

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

KARINA GABRIELLE RESGES ORIVES

**Estudos de caracterização da proteína NPF, um homólogo
da proteína p55 de *Drosophila*, presente em complexos de
remodelagem de cromatina em *Neurospora crassa* em
condições de estresse**

Araraquara
2023

KARINA GABRIELLE RESGES ORIVES

Estudos de caracterização da proteína NPF, um homólogo da proteína p55 de *Drosophila*, presente em complexos de remodelagem de cromatina em *Neurospora crassa* em condições de estresse

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dr. Fernanda Zanolli Freitas

**Araraquara
2023**

O69e

Orives, Karina Gabrielle Resges

Estudos de caracterização da proteína NPF, um homólogo da proteína p53 de *Drosophila*, presente em complexos de remodelagem de cromatina em *Neurospora crassa* em condições de estresse / Karina Gabrielle Resges Orives. -- Araraquara, 2023
86 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara
Orientadora: Fernanda Zanolli Freitas

1. Cromatina. 2. Regulação de expressão gênica. 3. Estresse. 4. *Neurospora crassa*. 5. Interação proteína-proteína. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Estudos de caracterização da proteína NPF, um homólogo da proteína p55 de *Drosophila*, presente em complexos de remodelagem de cromatina em *Neurospora crassa* em condições de estresse"

AUTORA: KARINA GABRIELLE RESGES ORIVES

ORIENTADORA: FERNANDA ZANOLLI FREITAS

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FERNANDA ZANOLLI FREITAS (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Dra. PATRÍCIA ALVES DE CASTRO SILVA (Participação Virtual)
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP - Ribeirão Preto

Prof.^a Dr.^a SANDRA REGINA POMBEIRO SPONCHIADO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 12 de janeiro de 2023.

SÚMULA CURRICULAR

Karina Gabrielle Resges Orives

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/1330498837337027>

1. Formação Acadêmica/Titulação

2019 - 2023: Mestrado em Biotecnologia

Título: Estudos de caracterização da proteína NPF, um homólogo da proteína p53 de *Drosophila*, presente em complexos de remodelagem de cromatina em *Neurospora crassa* em condições de estresse.

Conclusão: 2023

Orientador: Profa. Dr. Fernanda Zanolli Freitas

Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES

Instituição: Instituto de Química – UNESP / Araraquara-SP

2014 - 2018: Graduação em Ciências Biológicas

Título: EFEITOS DO DESOXINIVALENOL SOBRE O PLEXO MIOENTÉRICO DE RATOS.

Conclusão: 2018

Orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Sousa

Instituição: Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR, PR.

2. Atividades de Pesquisa

2.1. Resumos apresentados em congressos

ORIVES, K. G. R.; CAMPANELLA, J. E. M.; BERTOLINI, M. C.; FREITAS, F. Z. **The NPF protein, a component of the Polycomb repressive complex 2 (PRC2) in *Neurospora crassa*, displays a role in adaptative stress response.** In: 51st Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq) and 46th Congress of the Brazilian Society of Biophysics (SBBf) / LAFESB, 2022, Águas de Lindóia, SP. Abstracts Book of 51st SBBq/46th SBBf, 2022.

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Evelise e Marcos, a minha irmã Juliane, e aos meus avós Jair e Cacilda, pois foram graças aos seus esforços que hoje posso concluir o meu curso;

À Deus, pois sem ele eu não teria capacidade para desenvolver este trabalho;

A todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha orientadora, Profa. Dra. Fernanda Zanolli Freitas, por acreditar em mim e pela oportunidade, pelos conhecimentos adquiridos, pela confiança e também pela amizade.

À Profa. Dr. Maria Célia Bertolini, pelas interações, pelos conselhos, pelo material e espaço cedido no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório Maria, Thales, Eduardo, Julia, Mariana, Johanna e especialmente ao Rodrigo e ao Jonas, pelas conversas e pelo tempo disponível que passaram me auxiliando nos experimentos e sanando minhas dúvidas dentro do laboratório.

Aos meus pais Marcos e Evelise, à minha irmã Juliane, e a meus avós Jair e Cacilda por me incentivaram buscar conhecimento, e que me deram todo suporte possível para conseguir estudar longe de casa. Também gostaria de agradecer ao meu namorado Gabriel, por me incentivar a continuar nos dias difíceis.

Ao Instituto de Química e seus funcionários de modo geral, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e ao Departamento de Bioquímica e Química Orgânica, por terem me recebido e pelo suporte que me foi dado durante este período em que estive executando meu projeto de pesquisa.

Em especial, quero agradecer aos funcionários da Seção de Pós-Graduação pela paciência e constante ajuda e orientação e às meninas da biblioteca pelo apoio e revisão da bibliografia deste trabalho. Em especial, quero agradecer também ao Tarcísio, técnico do laboratório, pela paciência e por toda a ajuda com as demandas do laboratório.

E a todos vocês que contribuíram para a minha formação pessoal e profissional de alguma forma!

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	9
RESUMO.....	10
ABSTRACT	12
INTRODUÇÃO	14
1. <i>Neurospora crassa</i> como um organismo modelo para estudos de estresse ambiental	15
1.1. Ciclo de vida de <i>Neurospora crassa</i>	17
2. Expressão gênica e regulação	20
3. O produto da ORF NCU06679 e o estresse térmico.....	26
OBJETIVOS	31
MATERIAIS E MÉTODOS	34
1. LINHAGENS DE <i>Neurospora crassa</i>	35
2. MEIOS DE CULTIVO	35
2.1. Manutenção e cultivo do fungo	35
3. SOLUÇÕES E TAMPÕES	37
4. REAGENTES	37
5. METODOLOGIAS.....	37
5.1. Manutenção das linhagens e condições de cultivo para as análises fenotípicas e ensaios de estresse em placas.....	37
5.2. Confirmação do nocaute gênico e da complementação da linhagem mutante	39
5.2.1. Extração do DNA genômico de <i>N. crassa</i>	39
5.2.2. Amplificação do gene <i>npf</i>	40
5.3. Ensaios de choque térmico em meio líquido	42
5.4. Preparo de extratos celulares e determinação do conteúdo de glicogênio	42
5.5. Construção da linhagem homocario de <i>N. crassa</i> FGSC 13915 complementada ($\Delta npf::npf$) expressando a proteína NPF-GFP	43
5.5.1. Seleção do duplo-mutante e transformação	43
5.5.2. Purificação de homocario da linhagem complementada	43
5.6. Determinação da localização subcelular da proteína de fusão NPF-sfGFP em situações de estresse térmico.....	44
RESULTADOS E DISCUSSÕES	46
1. A proteína NPF de <i>N. crassa</i> e sua provável rede de interação	47
2. A deleção do gene <i>npf</i> causa alterações fenotípicas importantes em <i>N. crassa</i>	55
3. NPF e a sensibilidade de <i>N. crassa</i> a diferentes estímulos estressantes.....	63
PRINCIPAIS CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS

5'- e 3'-UTR: 5'- e 3'-*Untranslated Region* (regiões 5'- e 3'-não traduzidas)

BLAST: ferramenta de bioinformática para realizar alinhamento de sequências

bp: *base pairs* (pares de bases)

CAF: proteína *Chromatin assembly factor-1*

DAPI: 4',6- Diamidino-2-phenilindol

DNA: ácido desoxirribonucleico

DNAg: DNA genômico

dNTPs: deoxiribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)

dsDNA: *double-strand* DNA (DNA dupla-fita)

DTT: ditionitrito

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EROs ou ROS: espécies oxigênio-reativas

FGSC: *Fungal Genetics Stock Center* (banco de linhagens de fungos)

gsn: gene *gsn* (codifica a enzima glicogênio sintase em *N. crassa*)

HAT: proteína histone acetiltransferase

HDAC: proteína histona-deacetilase

HOG High: *High-Osmolarity Glycerol pathway* (via de sinalização de alta osmolaridade mediada por glicerol na levedura *S. cerevisiae*)

HS: *Heat Shock* (choque térmico)

kb: Kilobase

Lys: lisina (aminoácido)

MAPK: *Mitogen-activated protein kinases* (via de sinalização mediada por proteínas quinases)

mRNA: RNA mensageiro

NaF: fluoreto de sódio

N-terminal: região amino-terminal da proteína

Oligos: oligonucleotídeos

ORF: *Open Reading Frame*

PAC-3: fator de transcrição da via de sinalização mediada por pH em *N. crassa*

PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação de polimerização em cadeia)

PDB: banco de dados de proteínas

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil

RNA: ácido ribonucleico

rpm: rotações por minuto

rRNA: RNA ribossomal

SC: *Synthetic-Cross médium* (meio de cultivo para cruzamento em *N. crassa*)

STRE: *Stress Response Elements* (elemento de DNA regulatório de resposta a estresse)

TAFII: fator de transcrição TAFII

TCA: ácido tricloroacético

TLCK: N α -p-tosil-L-lisina-clorometilcetona hidrocloreto

Tris: hidroximetilaminometano

tRNA: RNA transportador

Trp-Asp: aminoácidos triptofano (Trp) e ácido aspártico (Asp)

Via OS: via de sinalização Osmoticamente Sensível mediada por MAPK

VM: Meio mínimo de Vogel (meio de cultivo para *N. crassa*)

RESUMO

Torna-se cada vez mais evidente que modificações covalentes introduzidas em cromatinas, tais como a metilação de resíduos de aminoácidos específicos em proteínas histonas, podem afetar profundamente as funções dos genomas de diferentes organismos. O complexo PRC2, composto por proteínas Polycomb, é um regulador que em plantas, animais e fungos, trimetila o resíduo de lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), levando a cromatina a um estado transcricional reprimido. Embora ausente nas leveduras, os componentes centrais do complexo PRC2 são bastante conservados e em *Neurospora crassa* são representados pelas proteínas SET-7, EED, SU(Z)12, e NPF. Utilizando uma abordagem proteômica para encontrar o fator de transcrição modulando negativamente a expressão do gene *gsn* durante o estresse térmico, nosso grupo encontrou entre vários candidatos, a proteína NPF do complexo PRC2, sugerindo um papel para a mesma na resposta ao estresse térmico. Considerando que a repressão da expressão gênica mediada por H3K27me3 é ainda bastante desconhecida em fungos, e que inicialmente NPF foi descrita estar relacionada ao estresse térmico, aproveitamos o sistema relativamente simples de *N. crassa* para explorar possíveis relações entre NPF-PRC2 e decifrar algumas das respostas adaptativas do fungo a diferentes formas de estresse. Para isto, analisamos inicialmente o comportamento de uma linhagem do fungo nocauteada no gene *npf* (Δnpf) após exposição a várias condições estressantes, tais como alta temperatura (45° C), valores de pH ácido (4,5) e alcalinos (7,2 e 7,8), alta osmolaridade (sorbitol e NaCl), agentes oxidantes (menadiona, H₂O₂ e paraquat) e altas concentrações de íons cálcio, tendo como controle a linhagem mutante genotipicamente recuperada e como *background* a linhagem selvagem do fungo. Nossos resultados demonstraram que a linhagem Δnpf possui um fenótipo defectivo durante o crescimento vegetativo, tais como uma conidiação reduzida, baixa produção de carotenoides, micélio com hifas bastante ramificadas e extensões encurtadas e uma taxa de extensão de hifas basais tardia. Quando cultivada em pH alcalino, a linhagem mutante apresentou uma redução acentuada no diâmetro da colônia e também um crescimento prejudicado em níveis elevados de íons cálcio, agentes osmóticos (sorbitol e NaCl) e agentes oxidantes (paraquat, menadiona e peróxido de hidrogênio), sugerindo que as vias de regulação de osmolaridade, pH e desintoxicação dos fungos são de alguma forma moduladas por NPF e que esta proteína pode ser um *hub* para o *crosstalk* entre as diferentes vias de sinalização. Quando submetida a estresse térmico, a linhagem Δnpf mostrou crescimento radial drasticamente reduzido, que foi acompanhado por uma redução do conteúdo de glicogênio. Considerando os dados da literatura para NPF, esta é a primeira vez que é atribuída a esta proteína um papel no metabolismo de carboidratos e na resposta fúngica ao estresse. Nossos resultados são, portanto, inéditos e indicaram que NPF é importante para as células modularem adequadamente a expressão gênica e responderem aos desafios ambientais em fungos e participarem na resposta adaptativa ao estresse. Se NPF participa diretamente ou não destes eventos e se NPF-PRC2 estão envolvidas em eventos de remodelagem da cromatina, necessita ser melhor investigado, uma vez que o crescimento tardio da Δnpf pode ser devido a um papel desta proteína em outros complexos que não seja o PRC2.

Palavras-chave: cromatina, regulação de expressão gênica, estresse, *Neurospora crassa*, interação proteína-proteína.

ABSTRACT

It has become increasingly clear that covalent modifications of chromatin, such as methylation of specific histone residues can have profound effects on genome functions in different organisms. In plants, animals and fungi, the Polycomb proteins complex PRC2 is a regulator that trimethylates Lys27 of histone H3 (H3K27me3), leading to transcriptionally repressed chromatin state. Although absent in yeasts, the core components of PRC2 are conserved in several fungi, including the *Neurospora crassa* proteins SET-7, EED, SU(Z)12, and NPF. Using a proteomic approach to search for TF downregulating *gsn* gene transcription under heat stress, our group found among putative candidates, the PRC2 NPF component, suggesting a role for this protein in heat stress response. Considering that repression mediated by H3K27me3 is largely unknown in fungi, and that we previously correlated NPF to heat-stress, we took advantage of the relatively simple *N. crassa* system to explore possible relationships between NPF-PRC2 and stress-adaptative responses. To achieve our goals, growth behavior of a Δnpf strain was analyzed after exposing to stressing conditions, such as heat (45° C), acid (4.5) and alkaline pH values (7.2 and 7.8), osmotic (sorbitol and NaCl), oxidative chemicals (menadione, H₂O₂, paraquat) and high quantities of calcium, using as control a rescued Δnpf and the wild-type strain as background. The Δnpf strain displayed several phenotypical defects at the vegetative growth condition, as an impaired conidiation, defective carotenoid production, a high branching-hyphae mycelium with a shorten-hyphae extension, and a retarded hyphae extension rate. Mutant cells cultivated at alkaline pH displayed severe colony-diameter reduction, and impaired growth at high levels of calcium ions, osmotic (sorbitol and NaCl) and oxidative chemicals (paraquat, menadione and hydrogen peroxide), suggesting that the high osmolarity, pH and fungi detoxification pathways are somehow modulated by NPF, that might be acting as a hub in a pathway crosstalk. For heat stress, we found for Δnpf a, extreme reduced radial growth and in parallel, a reduction of glycogen content. Despite of literature data, this is the first time that a role in carbohydrate metabolism and stress-response is addressed to NPF. These unpublished results pointed that NPF is important to cells properly modulate gene expression and respond to environmental challenges in fungi and participating in stress-adaptive response. If NPF participates directly or not of these events and if NPF- PRC2-chromatin-remodeling events are also involved, need to be more investigated, since the slow-growth Δnpf can be due to a role of this protein in complexes other than PRC2.

Keywords: chromatin, gene expression regulation, stress, *Neurospora crassa*, protein-protein interaction.

INTRODUÇÃO

1. *Neurospora crassa* como um organismo modelo para estudos de estresse ambiental

Os fungos têm exercido papel fundamental na compreensão dos mecanismos moleculares de organismos eucariotos, devido sua facilidade de manipulação e o conhecimento das características genéticas e bioquímicas envolvidas em seu ciclo de vida. Dentre as espécies filamentosas, *N. crassa* é um organismo modelo bastante estudado. Apresentou um importante papel no progresso da bioquímica, genética e biologia molecular quando Beadle & Tatum (1941) definiram o papel de genes envolvidos seu metabolismo celular, baseados na hipótese “um gene – uma enzima”. Estas descobertas permitiram com que este fungo se tornasse um modelo experimental popular na época para estudos bioquímicos, genéticos, fisiológicos e moleculares, não só pela sua facilidade de manipulação e desenvolvimento, como também pelo amplo conhecimento adquirido de sua genética e de seus sistemas bioquímicos. São mais de 90 anos utilizando *N. crassa* como organismo modelo em estudos de expressão gênica, desenvolvimento e diferenciação celular, ritmo circadiano, defesa do genoma, bem como outros aspectos da biologia de eucariotos (DAVIS & PERKINS, 2002). *N. crassa* pertence à classe dos *Eumycetes*, subclasse *Ascomycota*, família *Sordariaceae*, subfamília *Sphaeriales* (ESSER & KUENEN, 1967). Trata-se de um organismo aeróbio estrito, saprófito e não patogênico, com tempo de duplicação celular de aproximadamente 150 min. Possui coloração alaranjada e vive em nichos tropicais e subtropicais, sendo facilmente encontrado na natureza colonizando arbustos e troncos de árvores (JACOBSON ET AL., 2004). Tem nutrição simples, sendo sua única exigência nutricional a biotina (DAVIS & DE SERRES, 1970). Por ser de caráter heterotrófico, pode utilizar diversas fontes de carbono. O nitrogênio é metabolizado na forma de amônia, que pode ser obtida de maneira direta ou indireta, através da transformação de nitritos, aminoácidos ou catabolismo de proteínas e ácidos nucleicos. Tem seu crescimento ótimo em pH 5,4, mas é bastante tolerante e consegue se desenvolver numa faixa de pH variando entre 4,0 e 9,0 (THEDEI-JUNIOR ET AL., 1994).

Ao contrário das leveduras, *N. crassa* é um organismo multicelular e possui pelo menos 28 tipos distintos de células, muitos dos quais derivam das hifas, que contribuem para seu complexo ciclo de vida (BISTIS ET AL., 2003, BORKOVICH ET AL., 2004). Suas hifas são tubulares, ramificadas e septadas, permitindo a passagem de organelas e núcleos entre os septos. A fusão de suas hifas permite a formação de micélio heterocariótico, onde múltiplos genomas contribuem para o metabolismo de um único micélio. É um organismo heterotático haplóide e apresenta tanto o desenvolvimento sexual quanto assexuado, o qual é altamente influenciado por fatores do meio ambiente, como nutrientes, luz e TEMPERATURA (PERKINS ET AL., 1976; FINCHAN ET AL., 1979). Sua sequência genômica está totalmente determinada (GALAGAN ET AL., 2003; MANNHAUPT ET AL., 2003) e vem sendo constantemente

anotada, trazendo importantes informações bioquímicas e genéticas. Seu genoma está organizado em 7 cromossomos, que variam entre 4 a 10 Mb (SCHUTLE ET AL., 2002) e foi sequenciado por Galagan et al. (2003), revelando um tamanho de aproximadamente 40 Mb, onde foram identificados um total de 10.082 genes codificadores de proteínas (44% do genoma). Na ocasião, 41% dos genes identificados não apresentavam ortólogos conhecidos depositados em bancos de dados, refletindo o baixo conhecimento dos genomas dos fungos. Quando comparado com genomas eucarióticos conhecidos, os autores também verificaram que 1.421 genes de *N. crassa* correlacionavam melhor com proteínas de plantas ou animais (GALAGAN ET AL., 2003), sugerindo uma maior proximidade filogenética entre fungos filamentosos e eucariotos superiores, quando comparado com eucariotos inferiores, como as leveduras. Na verdade, o fato de *N. crassa* ser um organismo multicelular faz com que uma grande quantidade de seus genes não apresente ortólogos em *Saccharomyces cerevisiae* ou *Schizosaccharomyces pombe*, sugerindo que *N. crassa* pode ser um organismo mais adequado para a compreensão dos aspectos de regulação celular dos eucariotos superiores (BORKOVICH ET AL., 2004; DUNLAP ET AL., 2007). Em 2011, um novo estudo do genoma de *N. crassa* realizado por Wang et al., mostrou que aproximadamente 40% dos genes encontrados codificavam proteínas funcionalmente conhecidas em bancos de dados, e que ocorriam cerca de 27.588 interações proteína-proteína entre as 3.006 proteínas do fungo.

No ano de 2015, o BROAD Institute – MIT/Harvard (<https://www.broadinstitute.org>) realizou uma complementação da anotação do genoma do fungo e disponibilizou os resultados obtidos nos bancos de dados do NCBI (NC12, número de acesso GCA_000182925.2; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/19?>) e FungiDB (https://fungidb.org/fungidb/app/record/organism/NCBITAXON_367110#category:gene-report), onde é possível observar um pequeno aumento no total de genes, de 10.082 para 10.591. Desde então, o número de anotações funcionais praticamente dobrou e cerca de 90% dos genes (9.757 ORFs) já se encontram anotados como codificando ortólogos conhecidos. Estes dados demonstram que mesmo após 20 anos da resolução do genoma do fungo, existe ainda muitos genes com funções desconhecidas ou parcialmente anotadas. Esta informação, somada à sua excelente correlação com os eucariotos superiores, ainda faz com que *N. crassa* possa ser considerada um organismo interessante para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos não identificados até o momento, os quais podem ser representados por genes com novas funções ou até mesmo novos genes desempenhando funções de maneiras diferentes das conhecidas, permitindo descobrir proteínas e atribuir funções a elas, ou atribuir funções às proteínas já existentes.

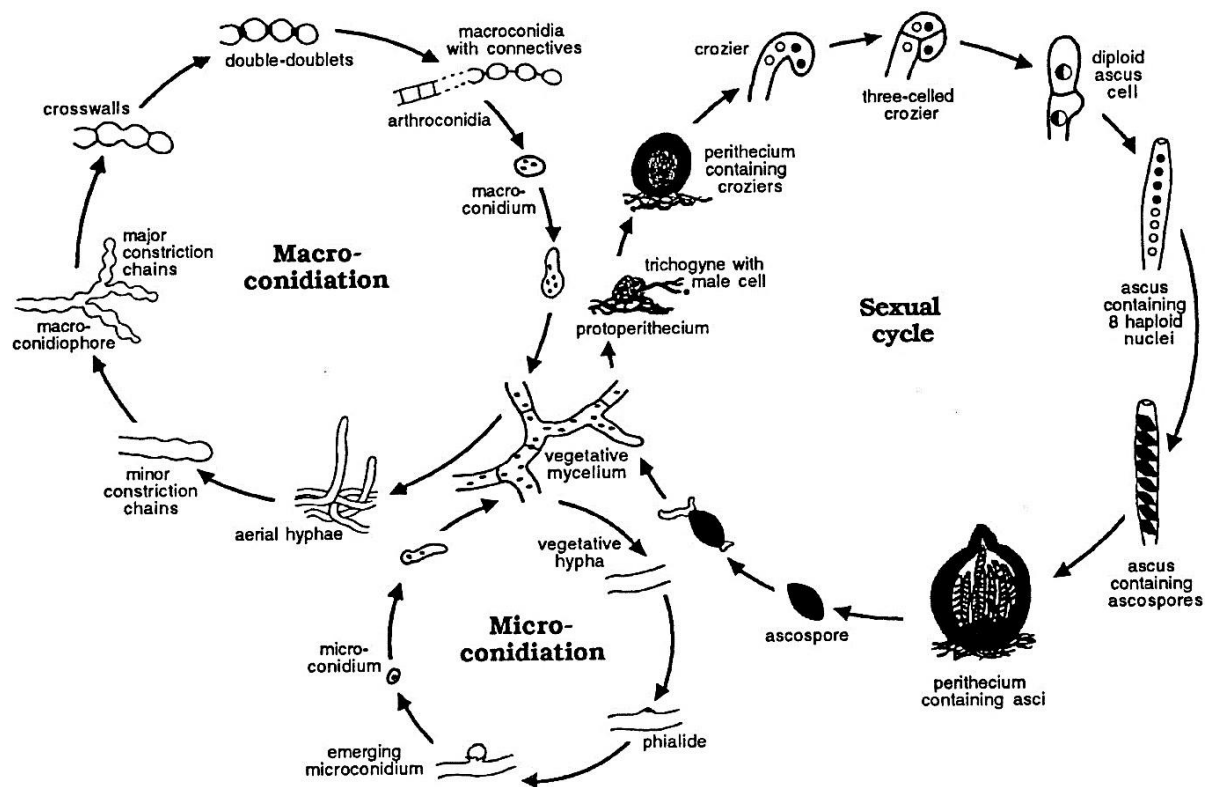
Em eucariotos, existem dois mecanismos de recombinação gênica, a homóloga que envolve a quebra do DNA seguida da troca entre sequências homólogas e a recombinação não homóloga, que envolve a ligação direta das extremidades da fita de DNA independente

da homologia. A recombinação homóloga é predominante em *S. cerevisiae*, representando o método mais eficiente pelo qual se pode inativar um gene de interesse. Apesar de ocorrer com muita frequência em leveduras, este mecanismo raramente ocorre em *N. crassa* e nos demais eucariotos, dependendo do gene e do tamanho da sequência nucleotídica homóloga que flanqueia o gene de interesse. Já a recombinação não homóloga é conservada evolutivamente em todos os reinos, sendo predominante em eucariotos superiores, como humanos, plantas e insetos e as proteínas envolvidas neste mecanismo Ku70 e Ku80 são conservadas desde leveduras até humanos. Com a identificação de ortólogos das proteínas Ku70 e Ku80 no genoma de *N. crassa* (genes *mus-51* e *mus-52*, respectivamente), Ninomiya et al. (2004) desenvolveram um procedimento para a inativação de genes homólogos de *N. crassa* e, desta maneira, construíram linhagens nas quais o processo de recombinação não homóloga é inoperante. Este procedimento foi e continua sendo amplamente utilizado para a construção de linhagens de *N. crassa* mutantes apresentando genes codificadores de proteínas individualmente nocauteados, com o principal objetivo de determinar a função de cada deles. Todas estas linhagens contendo genes individualmente inativos estão disponíveis para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA).

