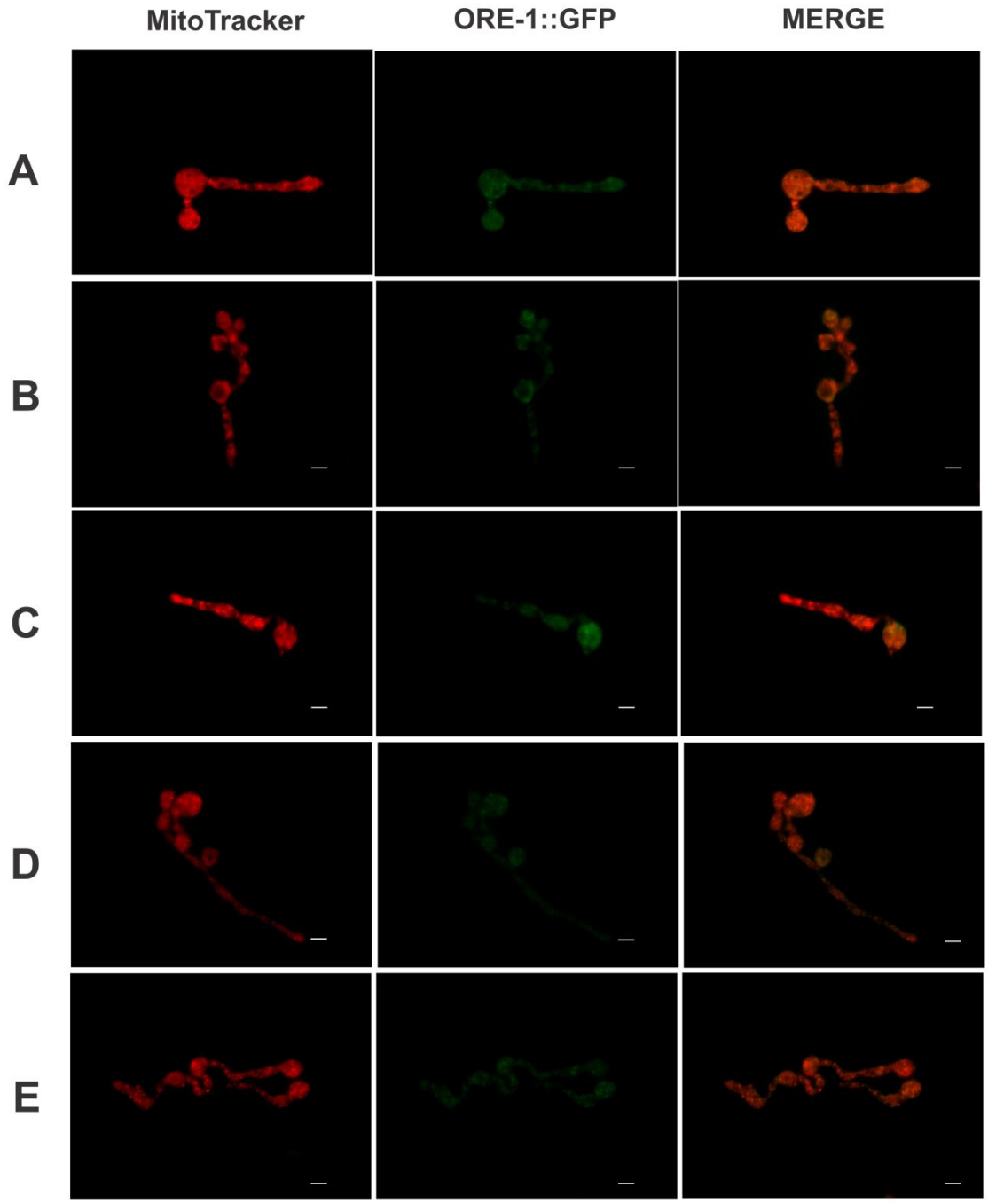

Figura 22- Localização mitocondrial da proteína ORE-1. Conídios foram inoculados em VM 2% com sacarose e incubados a 30ºC por 5 h. O meio de cultura foi esgotado e adicionado os meios estressantes (Para, Mena, H_2O_2 e FOH), as placas foram incubados a 30ºC por 60 min. Em seguida, as células foram coradas com MitoTracker 1mM por 10 min. As células foram lavadas com PBS 1x por 3 vezes. **(A)** Controle **(B)** 5 mM de H_2O_2 **(C)** 10 µM de Para **(D)** 50 µM de Mena **(E)** 10 µM de FOH. A linhagem complementada se refere à construção *his-3::Pccg-1-ore-1-sfgfp.* As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com aumento de 100x. As imagens foram capturadas com a câmera AxioCamMRm e processada usando o software AxioVision. Processamentos adicionais nas imagens foram realizadas com auxílio do programa Adobe PhotoShop CS2 (Adobe Systems Incorporated, CA). Escala, 5 µM.