1.1. Ciclo de vida de *N. crassa*

O ciclo de vida de *N. crassa* (Figura 1) compreende duas fases: a vegetativa, onde aparecem estruturas destinadas à propagação do fungo (conídios) e a sexual de reprodução, onde é possível verificar a presença de corpos de frutificação. Sendo um fungo heterotático, *N. crassa* possui dois tipos de indivíduos sexualmente compatíveis, designados A e a. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto o outro pode se comportar como macho (doador de núcleos) ou fêmea (receptora de núcleos, denominada protoperitécio) (FINCHAN ET AL., 1979). Durante a fase vegetativa de crescimento do fungo, o micélio é composto por hifas de núcleos haploides e a reprodução se faz por macroconídios e microconídios. A fase sexual acontece quando dois micélios de tipos sexuais opostos crescem juntos (**A** e **a**), sob condições limitantes de nitrogênio. Em resposta à privação de N, são originados corpos de frutificação (protoperitécios), adotados convencionalmente como órgãos reprodutores femininos. O protoperitécio consiste em uma ascogônia e a partir desta, hifas especializadas chamadas de tricóginos, projetam-se em direção ao ar.

A fertilização ocorre quando uma célula de um tipo de acasalamento opostos, que pode ser um macroconídio, um microconídio ou até mesmo um artroconídio (pequeno pedaço



Fonte: BORKOVICH ET AL., 2004.

Figura 1. Ciclo de vida de *Neurospora crassa*. O ciclo de vida compreende duas fases distintas, a sexual e a vegetativa. A fase sexual se desenvolve em condições de estresse e é responsável pela formação do protoperitécio, a estrutura de reprodução feminina, e do tricógino, a estrutura de reprodução masculina. Na fase vegetativa há a formação de macro e microconídios, destinados a propagação do fungo.

de micélio), entra em contato com o tricógino. Quando o contato acontece, ocorre a plasmogamia e um ou mais. Núcleos da célula fertilizante migram através do tricógino até atingir a ascogônia. Neste estágio, ainda não ocorre a fusão nuclear, mas apenas uma organização dos núcleos aos pares, que iniciam uma divisão de maneira sincronizada. O produto destas divisões resulta na formação de numerosas hifas ascógenas, que passam a crescer para fora da ascogônia. Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia começa a desenvolver uma espécie de parede, que vai abrigar as hifas ascógenas recém-formadas, originando uma estrutura denominada peritécio maduro. Os núcleos de *mating types* opostos, localizados nas extremidades da hifa ascógena começam a se dividir, há formação de septos nesta região da hifa, com uma célula central, contendo dois núcleos de tipos opostos distintos, denominado asco inicial. Depois de formado o asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre então a meiose, dando origem a núcleos haploides. Estes quatro núcleos haploides sofrem então uma mitose, dando origem a oito núcleos dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada tipo de acasalamento (**A** e **a**). estes núcleos originarão esporos (ascósporos), que sob eventuais circunstâncias germinarão originando novo micélio (FINCHAN ET AL., 1979).

Quando cultivado em condições adequadas de nitrogênio, é possível observarmos estruturas e propagação denominadas conídios. Estes conídios podem ser produzidos por duas vias distintas, a macroconidiação e a microconidiação. Ambas as vias requerem interface água-ar e são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos, as quais se encontram localizadas nas extremidades das hifas aéreas e permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Na microconidiação, os esporos mononucleados são formados dentro das hifas basais e expelidos a partir das paredes quando o processo de maturação se completa (PERKINS ET AL., 1976). As hifas vegetativas são multinucleadas e possuem crescimento polarizado e ramificação constante (GOW, 1994; TRINCI, 1984; TRINCI ET AL., 1994; TURNER E HARRIS, 1997). Estas hifas possuem septos (HARRIS, 2001), os quais permitem o movimento de organelas entre os compartimentos. A frequente fusão entre estas hifas produz uma rede complexa denominado micélio (HICKEY ET AL, 2002) e promove a formação de heterocários onde múltiplos genomas podem contribuir para o metabolismo de um único micélio. As hifas aéreas são diferenciadas a partir das vegetativas em resposta a privação de nutrientes, dessecação e outras formas de estresse, formando uma cadeia de esporos assexuais multinucleados (macroconídios) para dispersão (SPRINGER E YANOFISKY, 1989). Outro tipo de esporos, assexuados e mononucleados (microconídios), também podem ser diferenciados diretamente de hifas vegetativas ou então, de microconidióforos (BISTIS ET AL., 2003; MAHESHWARI, 1999; SPRINGER E YANOFISKY, 1989).

2. Expressão gênica e regulação

Segundo Francis Crick (1958), o qual estabeleceu o Dogma Central Da Biologia Molecular, a informação genética contida nas moléculas de DNA é perpetuada entre as espécies por meio da replicação da molécula de DNA, e o produto da expressão genica é alcançado quando estas moléculas de DNA são transcritas em moléculas de RNA, as quais são posteriormente traduzidas em diferentes cadeias polipeptídicas, dando origem às proteínas. Algumas mudanças já foram feitas no modelo proposto originalmente. Isso ocorreu em razão de hoje se saber, por exemplo, que algumas enzimas são capazes de utilizar o RNA para produzir DNA ou RNA complementares.

Este dogma, portanto, demonstra todos os processos pelos quais os ácidos nucleicos podem passar. Temos o DNA, onde está contida a informação genética na forma de genes, que pode ser transcrito em moléculas de RNA. No processo de transcrição, uma molécula de DNA serve como molde para a criação de uma molécula de RNA. É nessa molécula de RNA que é encontrado o código usado para organizar a sequência de aminoácidos e formar as proteínas no processo de tradução. Este processo consiste na união de resíduos de aminoácidos, obedecendo à ordem de códons apresentados na molécula de RNA mensageiro. É interessante observar que uma proteína é formada a partir de ácidos nucleicos, mas um ácido nucleico não pode ser formado a partir de uma proteína. Atualmente é sabido que uma molécula de RNA pode produzir uma molécula de DNA complementar. Chamamos este processo de transcrição reversa e ele acontece principalmente em vírus. Eles possuem uma enzima denominada transcriptase reversa, que transcreve o RNA em DNA. Outro fato também observado em alguns vírus é a replicação do RNA, ocasionada por meio de RNA replicases, onde o RNA replicado vai atuar como uma molécula de RNA mensageiro. Para realizar esse processo, o vírus utiliza uma RNA replicase.

Mas o que seria um gene? Um gene é a unidade básica física e funcional da hereditariedade. Cada gene é formado por uma sequência específica de ácidos nucleicos (DNA), os quais carregam toda a informação genética necessária para a produção dos aminoácidos de uma cadeia polipeptídica ou outra molécula de RNA funcional, tal como um rRNA (RNA ribossomal) ou tRNA (RNA transportador), além de sequências de DNA regulatórias que vão orquestrar sua expressão.

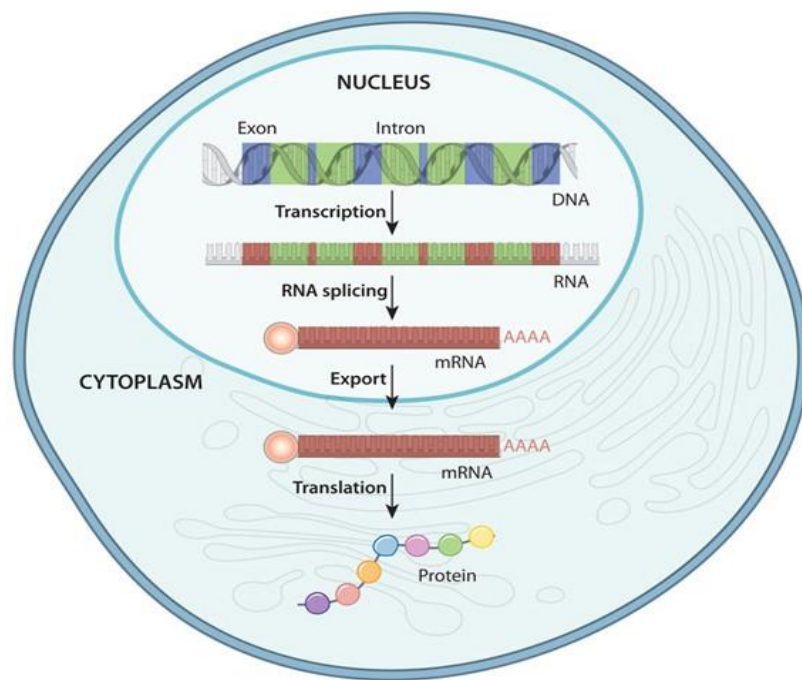
Em procariotos e eucariotos os genes encontram-se estruturalmente organizados de maneiras diferentes. Enquanto nos procariotos os genes apresentam uma correlação direta (colinearidade) entre a sequência nucleotídica da região codificadora do gene (*exons*) contida no cromossomo e seu produto de expressão (proteínas), nos eucariotos, as regiões codificadoras dos genes contidas nos cromossomos são intercaladas por regiões não codificadoras, os chamados *introns*. Estes *introns*, inicialmente transcritos em RNA no núcleo

das células, sofrem processamento e são removidos (*splicing*) para dar origem às moléculas de RNAm maduras, portanto, não estão presentes no produto final da expressão gênica. Portanto, a informação genética dos genes eucarióticos contida nos exons é interrompida por sequências de nucleotídeos (*introns*) desprovidos de qualquer informação para síntese de polipeptídios (Figura 2). Mas um gene não é formado apenas por *introns* e *exons*, existem regiões de DNA regulatórias, que antecedem ou sucedem a região codificadora e que são extremamente importantes para regular a expressão da informação gênica. São nestas regiões que são encontradas sequências de DNA que podem ser reconhecidas e ligadas por proteínas nucleares, as quais podem permitir ou não que um dado gene seja transcrito (Figura 3).

Apesar da similaridade existente entre as células que constituem os seres vivos, eles também possuem diferenças fundamentais em nível celular, como é o caso do material genético em procariotos e eucariotos. Em procariotos, a informação genética é constituída de uma (DNA cromossomal) ou mais moléculas de DNA circular (plasmídeos), presentes no citoplasma das células. Já em eucariotos, o material encontra-se fortemente associado a proteínas denominadas histonas e densamente empacotado na forma de cromatina, formando nucleossomos e por fim, os cromossomos, os quais ficam armazenados no interior dos núcleos das células (ZAHA, 2014).

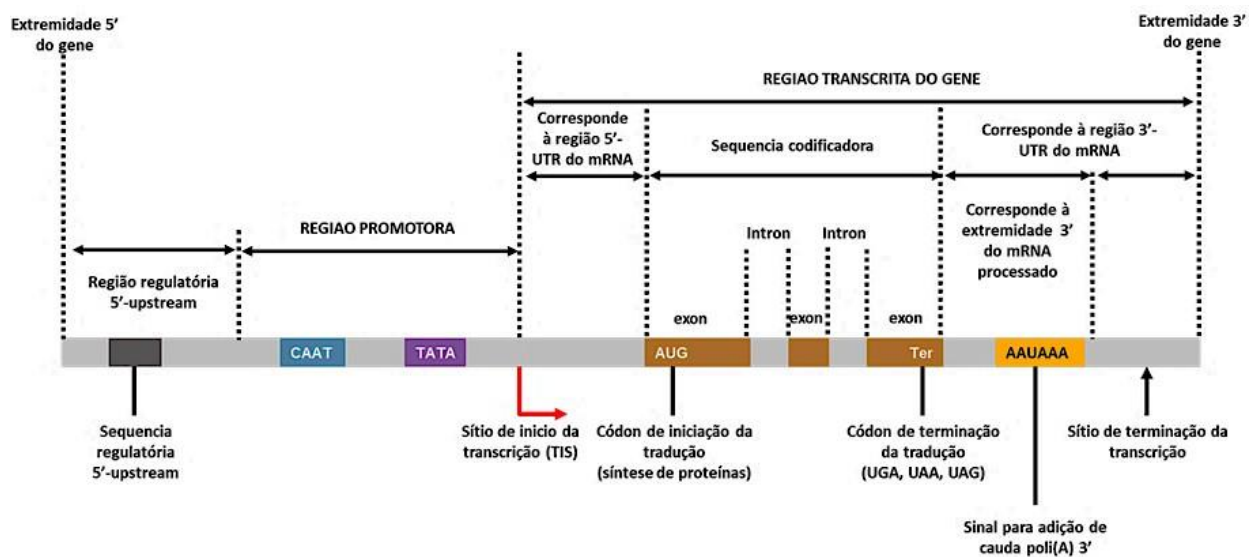
A fim de tornar a vida possível, os organismos vivos podem alterar a expressão de seus genes para responder a diferentes estímulos ambientais, hormônios e fatores de crescimento. Estes genes, por sua vez, são ainda capazes de controlar outros genes que estão ligados a processos de ativação ou repressão de diversas reações biológicas (RODWELL ET AL., 2017). A este controle altamente orquestrado dá-se o nome de regulação da expressão gênica, o qual pode ocorrer em diferentes etapas do fluxo da informação gênica, tais como:

- Remodelagem da cromatina, onde sua mudança conformacional pode facilitar ou dificultar a transcrição gênica. Uma cromatina menos compacta faz com que o gene esteja mais disponível para este fim;
- Associação de fatores de transcrição, onde proteínas apresentando sítios de ligação a regiões regulatórias do DNA e/ou regiões de interação proteína-proteína, podem se ligar diretamente a uma parte do DNA, ou a outras proteínas responsáveis de alguma forma pela transcrição, fazendo com que ela seja facilitada ou dificultada;
- Controle do processamento do mRNA, onde os eventos de *splicing*, *capping* e adição da cauda poli-A ao RNA podem ser modificados, fazendo com que a molécula tenha uma sequência diferente, ou menor tempo de vida;
- Controle da tradução, onde fatores de tradução e outras proteínas regulatórias podem aumentar ou inibir a síntese das cadeias polipeptídicas a partir das moléculas de mRNA,



Fonte: NATURE, 2010.

Figura 2. Expressão gênica em eucariotos. Regiões codificadoras e não codificadoras do gene são transcritas em moléculas de RNAm imaturas no núcleo, com o auxílio de diferentes proteínas regulatórias e fatores de transcrição. Em seguida, estas moléculas imaturas de mensageiro sofrem *splicing* para a remoção dos *introns*, e os *exons* remanescentes são adicionados de um capacete de 7-metil-guanosina na sua extremidade 5' e de uma cauda poli-A na sua extremidade 3', dando origem à molécula de mRNA madura. Esta molécula é então translocada para o citoplasma da célula, com o auxílio de proteínas específicas, onde será traduzida com o auxílio da maquinaria de tradução celular (ribossomos) em cadeias polipeptídicas, que poderão ou não sofrer modificações pós-traducionais e adquirir sua estrutura tridimensional definitiva, a qual é responsável por sua função biológica.



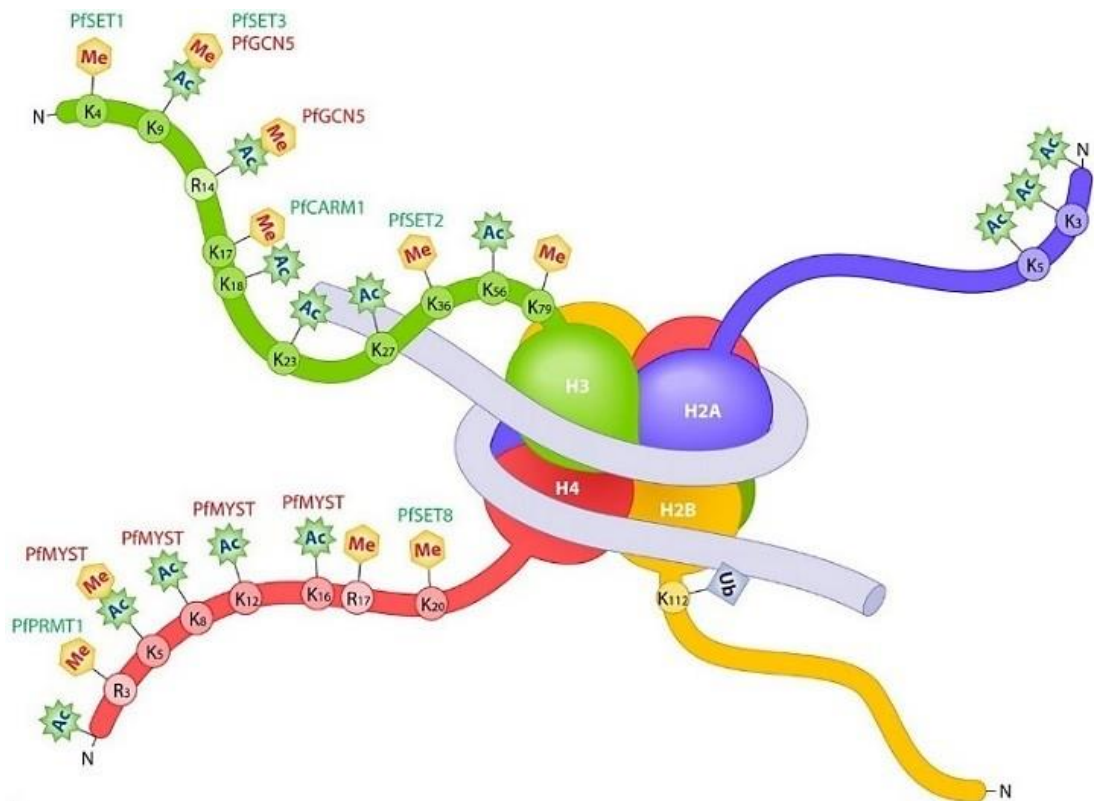
Fonte: autoria própria.

Figura 3. Organização estrutural de um gene de eucarioto. A região codificadora do gene, formada por introns e exons, contém os códons de iniciação (AUG) e terminação da tradução (Ter). Para que esta região de origem à uma cadeia polipeptídica, é necessário primeiro que ela seja transcrita. Para isto, regiões de DNA regulatórias presentes na extremidade 5' do gene (região promotora), deverão ser ligadas por proteínas e fatores de transcrição, formando a bolha de transcrição, para que a RNA polimerase atue na síntese de uma molécula de RNAm, a qual devera inicialmente conter toda a região transcrita (introns, exons e as regiões 5' e 3' não transcritas). Esta molécula de RNAm imatura deverá sofrer processamento ainda no núcleo da célula, para remoção dos introns e adição de cauda poli(A) na região 3' e capacete de 7m-guanosina na sua região 5', originando uma molécula de mRNA madura, que transloca para o citoplasma da célula onde será traduzida. Na tradução, a região 5' não traduzida será importante para posicionar o ribossomo no local exato onde o primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica deverá ser adicionado.

- Controle pós-traducional, onde mudanças na sua conformação tridimensional, em virtude de diferentes modificações pós-traducionais tais como acetilação, fosforilação, ubiquitinação, entre outras, podem alterar a função de proteínas (RODWELL ET AL., 2017).

Embora todos os estágios da expressão gênica possam ser regulados, o principal ponto de controle é a transcrição. Para que a transcrição se inicie, proteínas ativadoras da transcrição necessitam primeiramente se ligar à cromatina, formando um complexo proteico altamente elaborado denominado complexo de remodelagem de cromatina. Durante esta etapa, as proteínas deste complexo têm a função de desestruturar o nucleossomo, por meio de eventos de remodelagem da cromatina, catalisados por enzimas com atividades modificadoras, as quais promovem a adição covalente de grupamentos acetil e metil nos resíduos de lisina das caudas das histonas (Figura 4). Estes grupamentos geram então sítios de ligação para outras proteínas e acabam por recrutá-las ao local, para ativar/favorecer ainda mais a transcrição. A presença destas proteínas no nucleossomo faz com que as sequências regulatórias do DNA contidas na região promotora dos genes antes escondidas, agora seja expostas e com isso ocorra a ligação dos fatores de transcrição, outra classe de proteínas regulatórias da expressão genica, que reconhecem sequências específicas na região promotora do gene e ligam nestas sequências, favorecendo a formação da bolha de transcrição e ligação da RNA polimerase, formando o complexo de pré-iniciação da transcrição. Neste momento, ocorre ainda a ligação de proteínas ativadoras extras (*enhancers*), seguido do rearranjo delas no complexo proteico inicial, permitindo então que a transcrição tenha seu início propriamente dito. Considerando que a transcrição genica é o principal ponto de controle da expressão de um gene, dentro do evento de transcrição, a remodelagem de cromatina é a principal maneira de controle da transcrição de um gene. Os promotores dos genes de eucariotos são intrinsicamente inativos, não existe início de transcrição na ausência dos fatores de transcrição. E o acesso dos fatores de transcrição aos promotores dos genes é restringido pela estrutura altamente compactada da cromatina.

A remodelagem de cromatina, como dito anteriormente, é causada principalmente pelas modificações nas caudas das histonas, que modificam também sua carga eletrostática e sua interação com o DNA (MENDITI E KANG, 2007). O nucleossomo é formado devido a essas caudas terem cargas positivas, e o DNA negativas. Quando, por exemplo, proteínas modificadoras de histonas com atividade acetiltransferase adicionam grupamentos acetil em resíduos de lisina específicos nas caudas de histonas, eles reduzem a carga positiva local, fazendo com que a interação DNA-histonas seja enfraquecida e o DNA se desenrole destas proteínas, ou seja, que naquele local da cromatina o nucleossomo se desfaça. Somado a isto, os grupamentos acetil podem também funcionar como sítios de reconhecimento para que outras enzimas modificadoras de histonas, como as histonas metiltransferases, adicionem



Fonte: Adaptado DE PASCHON ET AL., 2014.