Estas observações indicam que uma complexa rede de processos celulares controla a resposta ao estresse oxidativo induzido por drogas como Para, Mena, FOH e H_2O_2. Considerando estes resultados sugere-se que ORE-1 deve desempenhar um papel extremamente importante na mitocôndria em *N. crassa.*

Fatores de transcrição do tipo *zinc finger* são reguladores fúngicos importantes em diversas funções celulares, tais como o metabolismo do açúcar e aminoácidos, o crescimento filamentoso, remodelagem da cromatina, resposta a fonte de carbono, biossíntese do ergosterol, resposta a diversas fontes de estresse celular e multirresistência (MacPHERSON et al., 2006). Neste estudo, caracterizou-se funcionalmente um "novo" fator de transcrição codificado pela ORF NCU01629 e denominado ORE-1. Os resultados obtidos indicam que ORE-1 é um importante regulador do estresse oxidativo em *N. crassa*; o fator de transcrição controla a expressão de vários genes relacionados com o controle de EROs e morte celular e está localizado na mitocôndria.

Considerando a longa história do fungo *N. crassa* como um organismo modelo clássico para a biologia celular e genética (COLOT et al., 2006; DUNLAP et al., 2007), aliada ao fato de que os mediadores de morte celular em *N. crassa*, ambos os reguladores e executores, são ainda desconhecidos, este fungo filamentoso tem um grande potencial para a modelagem de morte celular programada e para a investigação de novas estratégias de tratamento em contextos relevantes.

Conclusões

Neste trabalho o fator de transcrição, produto da ORF NCU01629, foi caracterizado. O estudo foi realizado considerando as informações disponibilizadas por um grupo colaborador, que identificou o domínio de ligação preferencial do fator de transcrição, bem como os prováveis genes alvos de regulação. A seguir, estão relacionadas as principais conclusões deste trabalho:

- Através da categorização por FunCat dos prováveis genes alvos, o fator de transcrição mostrou estar envolvido na regulação de diversos processos celulares, incluindo resposta a estresse oxidativo e morte celular.

- O envolvimento na regulação da resposta ao estresse oxidativo e morte celular foi confirmado através de experimentos de crescimento em placa contendo agentes indutores de ambos processos (Para, Mena H_2O_2 e FOH) e também de análises da expressão de genes codificadores de enzimas que participam da resposta ao estresse induzido pelos agentes.

- O envolvimento na regulação da resposta a estresse oxidativo e morte celular também foi confirmado através de experimentos de imunoprecipitação de cromatina seguido de quantificação absoluta dos genes (ChIP-qPCR). Todos os genes foram ligados *in vivo* pelo fator de transcrição nas condições analisadas.

- Análises de localização celular da proteína na presença de agentes indutores de EROs revelaram que a proteína está localizada na mitocôndria nestas condições.

- Análises microscópicas e de expressão mostraram que o fator de transcrição pode também estar envolvido na estrutura dos septos no fungo *N. crassa,* portanto na comunicação entre diferentes compartimentos das hifas. Em fungos filamentosos, uma estrutura denominada *Woronin body,* formada por um complexo de proteínas, conecta os poros na região dos septos. O gene que codifica a principal proteína deste complexo mostrou ser regulado pelo fator de transcrição e a linhagem mutante mostrou um padrão de fluorescência diferente da selvagem.

- Considerando os resultados obtidos neste trabalho, o gene sob investigação foi denominado de *ore-1* (*oxidative stress regulator-1*).

Referências

BABIOR, B. M. Phagocytes and oxidative stress. **Am. J. Med.**, v. 109, n. 1, p. 33-44, 2000.

BABIOR, B. M. Superoxide: a two-edged sword. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 30, n. 2, p. 141-155, 1997.

BANNO, S.; NOGUCHI, R.; YAMASHITA, K.; FUKUMORI, F.; KIMURA, M.; YAMAGUCHI, I.; FUJIMURA, M. Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. **Curr. Gen.**, v. 51, p. 197-208, 2007.

BASNET, P.; MATSUNO, T.; NEIDLEIN, R. Z. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis **Z. Naturforsch. C**: Bioscience, v. 52, n. 11/12, p. 828-833, 1997.

BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. Genetic control of biochemical reactions in Neurospora. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 27, n. 11, p. 499-506, Nov. 1941.

BECK, J.; EBEL, F. Characterization of the major Woronin body protein HexA of the human pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. **Int. J. Med. Microbiol.**, n. 303, p. 90-97, 2013.

BECK, J.; ECHTENACHER, B.; EBEL, F. Woronin bodies, their impact on stress resistance and virulence of the pathogenic mould *Aspergillus fumigatus* and their anchoring at the septal pore of filamentous Ascomycota. **Mol. Microbiol.**, v. 89, n. 5, p. 857-871, 2013.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sci.**, Elmsford, v. 65, n. 18/19, p. 1865-1874, Oct. 1999.

BORKOVICH, K. A.; ALEX, L. A.; YARDEN, O.; FREITAG, M.; TURNER, G. E.; READ, N. D.; SEILER, S.; BELL-PEDERSEN, D.; PAIETTA, J.; PLESOFSKY, N.; PLAMANN, M.; GOODRICH-TANRIKULU, M.; SCHULTE, U.; MANNHAUPT, G.; NARGANG, F. E.; RADFORD, A.; SELITRENNIKOFF, C.; GALAGAN, J. E.; DUNLAP, J. C.; LOROS, J. J.; CATCHESIDE, D.; INOUE, H.; ARAMAYO, R.; POLYMENIS, M.; SELKER, E. U.; SACHS, M. S.; MARZLUF, G. A; PAULSEN, I.; DAVIS, R.; EBBOLE, D. J.; ZELTER, A.; KALKMAN, E. R.; O'ROURKE, R.; BOWRING, F.; YEADON, J.; ISHII, C.; SUZUKI, K.; SAKAI, W.; PRATT, R. Lessons from the genome sequence of *Neurospora crassa*: tracing the path from genomic blueprint to multicellular organism. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n. 1, p. 1-108, Mar. 2004.

CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT J. L.; SAUVAIGO, S. Hydroxil radicals and DNA base damage. **Mutat. Res.**, v. 424, n. 1/2, p. 9-21, 1999.

CANDIDO, T. de S.; GOLÇALVES, R. D.; FELÍCIO, A. P.; FREITAS, F. Z.; CUPERTINO, F. B.; CARVALHO, A. C. G. V.; BERTOLINI, M. C. A protein kinase screen of *Neurospora crassa* mutant strains reveals that the SNF1 protein kinase promotes glycogen synthase phosphorylation. **Biochem. J.**, v. 464, n. 3, p. 323-334, 2014.

CASTRO, P. A. de; SAVOLDI, M.; BONATTO, D.; BARROS, M. H.; GOLDMAN, M. H. S.; BERRETTA, A. A.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryot. Cell**, v. 10, n. 3, p. 398-411, 2011.

CHEN, S. R.; DUNIGAN, D. D.; DICKMAN, M. B. BCL-2 family members inhibit oxidative stress-induced programmed cell dealth in *Saccharomyces cerevisiae*. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 34, n. 10, p. 1315-1325, 2003.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.

COLOT, H. V.; PARK, G.; TURNER, G. E.; RINGELBERG, C.; CREW, C. M.; LITVINKOVA, L.; WEIS, R. L.; BORKOVICH, K. A.; DUNLAP, J. C. A high throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A**., v. 103, p. 10352-10357, 2006.

DAVIS, R. H. **Neurospora**: contributions of a model organism. New York: Oxford University Press, 2000. 333 p.

DINAMARCO, T. M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Farnesol-induced cell death in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. **Biochem. Soci. Transact.**, v. 39, p. 1544-1548, 2011.

DINAMARCO, T. M.; PIMENTEL, B. C. F.; SOVALDI, M.; MALAVAZI, I.; SORIANI, F. M.; UYEMURA, S. A.; LUDOVICO, P.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. The roles played by *Aspergillus nidulansapoptosis*-inducing factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase (AifA) and NADH-ubiquinone oxidoreductases (NdeA-B and NdiA) in farnesol resistance. **Fung. Genet. Biol.**, v. 47, p. 1055-1069, 2010.