Figura 4. Remodelagem de cromatina por modificação covalente das proteínas histonas. O nucleossomo é a unidade básica de empacotamento do DNA. Consiste em um segmento do DNA enrolado ao redor de um core de 8 proteínas histonas (octâmero), sendo duas de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4. As caudas destas proteínas histonas (região N-terminal da cadeia polipeptídica que forma as proteínas histonas) se projetam para fora do nucleossomo, onde podem ser modificadas covalentemente por diferentes histonas acetiltransferases (acetilação), histona metiltransferases (metilação) e outras enzimas epigenéticas. Muitas destas enzimas modificam sítios altamente específicos – por exemplo, a histona metiltransferase EZH2 trimetila o resíduo de lisina 27 da histona H3.

ainda resíduos metil, desestabilizando ainda mais aquela região da cromatina e favorecendo o reconhecimento local pelos fatores de transcrição. Desta maneira, as sequências de DNA regulatórias presentes na região promotora do gene vão ser expostas e facilmente identificadas por fatores de transcrição e o gene poderá ser transcrito em moléculas de mRNA. Por outro lado, quando estes grupamentos acetil são removidos por proteínas com atividade histona deacetilase, a interação eletrostática DNA-histonas torna-se novamente forte, mantendo o material genético novamente condensado e impossibilitando a transcrição gênica, num clássico exemplo de regulação da expressão genica por remodelagem de cromatina (WATSON, 2015).

Algumas modificações da cromatina favorecem a ativação da transcrição. Por exemplo, a metilação dos resíduos de Lys4 e Lys36 facilita a ligação de histona acetiltransferases (HATs), as quais vão adicionar grupamentos acetil em múltiplos resíduos de Lys das caudas das histonas H3 e H4, reduzindo a interação DNA-nucleossomos e ainda acetilar resíduos de Lys específicos, afetando diretamente a interação nucleossomos-fatores de transcrição. Por outro lado, existem modificações da cromatina causam a inativação da transcrição. Por exemplo, a metilação da Lys9 da histona H3 e a deacetilação das histonas H3 e H4 pelas histonas deacetilases favorecem a formação de heterocromatina, impedindo a expressão gênica.

3. O produto da ORF NCU06679 e o estresse térmico

Todos os organismos vivos, quando expostos a diferentes situações ambientais, reprogramam a atividade celular alterando seus padrões de expressão gênica, permitindo que se adaptem a diferentes situações estressantes e sobrevivam. Dentre as diferentes situações estressantes, o choque térmico é uma condição em que a reprogramação da resposta celular é orquestrada por um conjunto de proteínas regulatórias e fatores de transcrição. Estas proteínas reconhecem e ligam sequências de DNA regulatórias específicas localizadas nos promotores de genes responsivos ao estresse térmico, modulando sua expressão aumentando ou reprimindo sua transcrição, corroborando para uma resposta de adaptação celular global eficiente para esta forma de estresse.

Entre os elementos de DNA regulatórios envolvidos na resposta ao estresse térmico incluímos os STRE (*Stress Responsive Elements*; 5'-CCCCT-3'). Os STRE são sequências de DNA presentes nos promotores de genes responsivos a estresse, que são reconhecidas e ligadas por um fator de transcrição em diferentes condições estressantes, auxiliando na modulação da resposta celular frente a estes diferentes estímulos ambientais (KOBAYASHI E MCENTEE 1990; 1993). Os fatores de transcrição que atuam sobre estas sequências de DNA regulatórias foram inicialmente descritos na levedura *Saccharomyces cerevisiae* e são

as proteínas parceiras Msn2p e Msn4p (Msn2/4p). Ambas as proteínas são fatores de transcrição do tipo *Zinc-finger* que na levedura, em condições estressantes, atuam sobre os promotores de genes responsivos a diferentes formas de estresse, induzindo suas transcrições (SCHMITT E MCENTEE, 1996; MARTINEZ-PASTOR ET AL. 1996). Aproximadamente metade dos genes responsivos a estresse na levedura são regulados pelos elementos STRE. Alguns trabalhos mostraram que em condições normais de crescimento, as proteínas Msn2p/4p estão localizadas no citoplasma das células, mas translocam para o núcleo durante o evento de estresse celular (JACQUET ET AL., 2003).

Embora na levedura, os STRE estejam relacionados com a ativação da transcrição gênica, a participação destes elementos em eventos de repressão gênica também já foi relatada (DE GROOT ET AL. 2000). No fungo filamentoso *N. crassa*, os STRE estão relacionados com a repressão do gene *gsn*, o qual codifica a enzima glicogênio sintase (enzima regulatória do processo de síntese de glicogênio) na condição de estresse térmico (FREITAS E BERTOLINI, 2004). A busca de ortólogos Msn2p/4p em fungos filamentosos mostra que estes micro-organismos aparentemente não possuem estes fatores de transcrição. No entanto, proteínas capazes de reconhecer e se ligar a sequências STRE em alguns fungos filamentosos já foram caracterizadas funcionalmente, sugerindo que existem mecanismos moleculares distintos regulando a resposta a estresse mediada por STRE em diferentes fungos (PETERBAUER ET AL. 2002; HAN E PRADE 2002; SEIDL ET AL. 2004; NICHOLLS ET AL. 2004; ROETZER ET AL. 2008; DINAMARCO ET AL. 2012).

Durante as primeiras tentativas de identificação do fator de transcrição que reconhece e liga o elemento STRE de *N. crassa*, por meio de técnicas bioquímicas acopladas à espectrometria de massas, foi possível identificar várias ORFs codificando proteínas nucleares de funções ainda desconhecidas (Tabela 1; FREITAS ET AL., 2008), capazes de ligar às regiões do promotor *gsn* contendo estes elementos STRE, dentre elas a ORF NCU06679, anotada inicialmente no banco de dados do fungo (www.fungidb.org) como um ortólogo do gene *cac-3* (*chromatin assembly complex 3*, BORKOVICH ET AL., 2004), que na levedura *S. cerevisiae* codifica a subunidade 2 da histona-acetiltransferase tipo B.

Em 2016, Freitas et al. identificaram por espectrometria de massas, a proteína SEB-1 como sendo o fator de transcrição responsável por mediar a resposta de genes a diferentes formas de estresse de maneira dependente de STRE em *N. crassa*. Esta proteína mostrou ser ortóloga do fator de transcrição Seb1 de *Trichoderma atroviridae* (PETERBAUER ET AL. 2002) e encontra-se envolvida na resposta do fungo a diferentes formas de estresse, tais como choque térmico, estresse oxidativo, estresse ácido e choque osmótico. Foi observado também que nestas condições de estresse, a proteína de fusão SEB-1-GFP, originalmente citoplasmática, transloca para o núcleo (FREITAS ET AL., 2016). Por meio da análise transcriptômica em larga escala (RNA-seq), usando uma linhagem de *N. crassa* nocauteada

no gene *seb-1*, foi possível observar que os genes regulados na situação de estresse térmico (quando o fungo é transferido de 30°C para 45°C) encontram-se conectados com genes envolvidos em outras formas de estresse, mostrando que o *regulon seb-1* de *N. crassa* é bastante complexo. Genes codificando proteínas histonas, por exemplo, encontraram-se reprimidos na condição de estresse térmico na linhagem mutante, enquanto genes envolvidos na modificação de proteínas histonas como as histonas deacetilases e histonas acetiltransferases encontraram-se ativados (FREITAS ET AL., 2016). Dentre os vários genes reprimidos pelo choque térmico, identificados na análise do *regulon seb-1*, novamente foi encontrada a ORF NCU06679. Este resultado foi bastante interessante porque esta ORF já havia sido identificada como sendo uma proteína ligada à região do DNA do promotor *gsn* contendo o elemento STRE durante o choque térmico (FREITAS ET AL., 2008).

Tabela 1. Identificação das proteínas putativas que se ligam ao *gsn* por elementos de DNA STRE.

Identified protein ^{b)}	Protein score	Sequence coverage (%)	No. of matched peptides	Theoretical pI/MM (Da)	MIT Acc. No. (UniProtKB/TrEMBL)
Hypothetical protein similar to DnaJ and TPR domain protein	59	13	3	8.03/56 084	NCU02424.3 (Q7S4D5)
Hypothetical protein (related to translation initiation factor 3)	784	27	24	4.92/39 727	NCU01021.3 (Q9P748)
Conserved hypothetical protein (eukaryotic initiation factor 3i)	134	30	8	6.19/38 887	NCU03876.3 (Q7RXH4)
Hypothetical protein similar to AAA family ATPase pontin	129	11	3	5.69/50 179	NCU03482.3 (Q8WZS3)
Hypothetical protein (chromatin assembly 3 gene or <i>cac-3</i> ; homolog of yeast <i>Cac3</i>)	46	5	1	5.33/63 578	NCU06679.3 (Q7S7N3)

a) Proteins were analyzed by MALDI-TOF/TOF. Monoisotopic peaks were searched against two *N. crassa* protein databases (MIT and MIPS) with a maximum of one missed trypsin cleavage and a mass tolerance of 1.0 Da for precursor ions and 0.5 Da for product ions. Databases were searched by using the MASCOT database tool, located at the Matrix Science website (www.matrixscience.com). Significant threshold was $p < 0.05$.

b) According to MIT (<http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/neurospora/Home.html>) database.

Fonte: FREITAS ET AL., 2008.

Uma busca por ortólogos funcionais da ORF06679 revelou que este gene codifica uma proteína bastante conservada em diferentes organismos, apresentando uma identidade de 50% com a proteína RBBP4 (*histone-binding protein isoform a*; PDB 3CFS) de *Homo sapiens* e 45% com a proteína NURF55 (p55) (*chromatin assembly factor 1 subunit isoform B*; PDB 2YBA) de *Drosophila melanogaster*.

A proteína NURF55 pode ser encontrada em complexos proteicos envolvidos em eventos de remodelagem de cromatina distintos, tais como HAT1 (*histone acetyltransferase 1*), HDAC1 (*histone deacetylase*) e CAF-1 (*chromatin assembly factor-1*) (PARTHUN ET AL.,

1996, TAUNTON ET AL., 1996). Além disso, essa proteína também atua como um componente facilitador da ligação do complexo proteico repressor PRC2 (*Polycomb repressive complex 2*) aos nucleossomos, especificamente em regiões assinaladas para eventos de trimetilação de resíduos de Lys (JAMIESON ET AL., 2013). O complexo PRC2 é formado por um conjunto de proteínas bastante conservado nos eucariotos superiores ao longo da evolução. Sua formação se dá pela multimerização de proteínas do tipo *Polycomb*, cuja principal função é manter um padrão de expressão gênica pré-determinado em um dado organismo vivo, através da regulação da estrutura da cromatina. As proteínas do tipo *Polycomb* reconhecem, estabelecem e mantêm a trimetilação do resíduo de lisina 27 (K27) da histona H3 (H3K27me3). A composição proteica do complexo PRC2 envolve quatro proteínas centrais conservadas e várias proteínas acessórias, que parecem variar de acordo com o processo celular envolvido. No entanto, independente das proteínas acessórias encontradas associadas às 4 proteínas principais, a atividade catalítica do complexo sempre resulta na metilação do resíduo de Lys27 da histona H3 (MARGUERON E REINBERG, 2011).

As modificações pós-traducionais de proteínas histonas regulam processos biológicos ou por enfraquecer a interação DNA-histona e causar alterações na estrutura da cromatina, ou por contribuir para o recrutamento de outras proteínas regulatórias ao local marcado pela modificação, tal como ocorre para a marca H3K27me3 (trimetilação do resíduo de lisina 27 da histona H3). A trimetilação de resíduos de Lys, especificamente, dos resíduos Lys9 (H3K9me3) e Lys27 da histona H3 (H3K27me3), são consideradas marcas epigenéticas repressivas, amplamente distribuídas nos genomas dos organismos vivos, de maneira não superponível e suas localizações variam muito nos diferentes genomas (MÜLLER J, ET AL., 2002; LI ET AL., 2007; KIRMIZIS ET AL., 2004; BEISEL & PARO, 2011; KUZMICHEV ET AL., 2002). Enquanto em *Drosophila* e mamíferos estas marcas podem ser encontradas tanto em regiões regulatórias (regiões flangeadoras dos genes) quanto em regiões transcritas (regiões codificadoras dos genes) (PAULER ET AL., 2009; SCHWARTZ ET AL., 2006), em *Arabidopsis* estes sinais são encontrados principalmente nas regiões transcritas (regiões codificadoras dos genes), indicando mecanismos de controle epigenéticos distintos para plantas e animais (ZHANG ET AL., 2007). Nos eucariotos inferiores, enquanto *S. cerevisiae* não possui nenhuma destas marcas de silenciamento epigenético, *S. pombe* apresenta apenas o silenciamento mediado por H3K9me3 (LACHNER ET AL., 2004). A marca H3K27me3 também pode silenciar a expressão gênica regulando indiretamente a transcrição, impedindo estericamente que proteínas se liguem à cromatina e pausando a atividade RNA pol II nos promotores de genes controlados pelos complexos PRC2 (BARSKI ET AL., 2007; MIKKELSEN ET AL., 2007). Em *Drosophila* e mamíferos vários genes controlados por proteínas do tipo *Polycomb* são capazes de recrutar a RNA Pol II holoenzima para seus respectivos promotores para iniciar a transcrição e mantê-la pausada pela trimetilação,

sugerindo um controle de expressão gênica na fase de iniciação do processo de transcrição (STOCK ET AL., 2007; ZHAO ET AL., 2007; KANHERE ET AL., 2010).

Em *N. crassa*, assim como nos eucariotos superiores, a H3K9me3 está associada à heterocromatina constitutiva e neste fungo é encontrada principalmente associada às regiões centroméricas (TAMARU ET AL., 2003; LEWIS ET AL., 2009; HONDA & SELKER, 2008) e às regiões teloméricas (SMITH ET AL., 2008). Já a marca epigenética H3K27me3 está associada à heterocromatina facultativa e pode ser encontrado em regiões ricas em genes que são transcritos (JAMIESON ET AL., 2013). O complexo PRC2 de *N. crassa*, responsável pela trimetilação do sinal H3K27me3, é formado pelas proteínas SET-7, EED, SU(Z)12 e NPF (*Neurospora protein 55*, codificada pela ORF NCU06679), sendo que apenas as 3 primeiras contribuem de maneira direta com a atividade catalítica do complexo, enquanto que a proteína NPF é essencial para a trimetilação de apenas um pequeno conjunto de genes (6,8% das sequências codificadoras do genoma do fungo), localizados preferencialmente próximos às regiões teloméricas (JAMIESON ET AL., 2013). JAMIESON ET AL. (2013) mostraram que os genes marcados pelo sinal H3K27me3 não estão conservados entre as diferentes espécies, sendo que muitos deles são encontrados somente em fungos, mais especificamente, na classe *Sordariaceae* e o gênero *Neurospora*, como se estivessem servindo de mecanismo de silenciamento genético para novos genes incorporados a um genoma.

Durante a análise do regulon SEB-1, dentre os vários genes reprimidos pelo choque térmico, identificamos novamente a ORF NCU06679, mostrando que a expressão desta proteína também é modulada por aumento de temperatura, uma condição ambiental frequentemente encontrada na natureza pelos fungos (FREITAS ET AL., 2016). Além disso, assim como a proteína SEB-1, a proteína NPF também participa de eventos de repressão gênica e neste caso, atuando especificamente em eventos de remodelagem de cromatina. O projeto proposto teve como finalidade iniciar os estudos de caracterização molecular da proteína NPF, a fim de estabelecer uma possível correlação entre os eventos repressores provenientes da remodelagem de cromatina com as respostas adaptativas que o fungo desenvolve frente às condições ambientais adversas, de maneira dependente de STRE.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAL E ESPECIFICOS

O presente projeto teve como objetivo principal identificar e estudar proteínas provavelmente envolvidas na resposta celular que o fungo *N. crassa* desenvolve frente a condições ambientais adversas, a fim de elucidar em parte, os principais mecanismos responsáveis pelos eventos de adaptação do fungo em diferentes condições estressantes. Embora grandes avanços tenham sido feitos neste sentido, muitas lacunas sobre os mecanismos adaptativos de resposta a estresse desenvolvidos pelos fungos ainda necessitam ser elucidados, principalmente para os ascomicetos. Os estudos de regulação de expressão gênica que vem sendo realizados em nosso laboratório, utilizando *N. crassa* como modelo, já evidenciaram várias proteínas participando efetivamente da rede de controle transcricional de genes responsivos a diferentes formas de estresse ambiental, proporcionando a abertura de um leque de opções para se estudar proteínas potencialmente envolvidas em diferentes eventos/tipos de regulação da expressão gênica, tais como o fator de transcrição SEB-1 (FREITAS ET AL. 2016) e as proteínas RVB-1 (NUC3482, Tabela 1) e NPF (NCU0669; Tabela 1) (FREITAS ET. AL 2008).

Neste trabalho, iniciamos os estudos de caracterização da proteína NPF, uma proteína isolada em nosso laboratório, que participa da modulação negativa da expressão do gene *gsn* de *N. crassa* de maneira dependente de STRE na situação de estresse térmico e que se encontra envolvida em eventos de remodelagem de cromatina. Para atender especificamente ao nosso objetivo principal, durante o desenvolvimento do projeto, foram realizados os seguintes estudos:

1) Demonstração do envolvimento da proteína NPF na resposta celular de *N. crassa* frente a diferentes estímulos estressantes. Para isto, uma linhagem mutante do fungo, individualmente nocauteada no gene *npf*, foi cultivada em diferentes condições estressantes (aumento de temperatura, choque osmótico, estresse oxidativo e cálcio), tendo como *background* o cultivo da respectiva linhagem selvagem parental da linhagem mutante e da linhagem mutante complementada, nas mesmas condições. O nocaute da linhagem mutante foi confirmado por PCR, utilizando DNAg do fungo e primers específicos para o gene *npf*. Análises morfológicas e fenotípicas das linhagens mutante, selvagem e complementada foram realizadas (crescimento vegetativo, extremidades das hifas basais, taxa de crescimento basal, produção de carotenoides e de esporos e acúmulo de glicogênio). O acúmulo de glicogênio das linhagens mutante, selvagem e complementada, submetidas ao choque térmico também foi determinado, pois uma vez que a proteína NPF foi isolada interagindo com o promotor *gsn* durante o estresse térmico, esta característica fenotípica seria importante para validar os resultados encontrados para esta forma de estresse. A linhagem complementada foi usada

para validar os fenótipos obtidos para a linhagem mutante nos diferentes ensaios, uma vez que a inserção de uma cópia do gene *npf* na linhagem mutante permite demonstrar a recuperação do fenótipo selvagem para esta linhagem.

2) Determinação da localização subcelular da proteína NPF em condições ambientais adversas. Para esta etapa, a linhagem nocauteada foi complementada com uma construção plasmidial existente no laboratório (pTSL91A-*npf*), onde o gene *npf* se encontra sob o controle de um promotor constitutivo (promotor *ccg-1*) e *in frame* ao gene que codifica para uma versão especial da proteína verde fluorescente (*sfGFP*). A linhagem complementada permitiu validar os resultados morfológicos e fenotípicos encontrados para a linhagem mutante *background* (recuperação do fenótipo selvagem) e ainda possibilitou iniciarmos os estudos de localização celular da proteína de fusão fluorescente NPF-*sfGFP* na condição de estresse térmico, por microscopia de fluorescência.

MATERIAIS E MÉTODOS

As técnicas moleculares utilizadas, tais como a amplificação de fragmentos de DNA por PCR, preparação e extração de DNA plasmidial, digestão com enzimas de restrição, preparo de células competentes e transformação de *E. coli*, cruzamento e transformação de *N. crassa*, são metodologias de uso rotineiro no laboratório, que seguem os procedimentos recomendados por Sambrook e Russell (2001) e artigos específicos da área.

1. LINHAGENS DE *N. crassa*

- FGSC 02489 (A) – linhagem selvagem (**WT**, *wild type*) usada como *background* dos experimentos (COLOT ET AL., 2006).
- FGSC 13915 (*a*, Δnpf , homocário) – linhagem nocauteada na ORF NCU06679 pela inserção do gene de higromicina (*npf::hyg*). O nocaute gênico foi feito por recombinação homóloga (COLOT ET AL., 2006).
- FGSC 6103 (*A*, $-his3$) – linhagem cujo gene *-his3*, que codifica a enzima histidinol desidrogenase, apresenta uma mutação que torna defectiva a biossíntese do aminoácido histidina, conferindo à mesma auxotrofia para este aminoácido (adquiridas junto ao Fungal Genetics Stock Center)
- FGSC 13915 complementada (*a*, $\Delta npf::npf$, *mus-51 npf::hyg -his3::npf-6xGly-sfgfp*, homocário) – linhagem nocauteada na ORF NCU06679, pela inserção do gene de higromicina (*npf::hyg*), complementada com a proteína fluorescente NPF-sfGFP no *locus* $-his3$ ($\Delta npf::npf$). Linhagem obtida após a transformação da linhagem duplo-mutante (*a*, *mus-51 -his3* Δnpf) (FARIA, 2018) com a construção plasmidial pTSL91A-*npf* (FARIA, 2018)

2. MEIOS DE CULTIVO

2.1. Manutenção e cultivo do fungo

- **Meio Mínimo de Vogel** (VM; VOGEL, 1956)

Sais de Vogel 1x; sacarose 2% (w/v); ágar 2% (w/v) (para meio sólido), pH 5,8. Armazenar a 4°C.

Para garantir a manifestação do fenótipo mutante nos casos onde se fez necessário, o meio VM foi adicionado de higromicina (200 µg /mL). Para os ensaios de complementação da linhagem duplo-mutante, o meio VM foi adicionado de higromicina e/ou histidina (25 mg/mL). Para o experimento de choque térmico em meio VM líquido, a concentração de sacarose foi reduzida de 2% (concentração inicial, quando as células foram inoculadas no meio fresco) para 0,5% no frasco incubado a 45°C, com a finalidade de isolar o estresse térmico e evitar um choque osmótico concomitante, uma vez que após 24 h de cultivo em

meio VM contendo 2% de sacarose a concentração residual de sacarose no meio de cultivo é ao redor de 0,5%.

Sais de Vogel 50x: Citrato de sódio.2H₂O 0,5 M; KH₂PO₄ anidro 1,85 M; NH₄NO₃ anidro 1,25 M; MgSO₄.7H₂O 0,08 M; CaCl₂.2H₂O 0,03 M; 5 mL biotina (0,5 mg/mL em etanol 50% v/v); 5 mL de elementos traços; 2 mL clorofórmio

Solução de Elementos Traços: Ácido cítrico.H₂O 0,5 M; ZnSO₄.7H₂O 0,4 M; Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O 0,05 M; CuSO₄.5H₂O 0,02 M; MnSO₄.H₂O 0,006 M; H₃BO₃ anidro 0,02 M; Na₂MoO₄.2H₂O 0,004 M; 2 mL de clorofórmio

- **Meio Synthetic Cross medium** (WESTERGAARD; MITCHELL, 1947).

Meio SC na concentração 0,1x e 0,5x, acrescido de 0,5 % sacarose, 1 mM iodoacetato de sódio (EBBOLE; SACHS,1990) e 2 % de ágar (w/v).

Solução estoque 2x: 2 g KNO₃; 1,4 g K₂HPO₄; 1 g KH₂PO₄; 0,2 g NaCl; 1 g MgSO₄.7H₂O; 0,2 g CaCl₂.2H₂O; 0,1 mL de solução estoque de biotina (0,1 mg/ mL) e 0,2 mL de solução estoque de elementos traços. Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 1L com água destilada, 667 µL de clorofórmio foram adicionados como agente conservante, e a solução foi armazenada a 4°C. Meio quimicamente definido, pH 6,5.

- **Meio FGS 10x** (Frutose-Glicose-Sorbose) (MISHRA E TATUM, 1972)

0,05 % frutose, 0,05 % glicose e 2 % sorbose. Possibilita o crescimento colonial do fungo em placas de Petri.

A morfologia de *Neurospora crassa* é determinada pela sua rígida parede celular. Mishra e Tatum demonstraram que a morfologia colonial induzida por sorbose em *Neurospora* é de fato, acompanhada por uma mudança na composição química da parede celular. Estudos subsequentes estabeleceram uma diminuição acentuada de B-1,3-glucana na concentração da parede celular, na presença de sorbose (MISHRA E TATUM, 1972).