DINAMARCO, T. M.; ALMEIDA, R. S.; CASTRO, P. A. de; BROWN N. A.; REIS, T. F.; RAMALHO, L. N. Z.; SAVOLDI, M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. Molecular characterization of the putative transcription factor SebA involved in virulence in *Aspergillus fumigatus*. **Eucaryot. Cell.**, v. 11, n. 4. p. 518-531, 2012.

DIZDAROGLU, M. Chemical determination of free radical-induced damage do DNA. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 10, n. 3/4, p. 225-242, 1991.

DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free Radic. Res.**, v. 46, p. 382-419, 2012.

DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of oxygen free radical in cancer development. **Eur. J. Cancer**, v. 32, n. 1, p. 30-38, Jan. 1996.

DUNLAP, J. C.; BORKOVICH, K. A.; HENN, M. R.; TURNER, G. E.; SACHS, M. S.; GLASS, N. L.; McCLUSKEY, K.; PLAMANN, M.; GALAGAN, J. E.; BIRREN, B. W.; WEISS, R. L.; TOWNSEND, J. P.; LOROS, J. J.; NELSON, M. A.; LAMBREGHTS, R.; COLOT, H. V.; PARK, G.; COLLOPY, P.; RINGELBERG, C.; CREW, C.; LITVINKOVA, L.; DECAPRIO, D.; HOOD, H. M.; CURILLA, S.; SHI, M.; CEAWFORD, M.; KOERHSEN, M.; MONTGOMERY, P.; LARSON, L.; PEARSON, M.; KASUGA, T.; TIAN, C.; BASTÜRKMEN, M.; ALTAMIANO, L.; XU, J. Enabling a community to dissect an organism: overview of the Neurospora functional genomics project. **Adv. Genet.**, v. 57, n. 1, p. 49-96, 2007.

EBBOLE, D.; SACHS, M. S. A rapid and simple method of isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. **Fungal Genet. Newslett.**, v. 37, p. 17-18, 1990.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol. Pathol.**, v. 35, p. 45-516, 2007.

ESSER, K.; KUENEN, R. **Genetics of fungi**. Heidelberg: Springer, 1967. 490 p.

FAIRIN, G. D.; MacDONALD, K.; McMASTER, C. R. A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 4868-4874, 2007.

FERRIGNO, P.; POSAS, F.; KOEPP, D.; SAITO, H.; SILVER, P. A. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin homologs NMD5 and XPO1. **EMBO J.**, v. 17, p. 5606-5614, 1998.

FIGUEIREDO, B. C. P.; CASTRO, P. A. de; DINAMARCO, T. M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOLDMAN, G. H. The *Aspergillus nidulans nucA*^{EndoG} homologue is not involved in cell death. **Eucaryot. Cell**, v. 10, p. 276-283, 2011.

FREEMAN, B. A.; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. **Lab. Inves.**, v. 47, n. 5, p. 421-428, Nov. 1982.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. **J. Biol. Chem.**, v. 264, n. 14, p. 7761-7764, May 1989.

GABBITA, S. P.; ROBINSON, K. A.; STEWART, C. A.; FLOYD, R. A.; HENSLEY, K . Redox regulatory mechanisms of cellular signal transduction. Free radical biology and aging program. **Arch. Biochem. Biophys**., v. 1, n. 376, p. 1-13, 2000.

GALAGAN, J. E.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U.; READ, N. D.; JAFFE, D.; FITZHUGH, W.; MA, L. J.; SMIRNOV, S.; PURCELL, S.; REHMAN, B.; ELKINS, T.; ENGELS, R.; WANG, S.; NIELSEN, C. B.; BUTLER, J.; ENDRIZZI, M.; QUI, D.; IANAKIEV, P.; BELL-PEDERSEN, D.; NELSON, M. A.; WERNER-WASHBURNE, M.; SELITRENNIKOFF, C. P.; KINSEY, J. A.; BRAUN, E. L.; ZELTER, A.; SCHULTE, U.; KOTHE, G. O.; JEDD, G.; MEWES, W.; STABEN, C.; MARCOTTE, E.; GREENBERG, D.; ROY, A.; FOLEY, K.; NAYLOR, J.; STANGE-THOMANN, N.; BARRETT, R.; GNERRE, S.; KAMAL, M.; KAMVYSSELIS, M.; MAUCELI, E.; BIELKE, C.; RUDD, S.; FRISHMAN, D.; KRYSTOFOVA, S.; RASMUSSEN, C.; METZENBERG, R. L.; PERKINS, D. D.; KROKEN, S.; COGONI, C.; MACINO, G.; CATCHESIDE, D.; LI, W.; PRATT, R. J.; OSMANI, S. A.; DeSOUZA, C. P.; GLASS, L.; ORBACH, M. J.; BERGLUND, J. A.; VOELKER, R.; YARDEN, O.; PLAMANN, M.; SEILER, S.; DUNLAP, J.; RADFORD, A.; ARAMAYO, R.; NATVIG, D. O.; ALEX, L. A.; MANNHAUPT, G.; EBBOLE, D. J.; FREITAG, M.; PAULSEN, I.; SACHS, M. S.; LANDER, E. S.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa.* **Nature**, v. 422, n. 6934, p. 859-868, Apr. 2003.