- **Meios utilizados para cruzamento de *N. crassa***

Top agarose: 1,5% agarose; 2 M Sorbitol e 2x FGS

Bottom ágar: 1x VM; 1,5% agar; 1x FGS e 2 M sorbitol

- **Meio para indução de microconidiação de *N. crassa***

Meio SC 0,1x e 0,5x, suplementado com 0,1 mM de iodoacetato de sódio; 0,5% sacarose e 2% ágar (w/v). Meio utilizado para purificação de homocário (EBBOLE E SACHS, 1990).

3. SOLUÇÕES E TAMPÕES

- **Extração de DNA genômico de *N. crassa***

Tampão de Lise: 200 mM Tris-HCl pH 8,0; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 1 % SDS

- **Tampão TAE 1x** (para análise de DNA por eletroforese em gel de agarose)

Tris 0,04 M, EDTA 50,0 mM, ácido acético glacial 1 M; pH 8,0

- **Determinação do conteúdo de glicogênio de *N. crassa***

Tampão de extração: 50mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM NaF; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM benzamidina; 2 mM TLCK; 1 mM DTT; 1 mM PMSF, aprotinina e pepstatina A (1ug/mL cada)

Tampão acetato: 50 mM acetato de sódio pH 5,2; 5 mM CaCl₂. Tampão utilizado para o preparo da solução de glicogênio da curva analítica e preparo das enzimas amiloglicosidase (30 mg/mL) e α -amilase 10 mg/mL

- **Determinação da localização subcelular da proteína de fusão NPF-sfGFP**

Tampão de fixação: solução 3,7% formaldeído em tampão PBS 1x pH 7,0 contendo 0,2% Tween 80 (v/v).

Tampão PBS 1x: diluição da solução pronta PBS 10x

4. REAGENTES

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e fornecidos pela Sigma, Merck e JT. Baker. As endonucleases de restrição, assim como as demais enzimas modificadoras, foram fornecidas pela NEBiolabs, GE HealthCare ou Thermo Scientific.

5. METODOLOGIAS

5.1. Manutenção das linhagens e condições de cultivo para as análises fenotípicas e ensaios de estresse em placas

Para obtenção de conídios, as diferentes linhagens do fungo foram cultivadas em meio VM sólido suplementado com sacarose como fonte de carbono e adicionado de higromicina quando necessário. Para isto, *Erlenmeyers* contendo meio VM sólido foram inoculados com conídios das diferentes linhagens e incubados a 30°C em BOD durante 3 dias, na ausência de luz. Após este período as linhagens foram expostas à luz e à temperatura ambiente por 7 dias para estimular a conidiação. Após 10 dias de cultivo, os conídios das diferentes culturas

foram suspensos em água destilada estéril gelada, filtrados em gaze estéril e recolhidos a 4.000 rpm/4°C/4 min. Os sedimentos celulares foram suspensos em 10 a 20 mL de água gelada estéril e o número de conídios total das suspensões foi determinado em câmara de Neubauer. As suspensões conidiais foram mantidas em geladeira em condições estéreis, para serem usadas nos demais experimentos e renovadas a cada 2 semanas.

Para as **análises morfológicas em placas**, 10 uL de uma suspensão contendo 2×10^4 conídios/mL foram inoculados meio VM sólido acrescido de sacarose como fonte de carbono no centro de placas de Petri e cultivados em BOD a 30°C durante 48 h. Para as **análises morfológicas em frascos**, *Erlenmeyers* contendo meio VM sólido acrescido de sacarose foram inoculados com 10 uL de uma suspensão contendo 2×10^4 conídios/mL e cultivados durante 3 dias em BOD, seguido de 7 dias em condições de luminosidade e temperatura ambiente.

Os experimentos de estresse em placa foram realizados conforme descrito por Freitas et al. (2016). Para isto, 10 uL de uma suspensão contendo 2×10^4 conídios/mL das linhagens selvagem, mutante e complementada foram inoculados no centro de placas de Petri contendo meio VM sólido, acrescido de sacarose e agentes estressantes (quando necessário) e cultivados por até 48 h a 30°C em BOD e os crescimentos radiais foram avaliados. Foram testados os seguintes agentes estressantes: variações de temperatura (estresse térmico), variações de osmolaridade (estresse osmótico), variações de pH (estresse de pH), indutores de espécies oxigênio reativas (EROs) (estresse oxidativo) e cálcio (estresse de retículo). Para analisar o **estresse térmico**, as células inoculadas em meio VM foram cultivadas a 45°C e seus crescimentos radiais foram observados após 24 h. Em seguida, as culturas foram transferidas para 30°C (temperatura normal de crescimento vegetativo do fungo) e mantidas nesta condição por mais 24 h, para avaliar a formação das colônias. Para o **estresse osmótico**, células foram cultivadas a 30°C em BOD em placas contendo meio VM sólido acrescido de sacarose e concentrações crescentes de sorbitol (0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 M) ou NaCl (0,1; 0,3; 0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 M) e seus crescimentos radiais foram observados após 24 e 48 h de cultivo. Para o estresse de pH, placas contendo meio VM em diferentes concentrações hidrogeniônicas foram preparadas (pH 4,2; pH 7,2; pH 7,8) e usadas para cultivar células de *N. crassa* a 30°C em BOD e seus crescimentos radiais foram observados após 24 e 48 h de cultivo. Para o estresse oxidativo, conídios foram cultivados a 30°C em BOD, em placas de Petri contendo concentrações crescentes de paraquat (25; 50; 100; 200; 300 e 500 µM), menadiona (10; 25; 50; 100; 250 e 500 µM) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (2; 5; 7; 10 e 20 mM) e seus crescimentos radiais foram observados após 24 e 48 h de cultivo. Para o **estresse com cálcio** 10 uL das suspensões conidiais foram inoculadas em placas de Petri contendo meio VM acrescido de concentrações crescentes de Ca⁺² (0,15; 0,3; 0,5; 0,7 e 1M) e seus crescimentos radiais foram observados após 24 e 48 h de cultivo. As placas foram

incubadas a 30°C em BOD e seus crescimentos radiais foram observados após 24 e 48 h de cultivo.

A **taxa de extensão apical das hifas apicais** foi determinada em *race tubes* e medidas do crescimento das hifas basais foram realizadas a cada 12 h, até que uma das linhagens atingisse a outra extremidade do tubo, conforme descrito em Dvash et al. (2010). Para isto, tubos de vidro de 40 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro, apresentando extremidades curvadas em um ângulo de 45° (*race tubes*) foram preenchidos com 15 mL de meio 2% sacarose VM sólido e inoculados em uma de suas extremidades com 10 µL de uma suspensão contendo 10⁶ conídios/mL das linhagens selvagem, mutante e complementada. Os tubos foram incubados sob luz constante durante uma noite para zerar o relógio biológico do fungo. No dia seguinte, as frentes das hifas foram marcadas no tubo com caneta permanente e denominadas como ponto de partida (t=0). Dando sequência, as culturas foram incubadas em condições de escuro total em incubadoras apropriadas (I-30BLL, Percival Scientific Inc) e medidas do crescimento das extremidades das hifas em centímetros foram realizadas a cada 12 h sob luz infravermelha, até que uma das linhagens atingisse outra extremidade do tubo primeiro, sendo considerado este o ponto final das leituras das taxas de crescimentos para todos os demais tubos. As distâncias percorridas pelas hifas foram determinadas pela medida do espaço entre as frentes das hifas. a fim de verificar linearidade da taxa de crescimento das linhagens, a qual foi dada em cm/dia (DVASH ET AL., 2010).

Todas as análises fenotípicas descritas foram realizadas com pelo menos três experimentos biológicos independentes e em triplicatas experimentais.

5.2. Confirmação do nocaute gênico e da complementação da linhagem mutante

Para a confirmação do nocaute da ORF NCU06679 no genoma da linhagem FGSC 13915 (a, *Δnpf*, homocário) e confirmar a complementação da linhagem duplo-mutante (a, *mus-51 -his3 Δnpf::npf*), reações de amplificação por PCR foram feitas utilizando-se como molde amostras de DNAg extraídas das linhagens de interesse e como controle, o DNA genômico da linhagem selvagem (FGSC 02489).

5.2.1. Extração do DNA genômico de *N. crassa*

Amostras de DNA genômico das linhagens selvagem, mutante e complementada foram preparadas, a fim de confirmar o nocaute da linhagem mutante usada neste trabalho e também a sua complementação para ensaios de localização subcelular e recuperação de fenótipo selvagem. Para isto, culturas liquidas de ambas as linhagens foram preparadas inoculando-se 2 x 10⁸ células/mL de conídios em 50 mL de meio VM líquido e as culturas foram incubadas a 30°C/24 h a 250 rpm. Em seguida, os micélios foram isolados por filtração e pulverizados em almofariz de porcelana, na presença de nitrogênio líquido até a obtenção

de um pó bem fino. Os micélios pulverizados foram transferidos para Eppendorf contendo 500 μ L de tampão de lise gelado e homogeneizados em vórtex. Em seguida, foram adicionados 500 μ L de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), a suspensão foi novamente homogeneizada e centrifugada a 14.000 rpm/10 min/4°C para remoção dos debris celulares. Os sobrenadantes foram transferidos para tubos Eppendorf limpos, os ácidos nucleicos foram precipitados com a adição de 50 μ L de uma solução 3 M acetato de sódio pH 5,2 e 950 μ L de isopropanol a -80°C/15 min e recolhidos por centrifugação 14.000 rpm/4°C/10 min. Os precipitados isolados foram solubilizados em 100 μ L de uma solução tampão 10 mM TE e digeridos com 2 μ L de uma solução 10 mg/mL RNaseA a 37°C/1 h para remoção dos nucleotídeos de RNA. Após a digestão, foi realizada uma nova extração com 200 μ L da solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico para remoção das proteínas remanescentes, a fase aquosa foi isolada a 14.000 rpm/10 min/4°C e transferida para tubo Eppendorf limpo e o DNAg foi precipitado com a adição de 100 μ L de uma solução 7,5 M acetato de amônio e 750 μ L de etanol absoluto gelado a -80°C/15 min. Novamente o precipitado foi recolhido por centrifugação (14.000 rpm/4°C/15 min), lavado duas vezes com 700 μ L de uma solução 70% etanol gelada (14.000 rpm/4°C/5min), seco ao ar e solubilizado em água estéril. A integridade das amostras de DNAg foram verificadas por eletroforese em gel de agarose e as concentrações das soluções foram determinadas por absorbância em espectrofotômetro, em um comprimento de onda UV de 260 nm.

5.2.2. Amplificação do gene *npf*

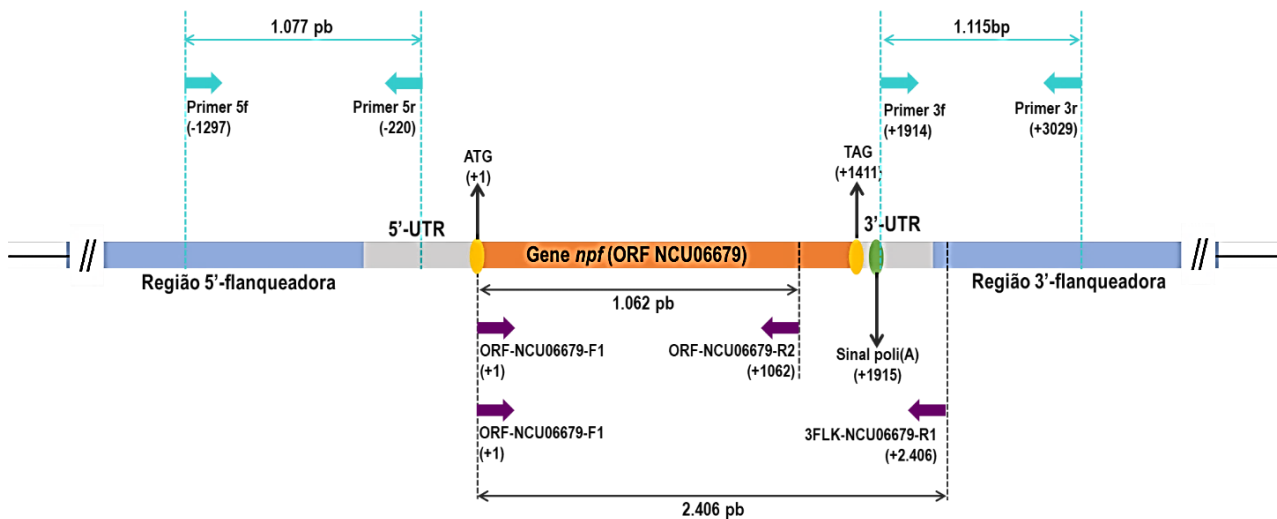
Tanto o nocaute da linhagem Δnpf quanto a complementação da linhagem duplo-mutante ($\Delta npf::npf$), construída neste trabalho, foram confirmados por reação de polimerização em cadeia (PCR), usando amostras de DNAg extraídas a partir de micélios das linhagens selvagem, mutante e complementada, utilizando-se pares de oligonucleotídeos primers específicos, desenhados para anelar dentro e fora da região codificadora do gene *npf*. As sequências dos primers, bem como suas posições e os tamanhos de fragmentos de DNA amplificados a partir das diferentes combinações, encontram-se descritos, respectivamente, na Tabela 2 e Figura 5.

Para a amplificação dos fragmentos de DNA alvos, foi utilizado como molde em cada reação de amplificação 1 μ L de cada uma das soluções DNAg (1 μ g/ μ L). Em seguida, conforme instruções do fabricante, foram adicionados a cada reação 10 μ L de *Phusion master mix* 2x (Thermo Scientific), 1 μ L de cada um dos oligonucleotídeos F e R nas concentrações de 100 pmol/ μ L cada, em um volume final de 20 μ L de reação. A mistura foi homogeneizada e submetida à PCR em um termociclador (Applied Biosystems) e os fragmentos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x contendo *SyberSafe* (1 μ L/mL; Invitrogen), a 100 V por aproximadamente 45 minutos.

Tabela 2. Sequência dos oligonucleotídeos primers usados nas reações de PCR para a confirmação do nocaute do gene *npf* na linhagem FGSC 13915 e da presença do gene *npf* na linhagem complementada (*Δnpf::npf*).

Primer	Sequência	Posição*
ORF-NCU06679-F1	5'-GATGGCGCGCGACGAGAT-3'	+1
ORF-NCU06679-R2	5'-GGCCCTCCAAGGTGTGAA-3'	+1.062
3-FLK-NCU06679-R1	5'-GGGCTCAGTGAATGGACC-3'	+2.406

*A posição do primer considera como nucleotídeo +1 o resíduo de adenina (A) do códon de início da tradução ATG do gene *npf*



Fonte: autoria própria.

Figura 5. Posição genômica dos primers usados pelo FGSC para a construção da linhagem nocauteada no gene *npf*, e dos primers usados neste trabalho para a confirmação do nocaute e para a confirmação da complementação da linhagem mutante. Os pares de primers flanqueando a região codificadora do gene *npf* que foram usados para realizar o nocaute gênico por recombinação homóloga, conforme descrito na página do FGSC para a confecção das linhagens mutantes por eles disponibilizadas, estão representados na figura em verde-água na figura e devidamente posicionados (Primer 5f vs. Primer 5r; Primer 3f vs. Primer 3r), assim como os tamanhos dos fragmentos de DNA por eles amplificados. Os pares de primers desenhados neste trabalho, para checar o nocaute gênico e também a complementação da linhagem recuperada, estão representados em roxo na figura e devidamente posicionados, assim como os tamanhos dos fragmentos de DNA por eles amplificados. **ORF NCU06679-F1 vs. ORF NCU06679-R2:** 1.062bp. **ORF NCU06679-F1 vs. ORF NCU06679-R1:** 2.406 bp.

5.3. Ensaios de choque térmico em meio líquido

Para os experimentos de choque térmico, suspensões de conídios das linhagens selvagem, mutante e complementada contendo aproximadamente 10^8 células/mL foram inoculadas em 50 mL de meio VM líquido acrescido de sacarose 2% e incubadas a 30°C/ 250 rpm por 24 h. Após esse período, os micélios foram coletados por filtração a vácuo e as amostras foram rapidamente divididas em duas partes. Uma das partes foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostras não submetidas ao choque térmico; amostras controle, ZERO) e a outra parte foi transferida para um frasco contendo meio VM líquido fresco, pré-aquecido a 45°C, e incubado nesta temperatura a 250 rpm, durante 30 min (amostras submetidas ao choque térmico, HS). Após o choque térmico, as amostras foram coletadas por filtração, rapidamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C. Os experimentos foram realizados em triplicata biológica e experimental.

5.4. Preparo de extratos celulares e determinação do conteúdo de glicogênio

O conteúdo de glicogênio foi determinado nas células da linhagem selvagem, mutante nocauteada e mutante complementada do fungo, submetidas ou não ao choque térmico (amostras ZERO e HS), através da digestão do glicogênio com amiloglicosidase após precipitação com etanol, de acordo com protocolo descrito por Hardy & Roach (1993).

Para isto, micélio de cada uma das amostras foi pulverizado em gral de porcelana com nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em tampão de extração gelado recém preparado, as frações solúveis contendo os extratos proteicos foram isoladas por centrifugação a 7.000 xg /4°C/15 min e as proteínas totais foram determinadas por Hartree (1972), utilizando BSA como padrão. As proteínas contidas em 100 µL de cada uma das amostras foram precipitadas com 25 µL de uma solução 50% TCA a 10.000 xg /4°C/15 min. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, adicionados de 4 volumes de etanol absoluto gelado e incubados durante 30 min a -80°C. O glicogênio contido nas amostras foi recolhido por centrifugação a 20.000 xg /4°C/15 min, os precipitados foram suspensos em 400 µL de uma solução tampão de digestão contendo 1 µL de cada uma das enzimas amiloglicosidase (30 mg/mL) e α -amilase (10 mg/mL) e incubados a 37°C durante 12 h. Um volume de 25 µL de cada uma das amostras digeridas foi utilizado para a determinação do conteúdo de glicose livre, utilizando o kit GLICOSE Liquiform (Labtest) conforme instruções do fabricante e o conteúdo de glicogênio foi expresso em µg glicogênio/mg de proteínas totais. A curva padrão de glicogênio foi determinada a partir de uma solução 10 mg/mL de glicogênio (Sigma), preparada em tampão acetato e processada como as amostras.

5.5. Construção da linhagem homocário de *N. crassa* FGSC 13915 complementada ($\Delta npf::npf$) expressando a proteína NPF-GFP

Para a complementação da linhagem mutante Δnpf , uma linhagem duplo-mutante Δnpf -*his3* foi inicialmente construída em nosso laboratório, por uma aluna de iniciação científica (FARIA, 2018), a partir do cruzamento entre as cepas FGSC #13915 (**a**, Δnpf) e FGSC #6103 (**A**, -*his3*). Quando complementada, esta linhagem permitiu a expressão constitutiva da proteína de fusão NPF-GFP

5.5.1. Seleção do duplo-mutante e transformação

Para prosseguir com a complementação, ascósporos segregantes carregando a dupla mutação Δnpf -*his3* foram coletados com água, a partir de uma placa de Petri contendo o cruzamento das linhagens progenitoras, ativados por 1h / 60°C e incubados em meio VM contendo FGS 1x (para permitir o crescimento colonial do fungo e a seleção individual dos segregantes carregando a dupla-mutação) e na presença de higromicina e histidina para selecionar clones com resistência à higromicina (sinaliza a presença da mutação Δnpf) e auxotróficos para histidina (sinaliza a presença da mutação -*his3*).

O duplo mutante Δnpf -*his3* isolado foi então transformado por eletroporação, com a construção plasmidial pTSL91A-ccg1-6679 (FARIA, 2018), a qual permite a integração do gene *nfp* no locus *his3* por recombinação e a complementação da marca de auxotrofia para histidina (AHMED; CASE; GILES, 1964). Para isto, conídios recém coletados da linhagem duplo mutante isolada foram lavados 3x com uma solução 1 M de sorbitol estéril e misturados a 3 μ L da construção plasmidial (1 μ g/ μ L). A mistura foi então transferida para uma cubeta de eletroporação estéril e a mistura foi submetida a uma corrente elétrica em um eletroporador (GenePulser II, BioRad), utilizando os seguintes parâmetros: 2000 V, 25 μ F e 300 Ω . Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL da solução 1 M de sorbitol gelada foi adicionada a mistura, a suspensão foi então adicionada a 10 mL de *top agarose* mantido no estado liquefeito a 42°C, homogeneizada e vertida na superfície de placas de Petri contendo *bottom agar* na presença de higromicina. As placas foram mantidas a 30°C por 2 dias e os transformantes germinados foram coletados em condições assépticas e inoculados em meio VM sólido acrescido ou não com histidina para seleção. Apenas os transformantes resistentes à higromicina e capazes de crescer na ausência de histidina foram selecionados. A linhagem *npf::hyg* -*his3::npf*-6xGly-*sfgfp* resultante deste cruzamento foi denominada $\Delta npf::npf$.

5.5.2. Purificação de homocário da linhagem complementada

Como a linhagem complementada foi obtida no laboratório por eletroporação, é possível que heterocários exibindo fenótipo selvagem tenham sido isolados após a transformação da linhagem duplo-mutante, logo os transformantes selecionados na presença de higromicina e ausência de histidina passaram por uma etapa de purificação de homocários.

N. crassa é um fungo filamentosso heterotrófico de nutrição simples e se desenvolve bem em meios de cultura contendo apenas alguns sais e uma fonte de carbono, sendo sua única exigência nutricional a biotina (DAVIS & SERRES, 1970). Quando cultivado em condições adequadas de nitrogênio, é possível observarmos as estruturas de propagação assexuadas – os conídios. Estes conídios podem ser produzidos por duas vias distintas, a macroconidiação e a microconidiação. Ambas as vias requerem interface água-ar e são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos, as quais se encontram localizadas nas extremidades das hifas aéreas e permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Na microconidiação, os esporos na sua maioria mononucleados são formados dentro das hifas vegetativas basais em resposta à privação de nutrientes e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa (PERKINS ET AL., 1976). Logo, a carência nutricional é um estímulo estressante suficiente para induzir a produção de microconídios em *N. crassa*.

Para a obtenção de microconídios e purificação de transformantes homocário, os transformantes candidatos a serem $\Delta npf::npf$ foram rejuvenescidos em meio VM acrescido de sacarose 2% e higromicina para a obtenção de conídios. O rejuvenescimento na presença de higromicina foi importante para que pelo menos parte dos conídios manifestassem o fenótipo mutante Δnpf . Após 10 dias, os conídios maduros foram coletados, contados e 2×10^4 células foram inoculadas no centro de placas de Petri contendo meio indutor de microconidiação contendo 2% de ágar; 0,5% de sacarose, 0,1 M iodoacetato de sódio e meio SC 0,1x ou 0,5x. As culturas foram incubadas a 30°C por 3 dias e em luz ambiente por mais 7 dias. Os microconídios produzidos foram coletados com 10 mL de água estéril gelada e isolados por filtração em filtro Millex SV 5 μ m (Millipore) (EBBOLE E SACHS, 1990).

Para a seleção dos homocários, os microconídios isolados foram germinados em placas de Petri contendo meio VM sólido acrescido de FGS 1x e higromicina a 30°C por 2-3 dias. Os homocários selecionados foram transferidos para tubos contendo VM acrescido de sacarose 2% e higromicina e após 3 dias/30°C, amostras de DNAg foram preparadas a partir das culturas candidatas e analisadas por PCR utilizando pares de *primers* específicos conforme as Tabelas 2 e 3, buscando amplificar o gene *npf*.

5.6. Determinação da localização subcelular da proteína de fusão NPF-sfGFP em situações de estresse térmico

Para determinar a localização subcelular da proteína fluorescente NPF-GFP, 200 μ L de uma suspensão conidial (2×10^6 células/mL) obtida a partir da linhagem homocário complementada $\Delta npf::npf$ foram inoculados sobre lamínulas de vidro estéreis, contidas em placas de Petri, cobertas com meio VM líquido acrescido de sacarose 2% e incubadas a 30°C por 12h, conforme descrito em Freitas et al. (2016). Em seguida, uma lamínula foi separada da cultura inicial e reservada para ser usada como controle do ensaio, enquanto o meio de cultivo restante na placa foi substituído por meio VM fresco contendo 0,5% sacarose,

previamente aquecido a 45°C e as placas contendo as lamínulas com o restante das culturas foram incubadas a 45°C durante 30 min para estabelecer o estresse térmico. Após o estresse, os micélios foram rapidamente fixados em temperatura ambiente durante 15 min com o tampão de fixação. A solução fixadora foi removida, o micélio foi lavado em tampão PBS 1x, depois foi coberto com certa quantidade de tampão PBS1x e em seguida, os núcleos foram corados durante 5 min em temperatura ambiente, pela adição de 100 uL de uma solução 0,5 mg/mL de DAPI neste tampão. A solução corante foi removida, o micélio corado foi depositado em uma lâmina de vidro e analisado em microscópio de fluorescência (AXIO Imager.A2 Zeiss). A fluorescência emitida pelo corante foi visualizada em comprimentos de onda de excitação e emissão de, respectivamente, 359 nm e 461 nm (filtro DAPI), enquanto a fluorescência emitida pela proteína GFP fusionada a NPF foi visualizada utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de, respectivamente, 490 e 525 nm (filtro FITC). As imagens foram capturadas usando uma câmera (AxioCam MRm câmera) acoplada ao microscópio e processadas utilizando-se do software AxioVision.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

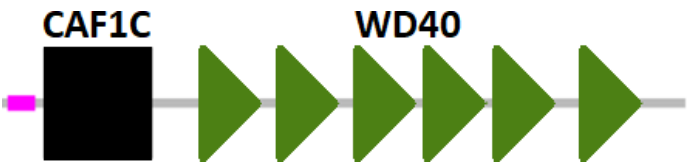
1. A proteína NPF de *N. crassa* e sua provável rede de interação

Mesmo após anos de estudo e resolução do genoma de *N. crassa*, nos dias atuais muitos dos seus genes ainda apresentam funções desconhecidas ou parciais. Logo, este fungo se torna um organismo interessante para realizar estudos quanto a mecanismos genéticos e bioquímicos não identificados até o momento, os quais podem ser representados por genes com novas funções ou até mesmo novos genes desempenhando funções de maneiras diferentes das conhecidas, permitindo descobrir novas proteínas e atribuir funções a elas, ou atribuir novas funções a proteínas já existentes. Em nosso laboratório, a busca pelo fator de transcrição responsável por ligar o elemento STRE em *N. crassa* e modular o acúmulo de glicogênio no fungo na condição de estresse térmico permitiu encontrar a proteína NPF como sendo um provável componente do complexo proteico modulador da transcrição de maneira dependente de STRE nesta condição ambiental (FREITAS ET AL., 2008).

A proteína NPF é produto da ORF NCU06679 (gene *npf*), possui 1.338 pb e codifica uma proteína com 446 resíduos de aminoácidos, que apresenta um domínio N-terminal do tipo CAF1C_H4-bd e seis motivos proteicos do tipo WD40 distribuídos ao longo de sua sequência polipeptídica (Figura 6). Proteínas contendo o domínio CAF1C_H4-bd e repetições WD40 pertencem à família de proteínas RbAp46 (**RBBP7**)/RbAp48(**RBBP4**). RBB4 e RBB7 são “histonas chaperonas” encontradas, respectivamente, em *H. sapiens* e *S. cerevisiae*. Tratam-se de componentes essenciais da maquinaria celular, que promovem a montagem dos nucleossomos durante a replicação e recrutam enzimas envolvidas em modificações pós-traducionais de histonas em eventos de regulação da transcrição. Além disso, também são encontradas em vários complexos proteicos associados à cromatina, trabalhando em conjunto com enzimas que reposicionam as proteínas nucleossomais de maneira dependente de ATP, durante eventos de remodelagem de cromatina. Embora RBB7 e RBB4 sejam 90% idênticas quanto ao seu conteúdo de aminoácidos, na levedura RBB7 é encontrada exclusivamente em complexos HAT, enquanto sua correlata em humanos é encontrada no complexo CAF-1 (PARTHUN ET AL., 1996; KAUFMAN ET AL., 1997; VERREAULT ET AL., 1996; VERREAULT ET AL., 1998). O complexo heterotrimérico conservado CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*) participa da deposição de histonas H3 e H4 em fitas de DNA recém sintetizadas e também facilita, de maneira específica, a replicação do DNA dependente da organização do nucleossomo via histona H3. Em contrapartida, ambas podem ser encontradas em complexos proteicos contendo atividade HDAC, promovendo repressão transcricional, incluindo os genes reprimidos pela proteína supressora de retinoblastoma (KORENJAK ET AL., 2004; NICOLAS ET AL., 2000; ZHANG ET AL., 1999).

Já os motivos ou repetições WD-40 são motivos curtos, com aproximadamente 40 resíduos de aminoácidos, sempre terminando com o dipeptídeo Trp-Asp (WD), encontradas

A



Fonte: <https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/NCU06679#InterProForm>

B

↕ Transcript ID	↕ PDB Structure	↕ PDB Molecular Description	↕ Taxon	↕ % of VEuPathDB protein Covered	↕ % Identity
NCU06679-t26_1	2xyi_A	PROBABLE HISTONE-BINDING PROTEIN CAF1	<i>Drosophila melanogaster</i>	98	46
NCU06679-t26_1	3c9c_A	Chromatin assembly factor 1 p55 subunit	<i>Drosophila melanogaster</i>	98	46
NCU06679-t26_1	3c99_A	Chromatin assembly factor 1 p55 subunit	<i>Drosophila melanogaster</i>	98	46
NCU06679-t26_1	4pby_A	Histone-binding protein RBBP4	<i>Homo sapiens</i>	95	49
NCU06679-t26_1	4pby_B	Histone-binding protein RBBP4	<i>Homo sapiens</i>	95	49
NCU06679-t26_1	4pbz_A	Histone-binding protein RBBP4	<i>Homo sapiens</i>	95	49
NCU06679-t26_1	5wak_A	Histone-binding protein RBBP4	<i>Homo sapiens</i>	95	49

Fonte: <https://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/NCU06679#PdbSimilarities>

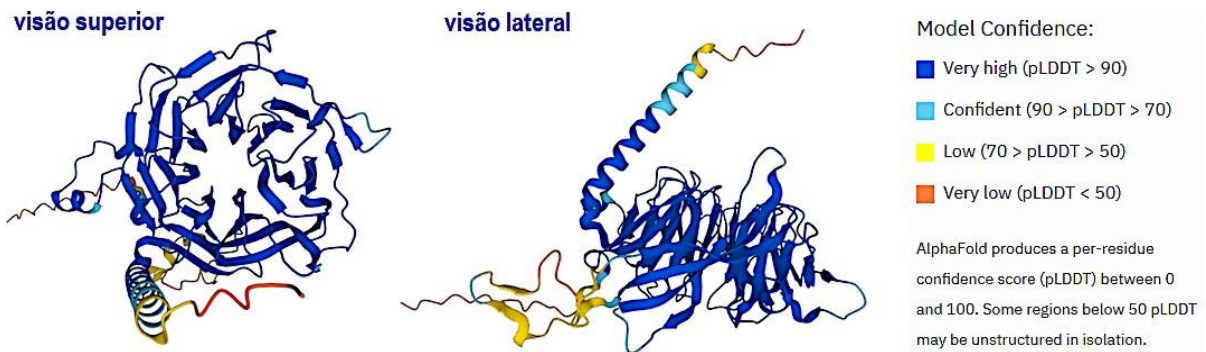
Figura 6. A proteína NPF e seus prováveis ortólogos estruturais. (A) Representação esquemática da proteína NPF e seus prováveis domínios proteicos. A proteína NPF possui 6 domínios do tipo WD40 distribuídos ao longo de sua sequência polipeptídica (posições 130 a 169; 180 a 220; 230 a 270; 276 a 317; 321 a 361 e 378 a 418) e que respondem por importantes interações proteína-proteína. Em sua região N-terminal, a proteína apresenta ainda um domínio de ligação a proteínas histonas tipo RBBP4 (posição 28 a 97), responsável pela interação da proteína NPF com a cromatina. **(B) Principais ortólogos funcionais encontradas para a proteína NPF.** NPF apresenta alta similaridade com as proteínas p55 de *Drosófila* e RBB4 de *Homo sapiens*, ortólogos depositados em bancos de dados de proteínas (Protein Data Bank, PDB), sugerindo a existência de uma correlação entre as funções desempenhadas por NPF no fungo e as desempenhadas por suas correlatas nestes organismos.

amplamente em todos os organismos eucariotos e estão envolvidos em uma variedade de funções celulares, indo desde a transdução do sinal e regulação da transcrição até o controle do ciclo celular e apoptose. Estes motivos atuam como um sítio de interação proteína-proteína, e proteínas contendo as repetições WD são bastante conhecidas por servirem como plataformas para a montagem de complexos proteicos ou mediadores de expressão gênica, cujas interações proteína-proteína são transitórias. Um exemplo de proteína contendo motivo WD40 é o fator de transcrição TAFII, que participa da montagem do complexo de iniciação da transcrição nas regiões promotoras dos genes, por se ligar à proteína de reconhecimento do TATA-box (TFIID) e com isso recrutar as demais proteínas necessárias para formar a maquinaria de transcrição celular.

Uma análise recente do genoma do fungo mostrou que a grande maioria dos genes marcados por esta marca epigenética ainda não se encontra anotada no fungo (JAMIESON ET AL., 2013), logo podemos considerar que existe neste organismo genes que são funcionalmente desconhecidos, o que reflete a falta de ortólogos caracterizados em outras espécies e abre espaço para pesquisas neste sentido. Como mencionado anteriormente, a proteína NPF mostrou ser bastante conservada entre diferentes organismos (Figura 6). A busca por ortólogos (BLAST) revelou que o produto desta ORF apresenta uma identidade de 50% com a proteína RBBP4 (*histone-binding protein isoform a*, PDB 3CFS) de *Homo sapiens* e 45% com a proteína NURF55 (*chromatin assembly fator1 subunit isoform B*, PDB 2YBA) de *Drosophila melanogaster* e sugere que esta proteína possa participar de diferentes complexos proteicos, já que a proteína NURF55 pode ser encontrada em diversos complexos envolvidos com eventos de remodelagem de cromatina, tais como HAT1 (*histone acetyltransferase 1*), HDAC1 (*histone deacetylase*), CAF-1 (*chromatin assembly fator-1*) entre outros (PARTHUN ET AL., 1996, TAUNTON, ET AL., 1996). Pelo fato de ser altamente conservada, estruturas tridimensionais de suas ortólogas correlatas em *Drosophila*, humanos e *S. pombe*, que estão disponíveis em bancos de dados de proteínas, tais como o PDB (<https://www.rcsb.org/>), o que nos permitiu encontrar a resolução de uma provável estrutura tridimensional da proteína NPF, por meio de modelagem molecular, depositada no FungiDB, que foi resolvida por inteligência artificial, usando o programa AlphaFold (<https://alphafold.ebi.ac.uk/>, código de acesso AF-Q7S7N3) e que se encontra depositada na base de dados UniProt (*Universal Protein*, código de acesso Q7S7N3) (Figura 7A).

Além disso, a existência desses ortólogos também permitiu realizarmos uma busca por prováveis proteínas parceiras, baseado em evidências de interações preditas ou conhecidas, utilizando o software STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, <https://string-db.org>) e os resultados obtidos encontram-se na Figura 7B. Entre os parceiros identificados na busca, verificamos a presença de algumas proteínas conhecidas estarem

A



B

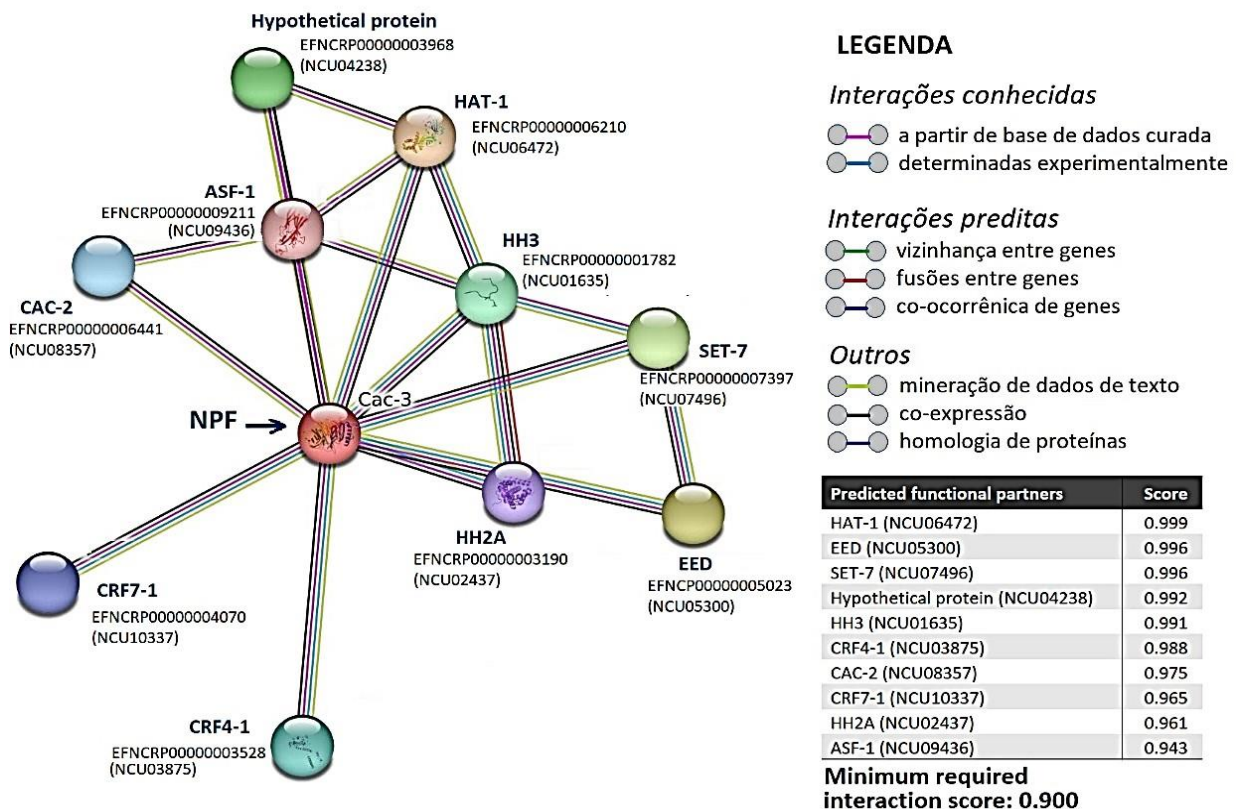


Figura 7. NPF e suas prováveis proteínas parceiras. (A) Provável estrutura tridimensional da proteína NPF. Uma possível estrutura tridimensional da proteína NPF encontra-se depositada no banco de dados UniProt (Q7S7N3) e foi determinada usando o software AlphaFold (AF-Q7S7N3), tendo como modelos as estruturas de *S. pombe* (5wjc.1), *Drosophila* (2xyi.1) e *H. sapiens* (7m40.1), cujas identidades são de 48,18%, 48,03% e 49,49%, respectivamente. **(B) Provável rede de interações proteína-proteína para NPF.** Uma possível rede de interação entre NPF e suas parceiras funcionais foi determinada baseado em evidências, utilizando o programa STRING e um grau de confiança de 0.900 para as associações funcionais e o mapa contendo as possíveis interações encontra-se representado na figura. **NPF (Cac-3):** proteína alvo (NCU06679); **HAT-1:** histone acetyltransferase-1 (NCU06210); **EED:** Polycomb protein EED (NCU05300); **SET-7:** SET domain-containing protein 7 (NCU07496); **Proteína hipotética:** putative Histone H1 binding protein (NCU04238); **CRF4-1:** chromatin remodelling complex ATPase chain ISW1 (NCU03875); **CAC-2:** chromatin assembly factor 1 (NCU08357); **CRF7-1:** Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4 (NCU10337); **ASF-1:** histone chaperone asf-1 (NCU09436); **HH2A:** histone H2A (NCU NCU02437); **HH3:** histone H3 (NCU01635)

interagindo com NPF, participando do complexo repressor PRC2, ocasionando modificações pós-traducionais nas proteínas histonas: são as proteínas SET-7 e EED (JAMIESON ET AL., 2013; LEWIS ET AL., 2017). A proteína SET-7 (*SET domain-containing protein 7; Drosophila proteins Su(var)3-9, Enhancer of zest [E(z)], and Trithorax trx*) é codificada pela ORF NCU07496 (Figura 7B, EFNCRP00000007397, gene *set-7*) e possui 1611 resíduos de aminoácidos. Trata-se de um dos quatro componentes do complexo repressor PRC2 e é necessária durante o processo de remodelagem de nucleossomos para repressão da expressão genica e formação de heterocromatina facultativa, via trimetilação do resíduo de K27 da histona H3 (H3K27me3). Possui ortólogos em diversos organismos e não é essencial para o crescimento e desenvolvimento de *Neurospora* (JAMIESON ET AL., 2013; LEWIS ET AL., 2017). Apresenta um domínio C-terminal SET com atividade metiltransferase bastante conservado, presente em vários outros organismos, que foi inicialmente caracterizado em *Drosophila* modulando a atividade gênica e/ou estrutura da cromatina (Figura 8). Já a proteína EED (*Polycomb protein EED*) é codificada pela ORF NCU05300 (Figura 7B, EFNCRP00000005023, gene *eed* –*embryonic ectoderm development*), possui 685 aminoácidos e quatro domínios tipo WD40 ao longo de sua sequência peptídica, sendo três deles na porção N-terminal e o último em C-terminal (Figura 8). Também se trata de uma das subunidades do complexo repressor PRC2, possui ortólogos em vários organismos vivos, não é essencial para o desenvolvimento do fungo e já mostrou estar envolvida no silenciamento genético via metilação H3K27 (JAMIESON ET AL., 2013; LEWIS ET AL. 2017), na via de sinalização mediada por luz e relógio circadiano via regulador circadiano WCC (*White Collar Complex*) (SMITH ET AL., 2010), no desenvolvimento de corpos de frutificação de *Neurospora* (WANG ET AL. 2012) e metabolismo de amido (XIONG ET AL., 2017).

Outras prováveis proteínas parceiras de NPF exibem atividade dsDNA helicase e estão representadas pelas ORFs NCU03875 e NCU10337. Proteínas helicases são importantes porque promovem o desenovelamento da fita de DNA do nucleossomo de maneira dependente de energia e com isso, possibilitam o acesso de proteínas regulatórias aos promotores de genes que se encontram associados às proteínas histonas, compactados na forma de cromatina. Genes quando no estado compactado, estão impossibilitados de serem transcritos e, portanto, encontram-se silenciados.

A ORF NCU03875 (Figura 7B, EFNCRP00000003528, gene *crf4-1*) codifica uma proteína regulatória envolvida em eventos de remodelagem de cromatina chamada CRF4-1 (*chromatin remodelling complex ATPase chain ISW1*). Trata-se de uma proteína ATPase regulatória que pertence à subfamília SWI2/SNF2 de DEAD/H-helicases (TOTO ET AL., 2014) e possui 1126 aminoácidos. Em sua região N-terminal podemos encontrar um domínio DEXDc (*DEAD-like helicase superfamily*) comumente encontrado em proteínas helicases com atividade ATPase associada (TANNER; LINDER, 2001), tais como a proteína helicase RecA

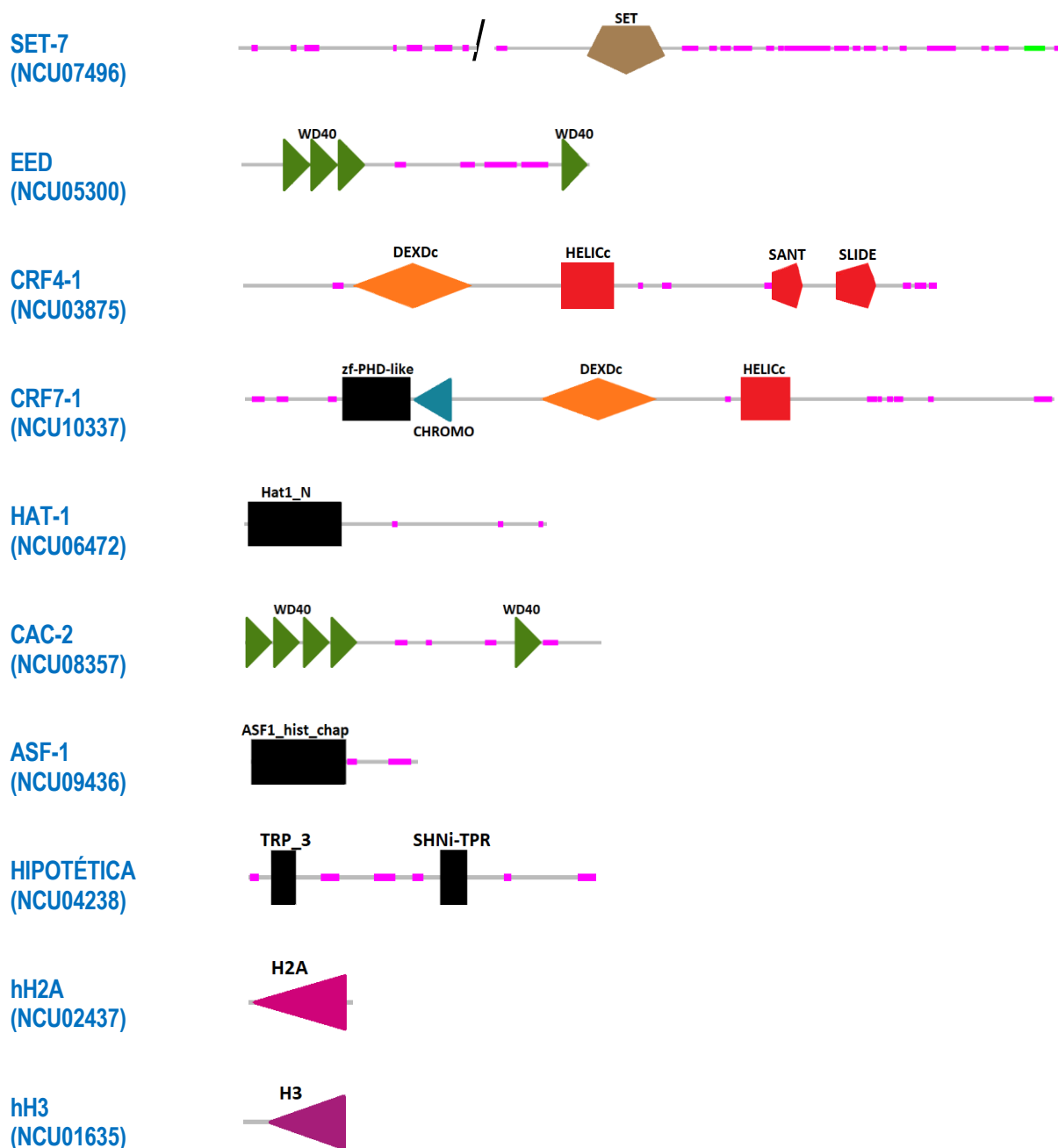


Figura 8. Esquema representativo das prováveis proteínas parceiras de NPF. A provável rede de interações proteína-proteína foi determinada baseando-se em evidências de interações preditas ou conhecidas, utilizando o software STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*, <https://string-db.org>) e os principais domínios proteicos representados nas sequências polipeptídicas foram preditos utilizando-se o software SMART (<https://smart.embl.de/>).

envolvida em eventos de recombinação homologa em bactérias. Dentro deste domínio, podemos encontrar os motivos WalkerA, de ligação ao grupamento fosfato e WalkerB, de ligação ao cofator Mg^{2+} . Além do domínio DEXDc, a proteína CRF4-1 possui na sua região central um domínio helicase tipo HELICc (GORBALENYA ET AL., 1989) e na sua região C-terminal um domínio SANT e um domínio SLIDE (um domínio tipo SANT, com algumas inserções), envolvidos em eventos de remodelagem de cromatina que causam repressão da transcrição (AASLAND ET AL., 1996) (Figura 8). Proteínas contendo estes domínios encontram-se envolvidas em processos de regulação da transcrição. Já a ORF NCU10337 (Figura 7B, EFNCRP00000004070, gene *crf7-1*) codifica a proteína CRF7-1 (*Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4*), com 1726 aminoácidos. Trata-se de uma proteína com domínio de ligação ao DNA, contendo um cromodominio e possui ortólogos em outros organismos vivos, anotados como proteína hipotética exibindo atividade helicase ou facilitando a elongação do transcrito pela RNA pol II. Na sua região N-terminal apresenta um importante domínio de ligação ao DNA tipo *zinc-finger* (PHD-HAC-like), capaz de discriminar a metilação presente nas caudas das histonas H3 modificadas das não modificadas, comumente encontrado em proteínas presentes em complexos proteicos supramoleculares reguladores da transcrição do tipo CBP (p300/CREB *binding proteins*) (Figura 8). CRF7-1 também possui um domínio N-terminal CHROMO (*CHromatin Organization MODifier*) bastante conservado em proteínas de *Drosophila*, responsáveis por alterar a estrutura da cromatina para sua morfologia condensada (heterocromatina), uma condição onde a expressão gênica se torna reprimida. Em proteínas *Polycomb*, este domínio sinaliza tanto a localização nuclear das proteínas contendo cromodominio, quanto a metilação da cromatina em si, por meio de interações proteína-proteína e/ou proteína/DNA, respectivamente (EISSENBERG, 2001). Além dos domínios citados, CRF7-1 também apresenta um domínio central DEXDc/SNF-2 e HELICc, conferindo-lhe atividade helicase dependente de ATP, como para a proteína CRF4-1 (Figura 8).