GLASS, N. L.; DEMENTHON, K. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 9, p. 553-558, 2006.

GOLDMAN, G. H.; McGUIRE, S. L.; HARRIS, S. D. The DNA damage response in filamentous fungi. **Fungal Gent. Biol.**, v. 35, p. 183-195, 2002.

GONÇALVES, A. P.; HALL, C.; KOWBEL, D. J.; GLASS, N. L.; VIDEIRA, A. CZT-1 is a novel transcription factor controlling cell death and natural drug resistence in *Neurospora crassa.* **Gen. Genom. Genet. G3**, v. 4, p. 1091-1102, 2014.

GONÇALVES, R. D.; CUPERTINO, F. B.; FREITAS, F. Z.; LUCHESSI, A. D.; BERTOLINI, M. C. A genome-wide screen for *Neurospora crassa* transcription factors regulating glycogen metabolism. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 10, n. 11, July 2011. doi:101074/mcpM11/007963.

GOTTLIEB, R. A. Role of mitochondria in apoptosis. **Crit. Rev. Eukaryot. Gen. Expr.**, v. 10, n. 3/4, p. 231-239, 2000.

GULSHAN, K.; ROVINSKY, S. A.; COLEMAN, S. T.; MOYE-ROWLEY, W. S. Oxidant-specific folding of Yap1p regulates both transcriptional activation and nuclear localization. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 40524-40533, 2005.

GYÖENGYOESI, N.; KALDI, K. Interconnections of reactive oxygen species homeostasis and circadian rhythm in *Neurospora crassa.* **Antioxid. Redox Signal.**, v. 20, n. 18, p. 3007-3023, 2014.

HADDAD, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox (y)-sensitive transcription factors. **Cell Signal.**, New York, v. 14, n. 11, p. 879-897, Nov. 2002.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **FEBS Lett.**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymol.**, New York, v. 186, pt. b, p. 1-85, 1990.

HANCOCK, J. T.; DESIKAN, R.; NEILL, S. J. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. **Biochem. Soc. Trans.**, London, v. 29, pt. 2, p. 345-350, May 2001.

HIGGINS, G. C.; BEART, P. M.; NAGLEY, P. Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 16, p. 2773-2787, 2009.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxil radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2489-2491, 1987.

HUTCHISON, E.; BROWN, S.; TIAN, C.; GLASS, L. Transcriptional profiling and functional analysis of heterokaryon incompatibility in *Neurospora crassa* reveals that reactive oxygen species, but not metacaspases, are associated with programmed cell death. **Microbiology**, v. 155, p. 3957-3970, 2009.

ISRAELS, L. G.; ISRAELS, E. D. Apoptosis. **Stem Cells**, v. 17, n. 5, p. 306-313, 1999.

KILEY, P. J.; STORZ, G. Exploiting thiol modifications. **PLoS Biol.**, v. 2, n. 11, 2004. doi:10.1371/journal.pbio.0020400.

LEAL, J.; SQUINA, F. M.; FREITAS, J. S.; SILVA, E. M.; ONO, C. J.; MARTINEZ-ROSSI, N. M.; ROSSI, A. A splice variant of the *Neurospora crassa* hex-1 transcript, which encodes the major protein of the Woronin body, is modulated by extracellular phosphate and pH changes. **FEBS Lett.**, v. 583, p. 180-184, 2009.

LEBEL, C. P.; ISCHIROPOULOS, H.; BONDY, S. C. Evaluation of the probe 29,79-dichlorofluorescin as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 5, p. 227-231, 1992.