Proteínas capazes de modificar histonas de outras maneiras, que não a metilação de lisinas, também foram encontradas como sendo prováveis parceiras de NPF. Uma dessas proteínas é a HAT-1 (*histone acetyl transferase-1*), codificada pela ORF NCU06472 (Figura 7B, EFNCRP00000006210, gene *hat-1*), com 508 aminoácidos. Essa proteína é o componente catalítico do complexo Histona Acetilase B (HAT B), responsável pela modificação pós-traducional das histonas pela adição de grupamentos acetil no resíduo de lisina 12 da histona H4 (H4K12ac), evento necessário para silenciamento telomérico. As HATs são proteínas envolvidas em eventos de transcrição, pois em regiões de cromatina transcritas as histonas tendem a ser hiperacetiladas, ao passo que em regiões transcricionalmente silenciadas, as histonas encontram-se hipoacetiladas. HAT-1 possui um domínio N-terminal

HAT1_N (Figura 8), comumente encontrado em proteínas envolvidas na acetilação de histonas (NEUWALD; LANDSMAN, 1997).

Proteínas capazes de interagir com histonas, tais como a CAC-2 e ASF-1 também foram identificadas por evidências. A proteína CAC-2 (*chromatin assembly factor 1*) possui 732 aminoácidos e é codificada pelo gene *cac-2* (ORF NCU083577, EFNCRP00000006441, Figura 7B). Esta proteína já se mostrou envolvida no metabolismo de carbono e nitrogênio (XIONG ET AL., 2017) e possui ortólogos em vários organismos vivos, anotados como proteínas hipotéticas ou então, proteínas que participam da organização estrutural da cromatina. Possui quatro domínios proteicos N-terminais e um D-terminal, todos do tipo WD40 (Figura 8). Encontra-se anotada no FungiDB como participando do complexo heterotrimérico CAF-1 (*chromatin assembly factor 1*), um complexo proteico conservado, que promove a deposição de histonas H3 e H4 em fitas de dsDNA recém-sintetizadas durante a replicação ou reparo de DNA, contribuindo na organização de nucleossomos e formação de regiões de heterocromatina via histona H3 (HOULARD ET AL., 2006). A proteína ASF-1 (*histone chaperone asf-1*, *Anti-Silencing Factor 1*), outra possível parceira de NPF por evidências, possui 271 aminoácidos e é codificada pelo gene *asf-1* (NCU09436, EFNCRP00000009211, Figura 7B). Trabalhos apontam que esta proteína está envolvida em eventos de edição de RNA (LIU ET AL., 2017), metabolismo de carbono e nitrogênio (XIONG ET AL., 2017), incompatibilidade de heterocáries e estresse (HUTCHISON ET AL., 2009). Possui um domínio N-terminal tipo ASF-1_his_chap (Figura 8), encontrado em proteínas de humanos e leveduras que exibem atividade histona chaperona e participam de processos de replicação de DNA, silenciamento em regiões teloméricas, regulação transcricional, resposta celular a estímulos estressantes, acetilação de histonas, silenciamento de *mating type* via formação de heterocromatina, troca de histonas e organização/desorganização da cromatina durante o processo pelo deslocamento de histonas (DAGANZO ET AL., 2003). Possui ortólogos em diferentes organismos, anotados como proteínas hipotéticas exibindo atividade histona chaperona.

Uma ORF codificando uma proteína ainda anotada como hipotética e não caracterizada no FungiDB também foi identificada durante a análise de interações proteína-proteína para enriquecimento funcional da NPF por STRING – trata-se da ORF NCU04238 (provável *Histone H1 binding protein*, EFNCRP00000003968, Figura 7B), a qual codifica uma proteína com 471 resíduos de aminoácidos com provável atividade de ligação à histona H1 e regulação por luz (WU ET AL., 2014). Seus ortólogos em outros organismos vivos também se encontram anotados como proteínas hipotéticas. Possui um domínio N-terminal tetratricopeptídico tipo TPR-3 e um domínio central tetratricopeptídico tipo SHNi-TPR (Figura 8). Os domínios tetratricopeptídicos TPR estão presentes em grande quantidade de proteínas e medeiam interações proteína-proteína e a formação de complexos proteicos multiméricos.

São domínios identificados em vários organismos vivos como estando envolvidos em processos biológicos tais como regulação de ciclo celular, controle transcricional, transporte e enovelamento de proteínas. (LAMB ET AL., 1995).

Finalmente, ORFs codificando as proteínas histonas hH2A (NCU02437) e hH3 (NCU01635) também foram identificadas como provavelmente integrando a rede de interações proteína-proteína envolvendo NPF (Figura 7B e Figura 8). A proteína histona hH2A (EFNCRP00000003190, gene *hh2a*) possui 134 aminoácidos e participa do controle da expressão genica sendo alvo de metilações e acetilações (XIONG ET AL., 2010). Também mostrou ser alvo de eventos de incompatibilidade de heterocáries e estresse (HUTCHISON ET AL., 2009), formação de heterocromatina (SASAKI ET AL., 2014), desenvolvimento de corpos de frutificação (WANG ET AL., 2012a) e desenvolvimento assexuado/sexuado do FUNGO (WANG ET AL., 2012b). Trata-se de um componente central do nucleossomo e exerce papel crítico no reparo de dsDNA, na compactação da cromatina, na estabilidade cromossomal e na regulação da transcrição genica, limitando o acesso ao DNA por proteínas regulatórias e maquinarias proteicas com atividade dependente de DNA. A proteína histona hH3 (EFNCRP00000001782, gene *hh3*) possui 136 aminoácidos e também é um componente central dos nucleossomos, com função de compactação da molécula de DNA em cromatina e limitando o acesso ao DNA por proteínas regulatórias e maquinarias proteicas com atividade dependente de DNA. Seu domínio proteico H3 (Figura 8) também está presente nas histonas hH2A e hH2B e pode ser encontrado em fatores de transcrição, relacionados à estrutura das histonas (LUGER ET AL., 1997)

2. A deleção do gene *npf* causa alterações fenotípicas importantes em *N. crassa*

A fim de decifrar o papel da proteína NPF na modulação da expressão gênica em *N. crassa* em condições de estresse ambiental, uma linhagem mutante (FGSC 13915) apresentando o gene *npf* individualmente nocauteado pela inserção da marca de seleção de higromicina foi adquirida junto ao FGSC. A importância de se trabalhar com uma linhagem nocauteada está em que a partir das análises realizadas com esta linhagem, é possível atribuir à proteína produto da expressão do gene alvo nocauteado novas funções. Devido ao modo de obtenção da linhagem mutante se basear em eventos de recombinação homóloga, foi necessário antes de iniciar com os estudos de caracterização da proteína alvo, confirmar se o nocaute gênico foi bem-sucedido. Para isto, conídios da linhagem FGSC 02489 (WT, controle positivo para a presença do gene *npf*), FGSC 13915 (Δnpf) foram germinados em meio VM líquido durante 24 h a 30°C e os micélios formados foram utilizados para a obtenção de DNAg e submetidos a PCR, usando as combinações de primers descritas anteriormente conforme descrito em Materiais e Métodos. Os produtos das reações foram analisados por

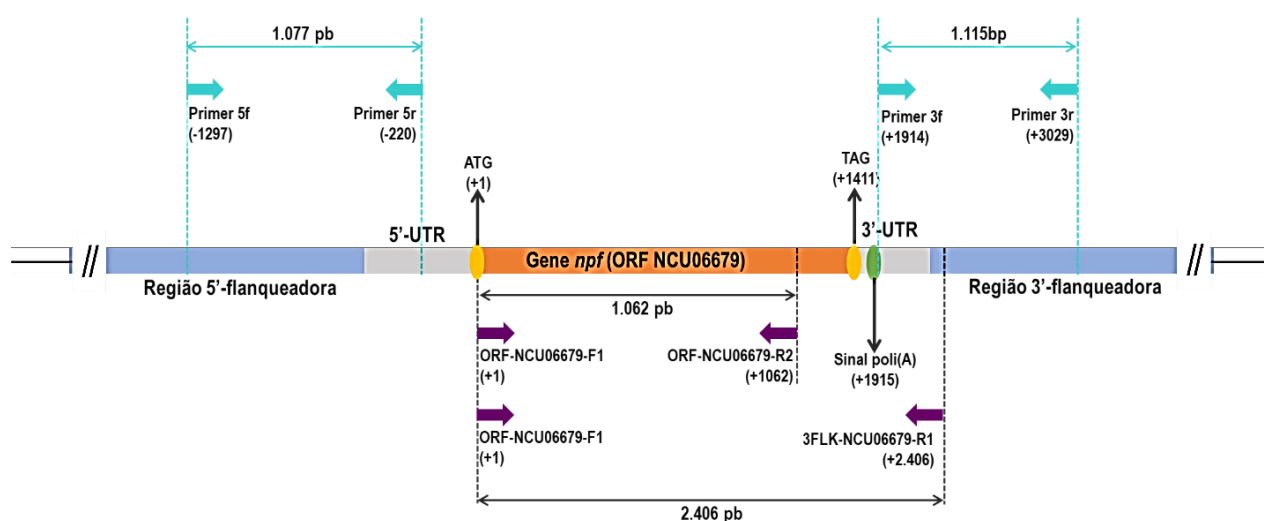
eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE 1x, contendo SyberSafe (Invitrogen), segundo instruções do fabricante.

Os resultados obtidos para as reações de PCR encontram-se na Figura 9. Os pares de primers flanqueando a região codificadora do gene *npf* (Primer 5f, Primer 5r, Primer 3f, Primer 3r), que foram usados pelo FGSC para realizar o nocaute gênico por recombinação homóloga, estão representados em verde-água na Figura 9A e devidamente posicionados, assim como os tamanhos dos fragmentos de DNA por eles amplificados. De acordo com o FGSC, a combinação de primers Primer 5f vs. Primer 5r amplifica um fragmento de DNA de 1.077 bp, localizado 200 bp *upstream* à posição +1 do gene *npf*, que corresponde ao resíduo de adenina do códon de início da tradução ATG. Já a combinação dos Primer 3f e Primer 3r amplifica um fragmento de DNA de 1.115 bp, localizado 504 bp *downstream* ao resíduo de timina do stop códon TAG do gene *npf*. Estes fragmentos foram usados para remover o gene *npf* por recombinação homóloga, pela introdução do gene que confere resistência à higromicina no local onde se encontra a ORF NCU06679 no genoma do fungo. Sendo assim, os pares de primers desenhados para checar o nocaute gênico neste trabalho, foram desenhados para amplificar a ORF NCU06679, do seu ATG até seu TGA (ORF NCU06679-F1 vs. ORF NCU06679-R2) e para amplificar a ORF NCU06679 a partir do seu ATG, até metade da sua região 3'-UTR (ORF NCU06679-F1 vs. ORF NCU06679-R1), a fim de confirmarmos a remoção completa do gene *npf* (Figura 9A).

Fragmentos de DNA, exibindo os tamanhos esperados de 1.062 bp e 2.406 bp foram observados para as reações de PCR utilizando DNAg preparado a partir da linhagem selvagem do fungo e um fragmento de DNA de 1.062 bp, representando a ORF inteira do gene *npf* foi observado para a linhagem complementada (Figura 9B, painel WT, linhas 1 e 2, respectivamente). Estes fragmentos, no entanto, mostraram-se ausentes para as reações de PCR realizadas utilizando-se como molde DNAg preparado a partir da linhagem mutante do fungo (Figura 9B, Δnpf , linhas 1 e 2, respectivamente - comparar com o resultado obtido para a linhagem WT), confirmando desta maneira, a ausência do gene *npf* nesta linhagem em decorrência do procedimento de nocaute.

Paralelamente, realizamos a complementação da linhagem mutante, pela inserção de uma cópia do gene *npf* no locus *-his3*, a partir de uma linhagem duplo-mutante Δnpf *-his-3* existente em nosso laboratório (FARIAS, 2018), conforme descrito em Materiais e Métodos. Os resultados obtidos para complementação encontram-se na Figura 10. Conforme relatado anteriormente, o duplo-mutante Δnpf *-his-3* caracteriza-se pela sua capacidade de metabolizar higromicina e crescer na presença da mesma, dada a forma com que foi realizado o nocaute gênico e à incapacidade de crescer na ausência de histidina, sua marca auxotrófica. Iniciamos, portanto, a complementação desta linhagem, confirmando os fenótipos para higromicina e histidina. Após 10 dias de cultivo em frascos contendo meio VM suplementado

A



B

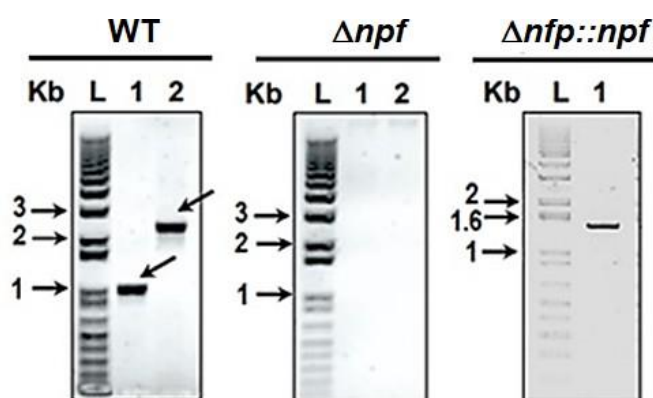


Figura 9. Confirmação do nocaute da linhagem mutante Δnpf e da complementação da linhagem $\Delta npf::npf$. (A) Representação esquemática do gene *npf* e posição genômica dos primers. Os pares de primers usados para a construção da linhagem mutante pelo FGSC (Primer 5f vs. Primer 5r; Primer 3f vs. Primer 3r) e os primers desenhados neste trabalho, para checar o nocaute gênico e a complementação da linhagem $\Delta npf::npf$ (ORF NCU06679-F1 vs. ORF NCU06679-R2; ORF NCU06679-F1 vs. ORF NCU06679-R1) estão representados na figura, assim como os respectivos tamanhos dos fragmentos de DNA gerados a partir das suas combinações. (B) Amplificação do gene *npf* nas linhagens selvagem (WT), mutante (Δnpf) e complementada ($\Delta npf::npf$). Amostras de DNAg das linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram usadas para amplificar fragmentos de DNA correspondendo ao gene *npf*, usando os pares de primers descritos em (A) e os produtos das reações de amplificação foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0,8% contendo SYBR Safe (Invitrogen), em tampão TAE 1x. L – ladder (1 Kb DNA ladder, Invitrogen); 1- primers ORF-NCU06679-F1 x ORF-NCU06679-R2: 1.062 bp. 2- primers ORF-NCU06679-F1 x 3FLK-NCU06679-R1: 2.406 bp. Eletroforese em gel de agarose 0,8%, em tampão TAE 1x.

ou não com histidina e acrescido de sacarose 2% e higromicina, observamos que a linhagem em questão foi capaz de crescer na presença de higromicina e incapaz de formar micélio na ausência do aminoácido (Figura 10A), confirmando assim a presença da dupla-mutação. Prosseguimos então com a complementação, transformando esta linhagem com a construção plasmidial pTSL91A-NPF existente no laboratório (FARIA, 2018), a qual carrega a região codificadora do gene *npf* fusionada ao gene codificando a versão *superfolder* da proteína verde fluorescente GFP e permite a inserção da construção no locus *-his3* de uma linhagem de *Neurospora* específica, por recombinação homóloga. Além disso, esta construção plasmidial ainda permite a expressão constitutiva da proteína de fusão NPF-sfGFP devido ao cassete de DNA estar sob o controle do promotor constitutivo *ccg-1* (o plasmídeo pTSL-91A foi gentilmente cedido a Profa. Fernanda pela Profa. Louise Glass, UC Berkeley, CA).

Após a eletroporação, os conídios foram inoculados em meio seletivo e apenas aqueles cujo fenótipo se assemelhava ao selvagem foram analisados por PCR para confirmação das inserções (dados não mostrados). O **transformante 2** apresentou as características fenotípicas selvagens desejáveis (Figura 10B) e foi selecionado para purificação de homocário. Esta etapa foi necessária porque a inserção da construção plasmidial foi realizada por eletroporação e conídios de *Neurospora* podem ser multinucleados, os transformantes obtidos são heterocários e ao germinarem, podem formar micélios cujas hifas podem conter ao mesmo tempo, núcleos selvagens, núcleos mutantes e núcleos complementados.

Com o objetivo de selecionarmos uma linhagem complementada onde 100% dos núcleos estivessem carregando o cassete de DNA contido no plasmídeo pTSL91A-NPF realizamos a purificação de homocário por microconidiação, já que microconídios do fungo são mononucleados. Para isto, o transformante 2 foi cultivado em meio de cultivo específico para induzir microconidiação no fungo (meio SC acrescido de IAA; EBBOLE e SACHS, 1990; Figura 10C), os microconídios foram coletados e isolados por filtração e em seguida, inoculados em meio VM contendo sacarose 2% e higromicina (para garantir a presença do fenótipo Δnpf). Nesta etapa não adicionamos histidina, pois apenas aqueles capazes de crescer na sua ausência eram possíveis candidatos à complementação do fenótipo para histidinol quinase. Os resultados obtidos estão na Figura 10D. Dentre os homocários obtidos, selecionamos a **linhagem T29** (Figura 10E) e confirmamos a presença do gene *npf* por meio da amplificação de um fragmento de DNA correspondendo à ORF NCU06679, usando pares de primers específicos e DNAg extraído da referida linhagem como molde (Figura 9B, painel $\Delta npf::npf$). Uma vez que o nocaute gênico foi confirmado e que a linhagem complementada apresentando o gene *npf* inserido no locus *-his3* foi capaz de recuperar o fenótipo selvagem, consideramos que as linhagens Δnpf e $\Delta npf::npf$ estavam aptas para serem usadas nos experimentos de caracterização molecular da proteína NPF deste trabalho.

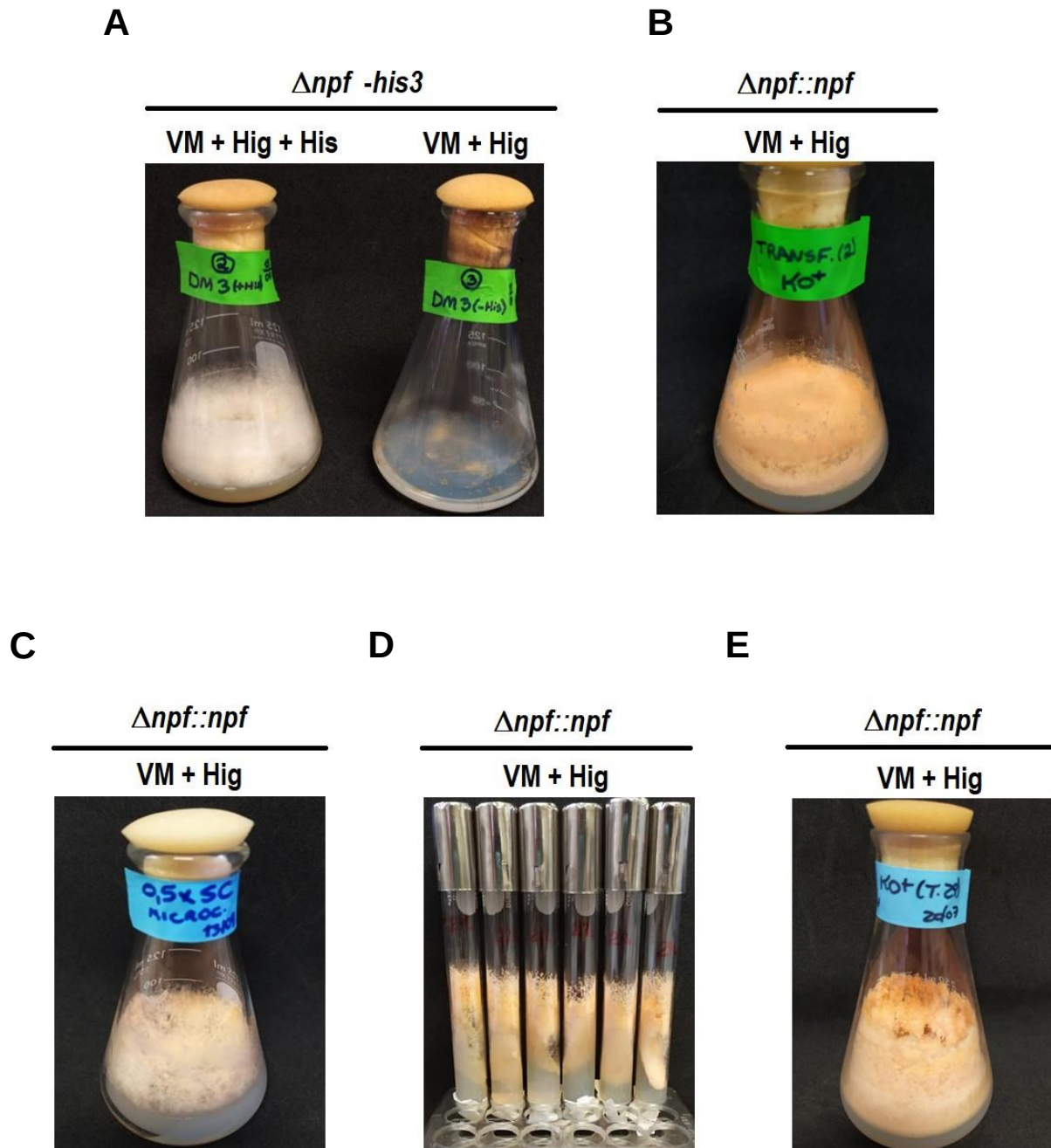


Figura 10. Complementação da linhagem mutante Δnpf . (A) Confirmação da dupla-mutação. A presença da dupla-mutação na linhagem $\Delta npf -his3$ (a, *mus-51*; FARIA, 2018) foi confirmada em culturas de 10 dias obtidas a partir de conídios inoculados em meio VM acrescido de sacarose 2% e higromicina, na presença e na ausência de histidina. (B) Seleção da linhagem complementada. Conídios da linhagem $\Delta npf -his3$ foram eletroporados com a construção plasmidial pTSL91A-NPF e seus transformantes foram selecionados em meio VM contendo sacarose 2% e higromicina. (C) e (D) Purificação da linhagem $\Delta npf::npf$ homocário. A linhagem $\Delta npf::npf$ foi induzida à microconidiação em meio SC acrescido de IAA (A). Os microconídios foram coletados, isolados e inoculados em meio VM acrescido de sacarose e higromicina (B), para seleção dos homocários. (E) Aspecto morfológico da linhagem complementada $\Delta npf::npf$ homocário selecionada.

A fim de verificar o envolvimento da proteína NPF no crescimento e desenvolvimento do fungo, iniciamos diversos estudos de caracterização morfológica, tendo como *background* a linhagem selvagem do fungo FGSC 2489. Para isto, conídios das linhagens selvagem, mutante e complementada foram inoculados em Erlenmeyer contendo meio VM acrescido de sacarose e incubados a 30°C durante 3 dias em BOD, e em seguida foram transferidos e/ou mantidos em condições ambientes de luminosidade e temperatura por mais 7 dias, totalizando 10 dias de cultivo. O crescimento vegetativo das linhagens mutante e complementada foram avaliadas após 10 dias de cultivo, em frascos contendo meio VM acrescido de sacarose, conforme descrito em Materiais e Métodos e comparado com uma cultura da linhagem selvagem do fungo, cultivada em paralelo, sob as mesmas condições. O objetivo desta etapa foi analisar a presença de alterações morfológicas na linhagem nocauteada e observar a recuperação do fenótipo selvagem na linhagem complementada. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 11.

Após 10 dias de cultivo a 30°C em condições de luminosidade ambiente, observamos que enquanto as linhagens WT e complementada apresentam uma coloração alaranjada *sui generis*, com a produção de grande quantidade de estruturas de propagação, a linhagem mutante tem micélio de coloração amarelo pálido e uma menor produção de conídios. A contagem de conídios em câmara de Neubauer revelou que a linhagem enquanto para as linhagens WT e $\Delta npf::npf$ foram encontradas densidades de células da ordem de 10^8 conídios/mL, para a linhagem Δnpf a produção de conídios foi 100 vezes menor, na ordem de 10^6 conídios/mL, confirmando os resultados observados visualmente e sugerindo para NPF um papel na produção de estruturas de propagação e desenvolvimento assexuado do fungo. Já a tonalidade amarela encontrada na linhagem mutante sinaliza claramente uma produção de carotenoides defectiva neste organismo (Figura 11A).

A capacidade de produção de carotenoides, também denominados de pigmentos acessórios, é uma característica singular de *N. crassa* e está presente durante o ciclo de vida do fungo, apresentando um relevante potencial biotecnológico, uma vez que acumulam pigmentos durante o crescimento micelial (FRASER ET AL., 1996; RUIZ-HIDALGO ET AL., 1999). Além de serem moléculas de natureza lipídica, as propriedades antioxidantes dos carotenoides (atuam através da desativação de radicais livres nas células e pelo sequestro do oxigênio singleto) têm sido exploradas em fungos há bastante tempo (MORTENSEN ET AL., 1997; 2001). Quando cultivadas inicialmente em BOD (3 primeiros dias de cultivo, dados não mostrados), as linhagens WT e complementada desenvolveram coloração alaranjada menos intensa durante o período em que ficaram mantidas no escuro. No entanto, quando expostas à iluminação ambiente pelos 7 dias de cultivo restantes (Figura 11A), as linhagens selvagem e complementada intensificaram a tonalidade alaranjada do micélio. Isto se deve ao fato de *N. crassa* perceber a luz azul, o que altera o seu ciclo circadiano influenciando na

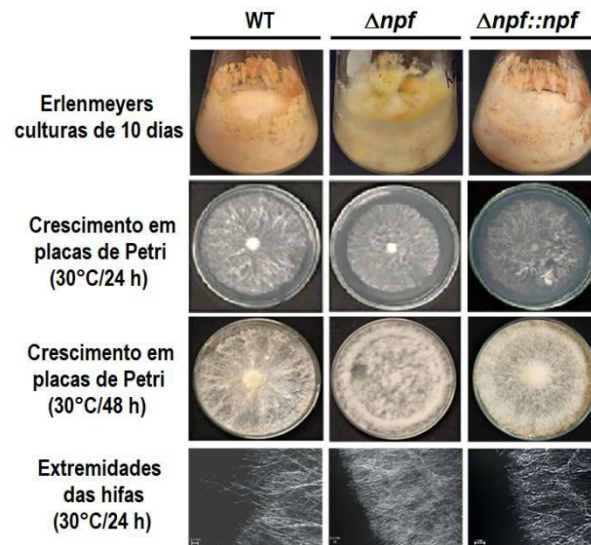
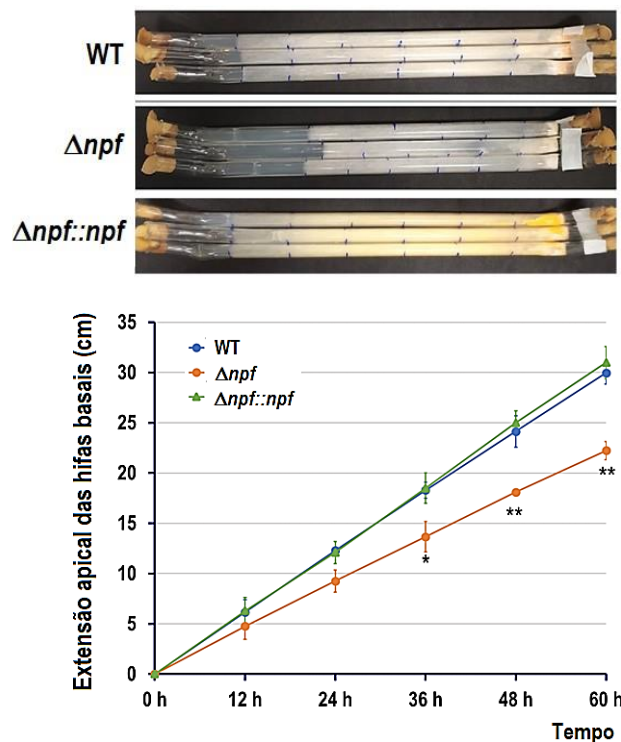
A**B**

Figura 11. Caracterização funcional das linhagens mutante (Δnpf) e complementada ($\Delta npf::npf$). (A) Análises morfológicas das linhagens durante o crescimento vegetativo. Conídios das linhagens Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivados em Erlenmeyers e placas de Petri contendo meio VM sólido acrescido de sacarose 2%. Para o crescimento radial, as culturas foram mantidas a 30°C por 24 e 48h. Imagens das extremidades das hifas das culturas em placa após 24h de cultivo foram adquiridas usando uma câmera AxioCam ICc3 acoplada a um estereomicroscópio Discovery V8 (Zeiss), com aumento de 80x. (B) Extensão apical das hifas basais. Conídios das linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram inoculados em *race tubes* contendo meio VM com sacarose 2% e os relógios biológicos foram sincronizados incubando-se as culturas a 30°C/12, sob luz constante. Em seguida, as linhagens foram submetidas ao o escuro constante, até que uma das linhagens atingisse a outra extremidade do tubo. Medidas dos crescimentos lineares foram realizadas a cada 12 h, sob luz vermelha e os dados obtidos estão representados graficamente. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$).

carotenogênese e conidiação em condições normais de cultivo (BORKOVICH, ET AL., 2004). Para a linhagem mutante, mesmo após sua exposição à iluminação ambiente, o micélio formado permaneceu com coloração amarelo pálido, sinalizando uma produção de carotenoides defectiva (Figura 11A, comparar linhagens WT e $\Delta npf::npf$ com Δnpf) e sugerindo que a proteína NPF está associada com a biossíntese de carotenóides e provavelmente à regulação do ciclo circadiano do fungo.

Em relação à formação de micélio e produção de hifas aéreas, encontramos que enquanto nas linhagens selvagem e complementada o micélio formado apresenta hifas aéreas menos ramificadas, a linhagem Δnpf produziu hifas aéreas altamente ramificadas e em maior quantidade quando comparado às linhagens WT e complementada, dando ao seu micélio um aspecto denso e cotonoso (Figura 11A, comparar as imagens obtidas para as diferentes culturas em Erlenmeyer após 10 dias de cultivo e as imagens das extremidades das hifas após 24 h de cultivo a 30°C), demonstrando a importância de NPF para a produção de hifas aéreas e micélio durante o crescimento vegetativo do fungo.

Uma vez que nossos resultados apontaram para um possível papel de NPF no crescimento vegetativo do fungo, analisamos a capacidade de formação de colônias por meio da determinação do crescimento radial das linhagens em placas de Petri e a capacidade de extensão de hifas basais (taxa de crescimento linear), pelo cultivo das linhagens em *race tubes*. Quando cultivadas a 30°C, durante 24 h, o raio obtido para a colônia formada pela linhagem Δnpf foi menor do que os raios encontrados para as colônias obtidas a partir de conídios das linhagens WT e complementada (Figura 11A). Além disso, a colônia formada pela linhagem mutante após 48 h de cultivo mostrou a produção de uma “banda” na formação micelial, próxima à extremidade da placa. Este perfil de bandejamento é relatado na literatura ser encontrado para linhagens mutantes em proteínas envolvidas na regulação do relógio circadiano do fungo (BORKOVICH, ET AL., 2004), corroborando com os resultados encontrados para a produção de carotenoides defectiva e alteração na percepção de luz azul para esta linhagem.

A taxa de crescimento linear das hifas basais foi determinada para as linhagens Δnpf e $\Delta npf::npf$, tendo como *background* a linhagem selvagem do fungo. Os resultados obtidos mostraram que a linhagem mutante tem uma velocidade de extensão apical das hifas basais mais lento que as linhagens selvagem e complementada em 1/3, conforme mostra a Figura 11B. Sabendo-se que o relógio biológico afeta a extensão das hifas basais no fungo e que muitos estudos demonstram que alterações morfológicas podem surgir em função da ritmicidade do relógio biológico (BAKER; LOROS; DUNLAP, 2012) e considerando os fortes indícios obtidos até o momento, é provável que a proteína NPF seja controlada pelo relógio biológico ou que ela esteja envolvida em respostas biológicas rítmicas. Os resultados obtidos

deixam evidente a participação da proteína NPF no evento de extensão das hifas basais do fungo.

Uma vez que a proteína NPF foi isolada na condição de estresse térmico, ligando um fragmento de DNA do promotor *gsn* de maneira dependente de STRE (FREITAS ET AL., 2008) e sabendo-se que em *N. crassa*, o choque térmico causa uma redução no conteúdo de glicogênio após choque térmico, a qual é decorrente da modulação negativa do gene *gsn*, de maneira dependente do binômio SEB1-STRE (FREITAS ET AL., 2016), prosseguimos os nossos estudos determinando o conteúdo de glicogênio na linhagem nocauteada. Para isto, as linhagens do fungo Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram submetidas a um ensaio de estresse térmico em meio líquido tendo como controle a linhagem selvagem, os micélios obtidos foram isolados e utilizados para determinar o conteúdo de glicogênio. Embora o acúmulo de glicogênio após choque térmico seja o mesmo apresentado pela linhagem selvagem (Figura 12, comparar linhagens WT e Δnpf), é possível observar que o conteúdo global do carboidrato acumulado encontra-se significativamente reduzido na linhagem mutante, antes e depois do estímulo estressante, sugerindo que eventos de remodelagem de cromatina provavelmente devem atuar na resposta ao choque térmico juntamente com outras proteínas, sugerindo a participação da proteína NPF na repressão da expressão dos genes envolvidos no acúmulo deste carboidrato no fungo, corroborando com os resultados de acúmulo de glicogênio publicados pelo nosso grupo para *Neurospora* durante o choque térmico.

Como o acúmulo de glicogênio e a caracterização morfológica da linhagem $\Delta npf::npf$ foram semelhantes aos encontrados para a linhagem selvagem, concluímos que a complementação da linhagem mutante foi satisfatória e que os resultados encontrados até este momento para a linhagem mutante de fato decorrem da ausência do gene *npf*, o que nos permite inferir a partir deste momento, novos papéis para a proteína NPF, baseando-se nos resultados encontrados para todas as análises realizadas com esta linhagem neste trabalho.

3. NPF e a sensibilidade de *N. crassa* a diferentes estímulos estressantes

Para avaliar a participação da proteína NPF na modulação da resposta do fungo a diferentes estímulos estressantes, a linhagem mutante Δnpf mutante complementa $\Delta npf::npf$ foram cultivadas tendo como *background* o cultivo da linhagem selvagem do fungo nas mesmas condições ambientais, tais como o estresse térmico, o estresse osmótico, o estresse de pH, estresse oxidativo e estresse de retículo, uma vez que na levedura *S cerevisiae* o motivo STRE é responsável pela modulação da expressão de genes responsivos a diferentes condições estressantes (FRANÇOIS E PARROU, 2001) e em *N. crassa*, a proteína NPF está associada a evento de remodelagem de cromatina e foi inicialmente isolada ligando um fragmento de DNA contendo elemento STRE durante o choque térmico (FREITAS ET AL., 2008).

O primeiro ensaio de estresse teve como objetivo avaliar a contribuição da proteína NPF na resposta do fungo ao **estresse térmico**. Para isto, as linhagens selvagem, mutante e

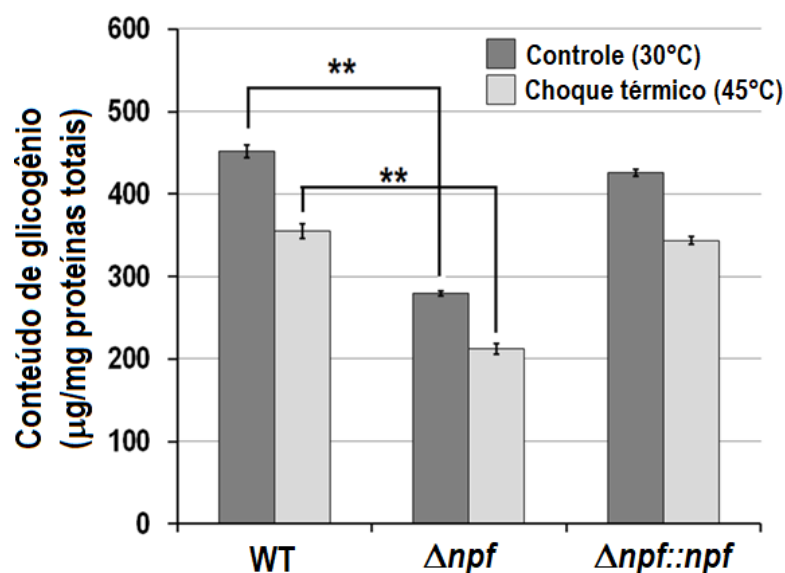


Figura 12. A linhagem Δnpf apresenta acúmulo de glicogênio defectivo durante o estresse térmico. Culturas líquidas das linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram expostas a um aumento de temperatura de 30°C para 45°C durante 30 minutos. Após o choque térmico, os micélios foram coletados e usados para o preparo de extratos celulares e posterior quantificação de glicogênio, conforme descrito em Materiais e Métodos. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$).

complementada foram cultivadas a 45°C durante 24 h e em seguida, transferidas para a temperatura ambiente de 30°C por mais 24 h (Figura 13). Nesta condição, observamos que a linhagem nocauteada não apresentou crescimento quando cultivada na temperatura de 45°C, enquanto a linhagem selvagem e mutante complementada apresentou uma discreta formação de colônia, com um raio bem pequeno (Figura 13, comparar os crescimentos em placa das linhagens WT e Δnpf cultivadas a 45°C/24 h e observar os raios das colônias obtidas após cultivo nas condições de alta temperatura).

Uma vez que a linhagem mutante não apresentou crescimento após 24 h a 45°C, a fim de descartarmos a possibilidade de que o efeito defectivo observado sobre o crescimento fosse decorrente da inviabilização dos conídios pela exposição a alta temperatura por um longo período, transferimos a cultura para a temperatura de crescimento vegetativo do fungo (30°C) e a mantivemos nestas condições por 24 h (recuperação). A recuperação demonstrou a formação de colônias para ambas as linhagens (Figura 13; comparar os cultivos a 45°C com os obtidos a 30°C/24 h). Diante destes resultados, concluímos que a falha no desenvolvimento da colônia da linhagem Δnpf a 45°C pode ser atribuído à ausência de *npf* e não à viabilidade dos conídios inoculados, uma vez que após serem transferidas para a temperatura de 30°C, as linhagens foram capazes de se desenvolver e alcançar a mesma aparência apresentada na Figura 11. A linhagem $\Delta npf::npf$ reproduziu o comportamento selvagem antes e após o evento estressante.

A alta sensibilidade exibida pela linhagem nocauteada frente ao aumento de temperatura (45°C) torna evidente que a proteína NPF participa de processos celulares relacionados ao estresse térmico. De acordo com a literatura, os STRE são reconhecidos e ligados pela proteína SEB-1 e estão associados a eventos de repressão da expressão gênica (FREITAS ET AL., 2008 E 2016). O gene *gsn* (enzima glicogênio sintase), mostrou ser reprimido durante a condição de estresse térmico (FREITAS E BERTOLINI, 2004), de maneira dependente de STRE (FREITAS ET AL., 2008). Durante a determinação do regulon *seb-1*, utilizando uma linhagem do fungo $\Delta seb-1$, foi identificado que *npf* sofre uma regulação negativa durante o choque térmico, de maneira dependente de STRE, sugerindo que durante eventos de estresse, a proteína NPF deve estar sendo expressa de maneira a participar na modulação da expressão gênica e, conseqüentemente, na resposta adaptativa de *Neurospora* a eventos de estresse regulados por SEB-1. Jamieson et al. (2013) mostraram que os genes marcados pelo sinal H3K27me3 não estão conservados entre as diferentes espécies, sendo que muitos deles são encontrados somente em fungos, mais especificamente, na classe *Sordariaceae* e o gênero *Neurospora*, como se estivessem servindo de mecanismo de silenciamento genético nos genomas destes fungos.

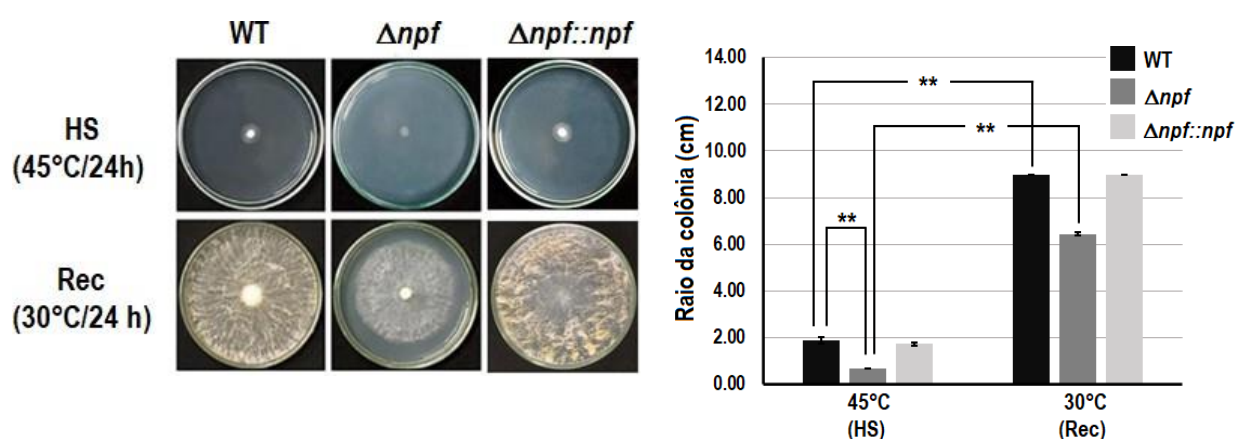


Figura 13. Δnpf exibe sensibilidade a estresse térmico. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2% por 24 h a 45°C e em seguida transferidas para a temperatura de 30°C e cultivadas nesta condição por mais 24h, para analisar a recuperação. Os raios das colônias foram determinados antes e depois do choque térmico e estão apresentados no gráfico. **HS-** Choque térmico a 45°C (*heat shock*). **Rec-** Recuperação a 30°C. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$)

Para avaliar o envolvimento de NPF sobre o **estresse osmótico**, as linhagens foram cultivadas em meio VM sólido, contendo NaCl (Figura 14) ou sorbitol (Figura 15), em concentrações crescentes. Comparado ao crescimento exibido pela linhagem selvagem na presença dos agentes estressantes, quando cultivada na presença de NaCl, a linhagem Δnpf demonstrou um desenvolvimento colonial prejudicado nas primeiras 24 h de cultivo (Figura 14) e este crescimento defectivo torna mais evidente após 48 h de cultivo, para a concentração de 800 mM de NaCl (Figura 14). Embora o perfil de redução dos raios das colônias formadas pelas linhagens mutante e selvagem sejam semelhantes, é possível observar que após 48 h de cultivo, a dificuldade de adaptação da linhagem mutante torna-se mais evidente em 800 mM e 1,0 M de NaCl, sugerindo uma participação de NPF na modulação da resposta adaptativa a altas concentrações de sal a longo prazo (Figura 14). Para o estresse com sorbitol, uma redução significativa do raio da colônia desenvolvida pela linhagem mutante pode ser observada em 1,0 M e esta redução fica bastante evidente após 48 h de cultivo, conferindo à NPF um papel na resposta adaptativa do fungo a altas concentrações de açúcares (Figura 15). A linhagem $\Delta npf::npf$ reproduziu o comportamento selvagem antes e após o evento estressante, para todos os agentes osmóticos usados.

O envolvimento da proteína NPF na adaptação de *Neurospora* a eventos de **estresse oxidativo** também foi avaliado. Para isto, em um primeiro momento foram preparados meios de cultivo contendo os agentes oxidantes paraquat, menadiona e peróxido de hidrogênio, em concentrações crescentes. O conceito de estresse oxidativo baseia-se na relação entre os níveis celulares de oxidantes e antioxidantes. As células eucarióticas possuem um mecanismo de resposta ao estresse oxidativo bastante elaborado e ainda pouco conhecido, embora muito estudado. Diversas enzimas antioxidantes, como as superóxido dismutases (encontradas no citoplasma e mitocôndrias, geram peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos), as catalases (presentes nos peroxissomos, degradam peróxido de hidrogênio e alguns radicais hidroperóxidos) e glutathione peroxidases (presentes no citoplasma e mitocôndrias, quando em presença de glutathione reduzida degradam peróxido de hidrogênio e outros compostos aromáticos e não aromáticos substituídos capazes de gerar ROS) encontram-se envolvidas na eliminação direta ou indireta de radicais livres intracelulares.