LEVINE, M.; TJIAN, R. Transcription regulation and animal diversity. **Nature**, v. 424, n. 6945, p. 147-151, July 2003.

LI, T.; KON, N.; JIANG, L.; TAN, M.; LUDWIG, T.; ZHAO, Y.; BAER, R.; GU, W. Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence. **Cell**, v. 149, p. 1269-1283, 2012.

LIMA, J. F.; MALAVAZI, I.; FERREIRA, M. E. da S.; SAVOLDI, M.; MOTA, A. O.; CAPELLARO, J. L.; GOLDMAN, M. H. de S.; GOLDMAN, G. H. Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* DNA damage binding protein homologue DdbA. **Mol. Genet. Genomics**, v. 279, p. 239-253, 2008.

LIU, P.; LUO, L.; GUO, J.; LIU, H.; WANG, B.; LONG, C. A.; CHENG, Y. Farnesol induces apoptosis and oxidative stress in the fungal pathogen *Penicillinium expansum*. **Mycologia**, v. 102, n. 2, p. 311-318, 2010.

MacPHERSON, S.; LAROCHELLE, M.; TURCOTTE, B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 70, n. 3, p. 583-604, 2006.

MALAVAZI, I.; SAVOLDI, M.; Di MAURO, S. M. Z.; MENCK, C. F. M.; HARRIS, S. D.; GOLDMAN, M. H. de S.; GOLDMAN, G. H. Transcriptone analysis of *Aspergillus nidulans* exposed to camptothecin-induced DNA damage. **Eucaryot. Cell**, v. 5, n. 10, p. 1688-1704, 2006.

MAZZONI, C.; FALCONE, C. Caspase-dependent apoptosis in yeast. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1783, p. 1320-1327, 2008.

McCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicol. Lett.**, n. 99, p. 157-168, 1998.

MICHAN, S.; LLEDIAS, F.; HANSBERG, W. Asexual development is increased in *Neurospora crassa* cat-3-null mutant strains. **Eukaryot. Cell**, v. 2, p. 798-808, 2003.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-glutathione peroxidase, catalaseand Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.**, v. 17, n. 3, p. 235-248, Sept. 1994.

MURPHY, M. P. Mitochondrial thiols in antioxidant protection and redox signaling: distinct roles for glutathionylation and other thiol modifications. **Antioxid. Redox Signal.**, v. 16, p. 476-495, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2000. 973 p.

NIGRO, J. M.; SIKORSKI, R.; REED, S. I.; VOGELSTEIN, B. Human p53 and CDC2Hs genes combine to inhibit the proliferation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 12, n. 3, p. 1357-1365, 1992.

NINOMIYA, Y.; SUZUKI, K.; ISHII, C.; INOUE, H. 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, Aug. 2006.

ODA, K.; KAWASAKI, N.; FUKUYAMA, M.; IKEDA, S. Ectopic expression of mitochondria endonuclease Pnu 1 p *Schizosaccharomyces pombe* induces cell death of the yeast. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p. 1095-1099, 2007.

PAIETTA, J. V.; MARZLUF, G. A. Gene disruption by transformation in *Neurospora crassa*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 5, n. 7, p. 1554-1559, July 1985.

PAYEN, A. Extrain d'un rapport addresse' a' M. Le Marechal Duc de Dalmatie, Ministre de la Guerre, President du Conseil, sur une alteration extraordinaire du pain du munition. **Ann. Chim. Phys.**, v. 9, n. 1, p. 5-21, 1843.

PERKINS, D. D.; DAVIS, R. H. Neurospora at the millennium. **Fungal Genet. Biol.**, v. 31, n. 3, p. 153-167, Dec. 2000.

PIWOCKA, K. JARUGA, E.; SKIERSKI, J.; GRADZKA, I.; SIKORA, E. Effect of glutthione depletion on caspase-3 independent apoptosis pathway induced by curcumin in jurkat cells. **Free Radical Biol. Med.**, n. 31, p. 670-678, 2001.

POULSEN, H. E. Oxidative DNA modifications. **Exp. Toxicol. Pathol.**, v. 57, p. 161-169, 2005. Suppl. 1.

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

REMACLE, J.; LAMBERT, D.; RAES, M.; PIGEOLET, E.; MICHIELS, D.; TOUSSAINT, O. Importance of various antioxidant enzymes for cell stability: confrontation between theoretical and experimental data. **Biochem. J.**, v. 286, pt. 1, p. 41-46, Aug. 1992.

SAVOLDI, M.; MALAVAZI, I.; SORIANI, F. M.; CAPELLARO, J. L.; KITAMOTO, K.; FERREIRA, M. E. da S.; GOLDMAN, M. H. de S.; GOLDMAN, G. H. Farnesol induces the transcriptional accumulation of the *Aspergillus nidulans* Apoptosis-Inducing Factor (AIF)-like mitochondrial oxidoreductase. **Mol. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 44-59, 2008.

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. **Curr. Biol.**, v. 24, p. 453-462, 2014.

SCHULTE, U.; BECKER, I.; MEWES, H. W.; MANNHAUPT, G. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa.* **J. Biotechnol.**, v. 14, n. 1, p. 3-13, Mar, 2002.

SHEAR, C. L.; DODGE, B. O. Life histories and heterothallism of the red bread-mold fungi of the *Monilia sitophila* group. **J. Agric. Res.**, v. 34, n. 1, p. 1019-1042, June 1927.

SHELTON, S. B.; KRISHNAMURTHY, P.; JOHNSON, G. V. W. Effects of cyclin-dependent kinase-5 activity on apoptosis and tau phosphorylation in immortalized mouse brain cortical cells. **J. Neurosci. Res.**, v. 76, n. 1, p. 110-120, 2004.

SIES, H. (Ed.). **Oxidative stress**. London: Academic, 1985. 507 p.

SOKOLOVSKY, V.; KALDENHOFF, R.; RICCI, M.; RUSSO, V. E. A. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa.* **Fungal Genet. Newsl.**, v. 37, p. 41-43, 1990.

SPRINGER, M. L.; YANOFSKY, C. A morphological and genetic analysis of conidiophore development in *Neurospora crassa.* **Genes Devel.**, v. 3, n. 4, p. 559-571, Apr. 1989.

TAKAHASHI, M.; YAMASHITA, K.; SHIOZAWA, A.; ICHIISHI, A.; FUKUMORI, F.; FUJIMURA, M. An AP-1-like transcription factor, NAP-1, regulates expression of the glutathione S-transferase andNADH: flavin oxidoreductase genes in *Neurospora crassa.* **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 74, p. 746-752, 2010.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; Van BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Prolif.**, n. 36, p. 165-175, 2003.

VIDEIRA, A.; KASUGA, T.; TIAN, C.; LEMOS, C.; CASTRO, A.; GLASS, N. L. Transcriptional analysis of the response of *Neurospora crassa* to phytosphingosine reveals links to mitochondrial function. **Microbiology**, v. 155, p. 3134-3141, 2009.

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

WEIRAUCH, M. T.; YANG, A.; ALBU, M.; COTE, A. G.; MONTENEGRO-MONTERO, A.; DREWE, P.; NAJAFABADI, H. S.; LAMBERT, S. A.; MANN, I.; COOK, K.; ZHENG, H.; GOITY, A.; BAKEL, H.; LOZANO, J. C.; GALLI, M.; LEWSEY, M. G.; HUANG, E.; MUKHERJEE, T.; CHEN, X.; REECE-HOYES, J. S.; GOVINDARAJAN, S.; SHAULSKY, G.; WALHOUT, A. J. M.; BOUGET, F.Y.; RATSCH, G.; LARRONDO, L. F.; ECKER, J. R.; HUGHES, T. R. Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. **Cell**, v. 158, n. 6, p. 1431-1443, 2014.

WESTERGAARD, M.; MITCHELL, H. K. Neurospora. A synthetic medium favoring sexual reproduction. **Amer. J. Bot.**, v. 34, n. 10, p. 573-577, 1947.

WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B. DNA damage and cancer: meassurement and mechanism. **Cancer Lett.**, v. 93, p. 113-120, 1995.

WYNN, R. M.; DAVIE, J. R.; COX, R. P.; CHUANG, D. T. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 124, p. 31-36, 1994.

YOULE, R. J.; KARBOWSKI, M. Mitochondrial fission in apoptosis. **Nature Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 657-663, 2005.

ZHU, J.; YU, X.; XIE, B.; GU, X.; ZHANG, Z.; LI, S. Transcriptomic profilingbased mutant screen reveals three new transcription factors mediating menadione resistance in *Neurospora crassa*. **Fungal Biol.**, v. 117, p. 422-430, 2013.