O paraquat é um composto quaternário de amônio herbicida que atua como um potente agente redutor do tipo viológeno, cuja redução é dependente de $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Quando oxidado por O_2 , o paraquat se regenera e forma uma grande quantidade de ânions superóxido, principais alvos das superóxido-dismutases. A menadiona ou vitamina K3 é uma quinona (cetona aromática policíclica) que nas células eucarióticas, ou pode ser reduzida ao seu radical semiquinona altamente instável por ação uma redutase dependente de $\text{NADPH} + \text{H}^+$, ou pode ser convertida à sua forma hidroquinona mais estável sendo facilmente excretada por ação de uma oxidoredutase, também na presença de $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Sua forma instável,

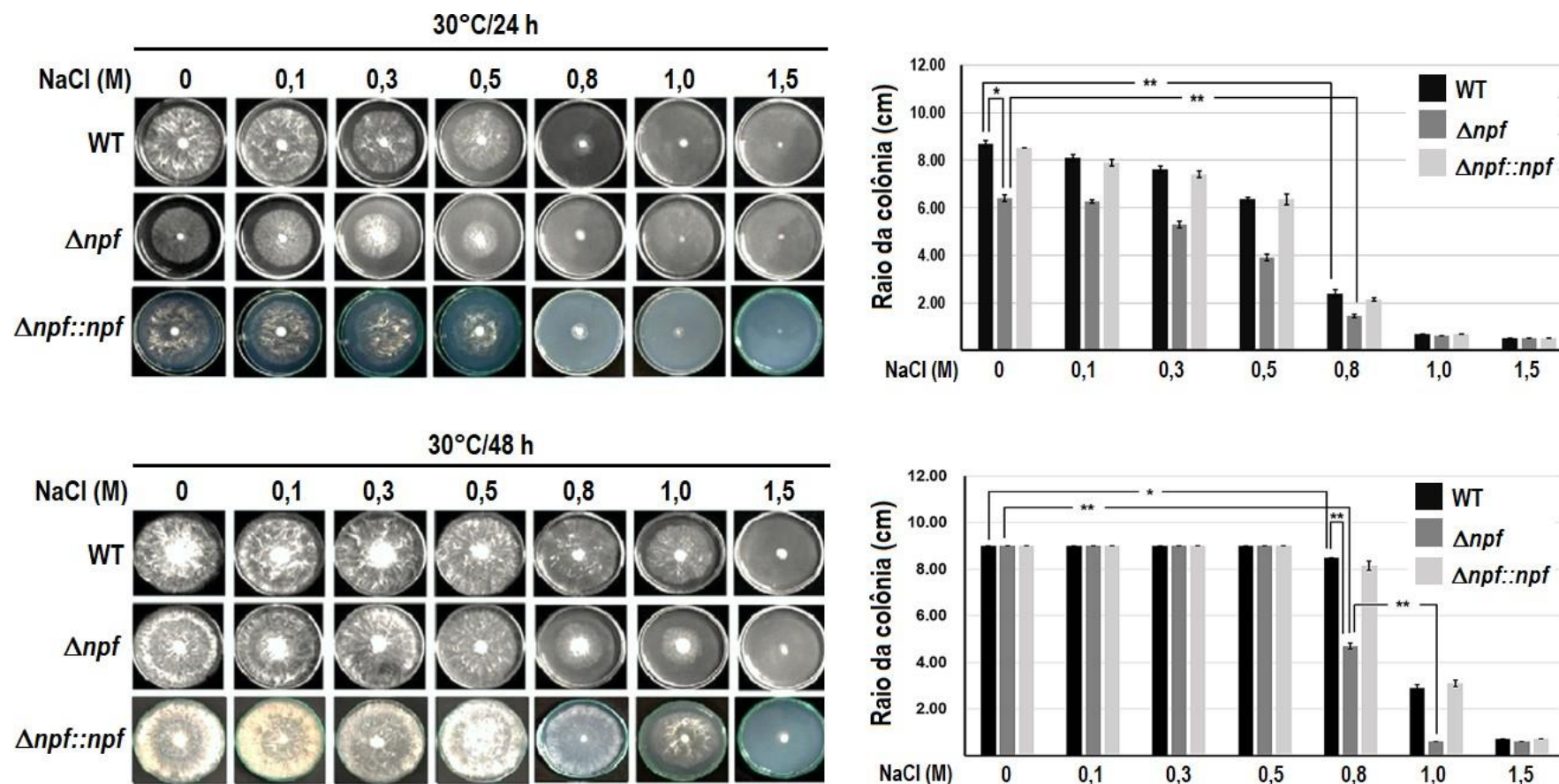


Figura 14. Δnpf exibe sensibilidade a estresse osmótico causado por NaCl. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2% e quantidades crescentes de NaCl por 24 h e 48 h. Os raios das colônias foram determinados na ausência e na presença das diferentes concentrações de agente estressante e estão apresentados no gráfico. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

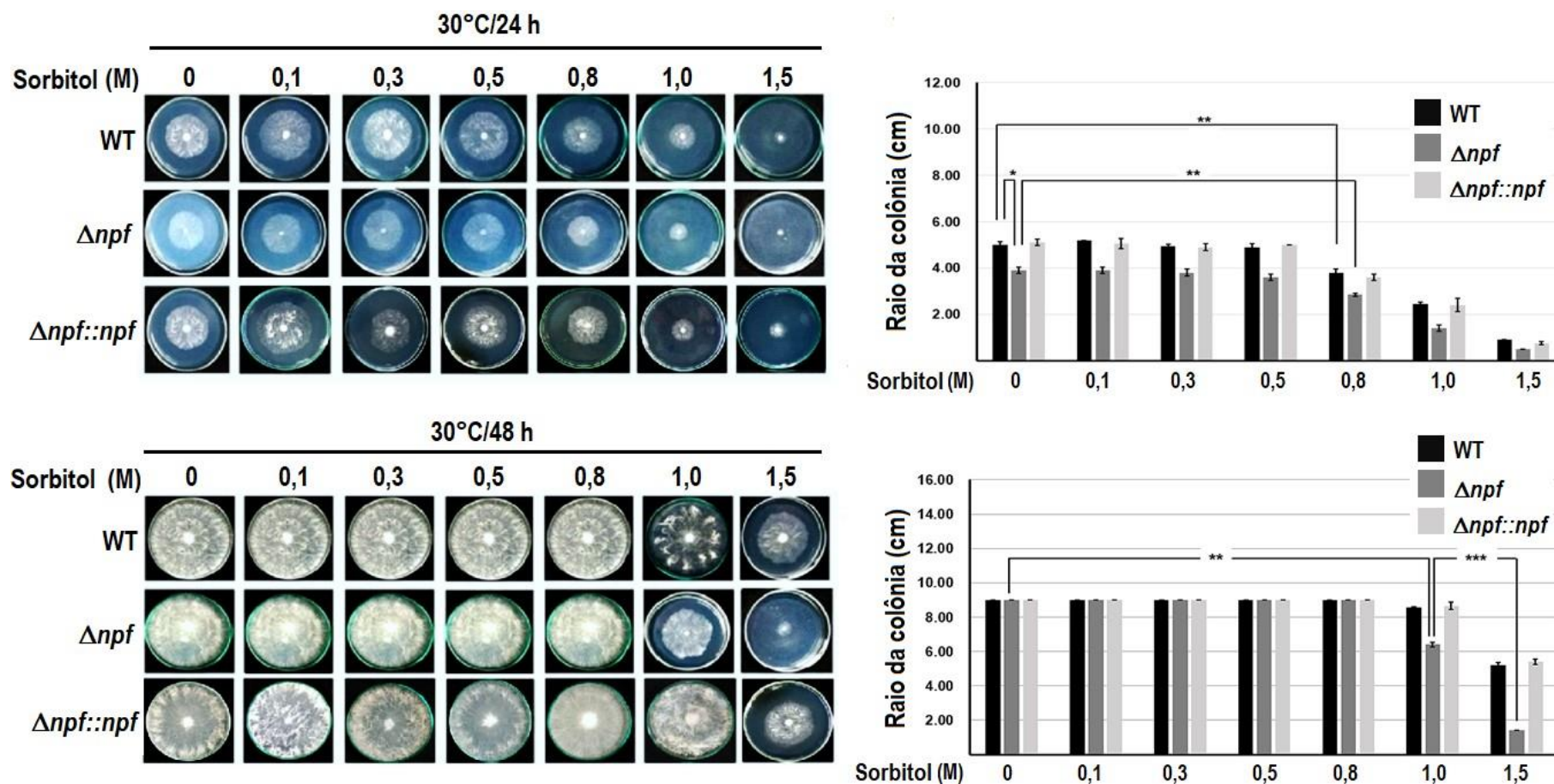


Figura 15. Δnpf exibe sensibilidade a estresse osmótico causado por sorbitol. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2% e quantidades crescentes de sorbitol por 24 h e 48 h. Os raios das colônias foram determinados na ausência e na presença das diferentes concentrações de agente estressante e estão apresentados no gráfico. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

por sua vez, pode ser novamente convertida na sua forma estável na presença de oxigênio, fechando um ciclo de oxirredução, onde a oxidação da semiquinona libera radicais superóxidos e, conseqüentemente, causa um estresse oxidativo na célula. A remoção das semiquinonas é mediada por glutathione, a qual se acopla neste metabólito formador de ROS e após sucessivas reações de oxirredução torna as semiquinonas hidrossolúveis e facilmente excretadas, impedindo o estresse oxidativo. Já o peróxido de hidrogênio é um composto químico altamente reativo e, portanto, capaz de remover grande quantidade de ROS. É formado através da dismutação dos radicais superóxidos ou então, pela redução direta de O_2 e degradado pelas catalases nos peroxissomos. Portanto, quando escolhemos como agentes estressantes o paraquat, a menadiona e o peróxido de hidrogênio, objetivamos analisar de modo mais abrangente possível, o provável envolvimento de NPF na resposta adaptativa do fungo analisando, especificamente, as vias que ativam a superóxido dismutase, as vias que usam a glutathione / glutathione peroxidase para a remoção de xenobióticos e as vias que ativam as catalases nos peroxissomos, uma vez que estas três vias se encontram em locais distintos na célula.

Para o estresse oxidativo provocado por adição de paraquat ao meio VM (Figura 16), embora ambas as linhagens apresentem o mesmo perfil de redução dos raios das colônias frente ao agente estressante, o envolvimento da proteína NPF torna-se evidente com 24 h de cultivo do fungo em 100 μM do viológeno, onde pode ser observada uma redução significativa do raio da colônia formada pela linhagem mutante comparado à linhagem selvagem na mesma condição. Estes resultados foram mantidos após 48 h de cultivo para a mesma condição, sugerindo que a resposta adaptativa de *Neurospora* a eventos estressantes envolvendo a via de detoxificação celular mediada pela superóxido dismutase requer a participação de NPF, sobretudo para altas concentrações de paraquat.

Para a menadiona (Figura 17), assim como para o paraquat, a redução nos diâmetros das colônias desenvolvidas para as linhagens selvagem e mutante exibiram o mesmo perfil. No entanto, a redução no raio da colônia desenvolvida para a linhagem mutante se mostrou defectivo em relação à linhagem selvagem após 24 h de cultivo, nas concentrações de 250 e 500 μM , tornando-se mais evidente esta diferença no tempo de 48 h. Os resultados obtidos demonstraram que, assim como para o paraquat, a tolerância do fungo a altas concentrações de menadiona ficaram prejudicadas na ausência de NPF, o que nos permitiu inferir que a via detoxificação mediada por glutathione neste fungo também é regulada por eventos de remodelagem de cromatina dependente de NPF.

Quando o peróxido de hidrogênio foi usado como agente oxidante, tanto a linhagem selvagem quanto a linhagem mutante exibiram altíssima sensibilidade, com uma redução significativa nos diâmetros das colônias desenvolvidas para as diferentes concentrações testadas (Figura 18). Embora os perfis de redução tenham sido semelhantes para as

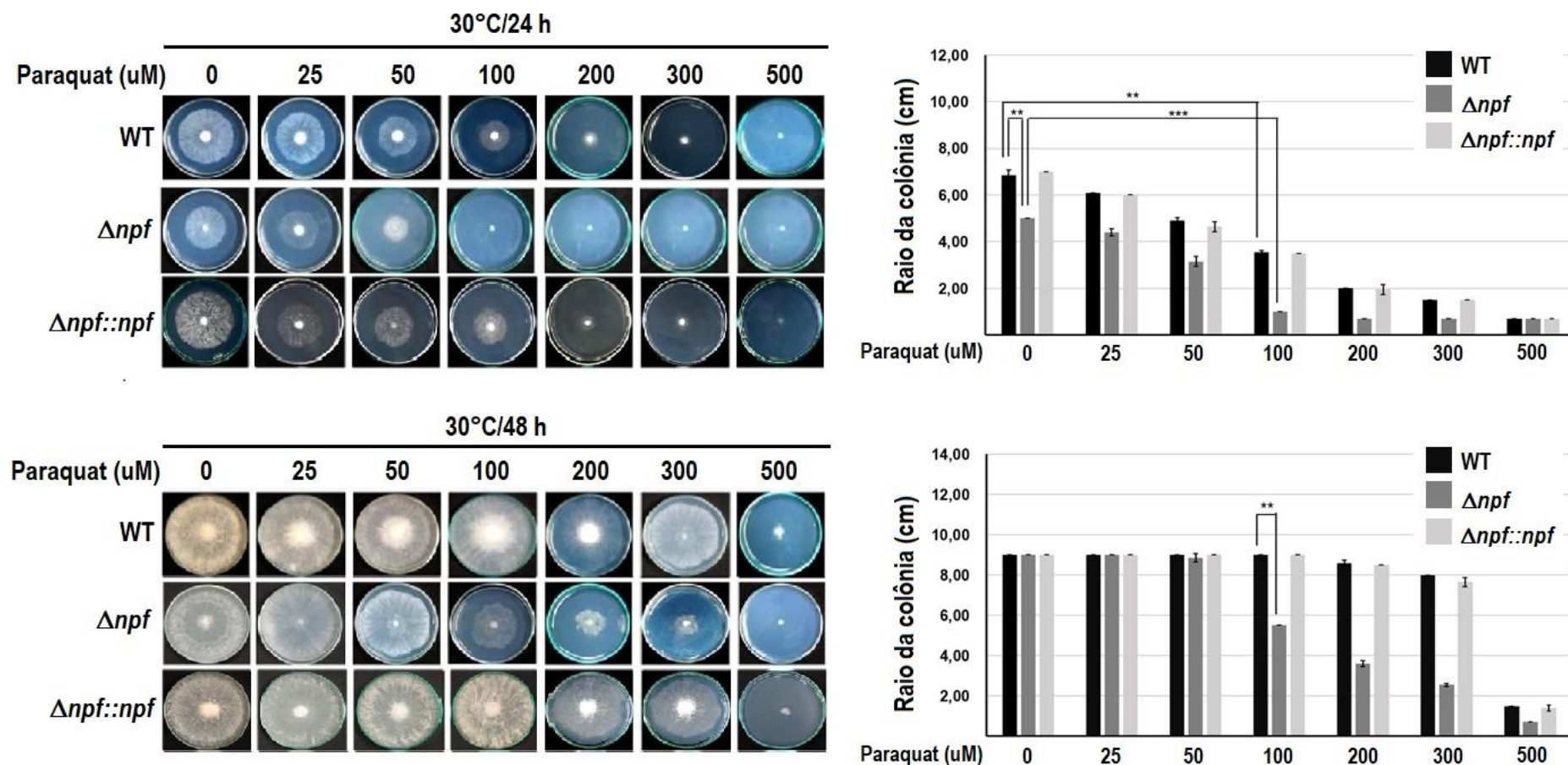


Figura 16. Δnpf exibe sensibilidade a estresse oxidativo causado por paraquat. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2% e quantidades crescentes de paraquat por 24 h 48 h. Os raios das colônias foram determinados na ausência e na presença das diferentes concentrações de agente estressante e estão apresentados no gráfico. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

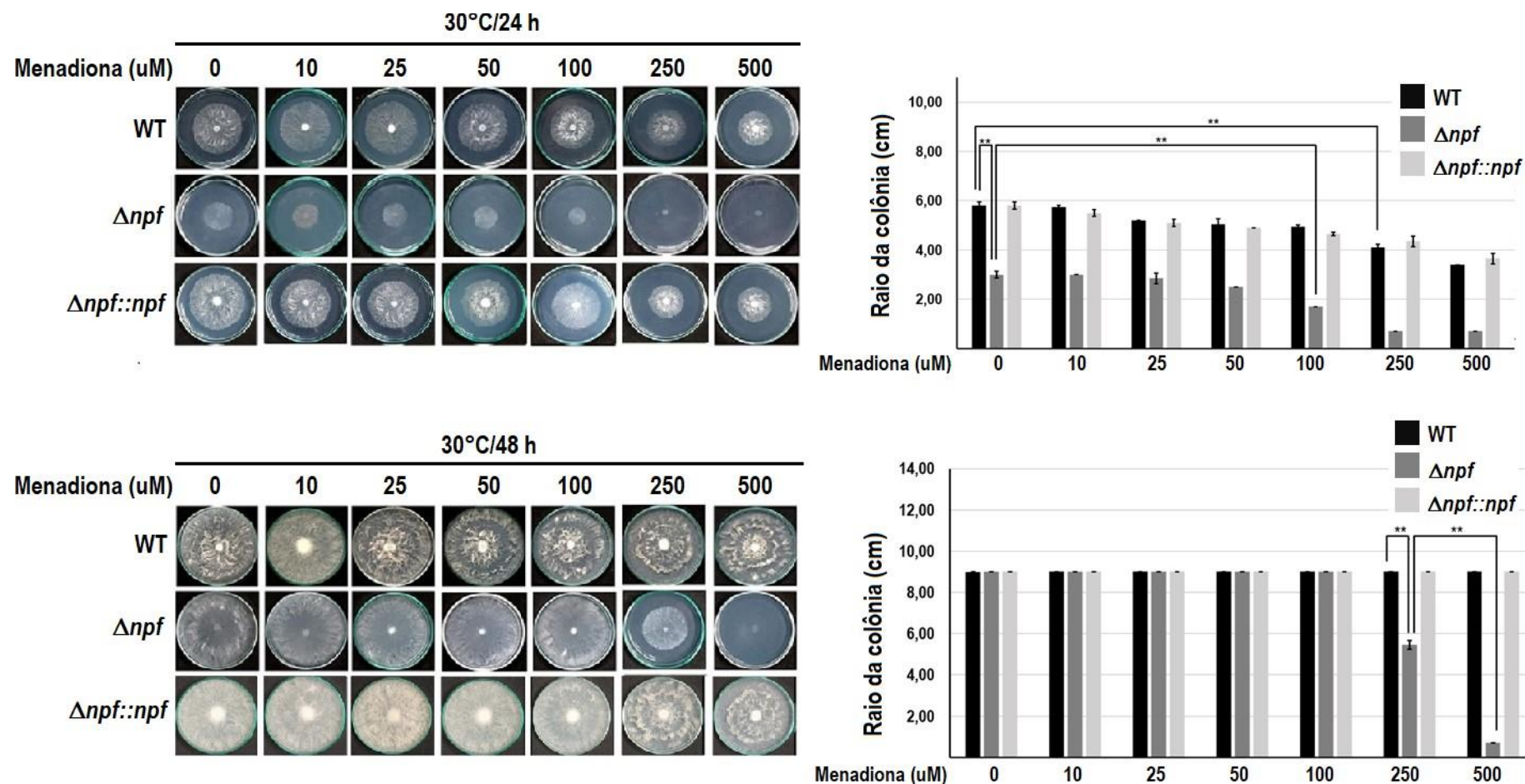


Figura 17. Δnpf exibe sensibilidade a estresse oxidativo causado por menadiona. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2% e quantidades crescentes de menadiona por 24 h e 48 h. Os raios das colônias foram determinados na ausência e na presença das diferentes concentrações de agente estressante e estão apresentados no gráfico. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$).

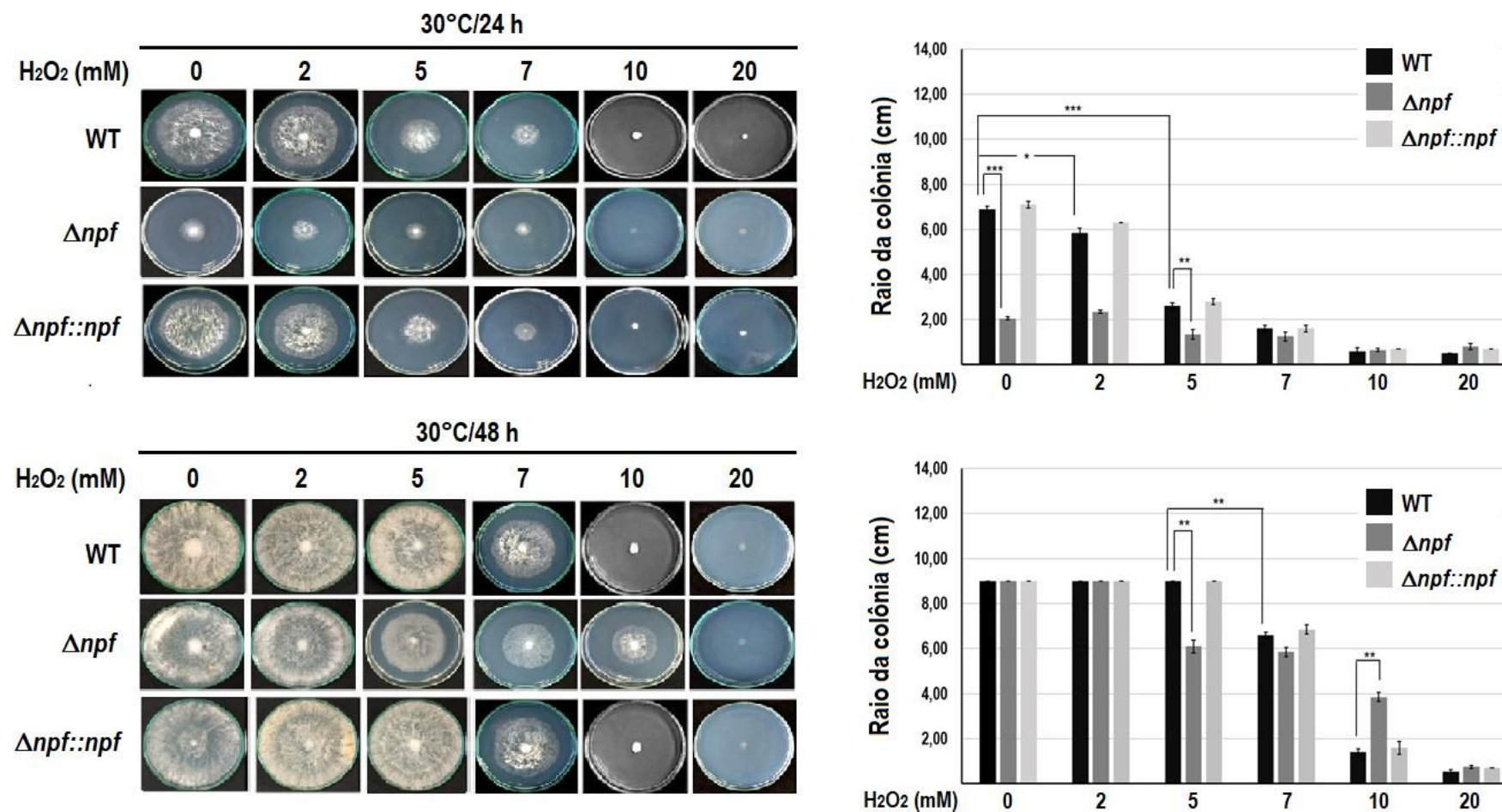


Figura 18. Δnpf exibe sensibilidade a estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2% e quantidades crescentes de H₂O₂ por 24 h e 48 h. Os raios das colônias foram determinados na ausência e na presença das diferentes concentrações de agente estressante e estão apresentados no gráfico. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

linhagens WT e Δnpf , esta semelhança perdurou apenas até a concentração de 7 mM, sendo que para a concentração de 10 mM foi observada uma resposta inversa para a linhagem mutante, sinalizando que o mecanismo de resposta adaptativa de *Neurospora* ao estresse causado por peróxido de hidrogênio que ocasiona a redução do crescimento colonial em resposta ao agente estressante perde sua regulação a partir desta concentração, quando NPF encontra-se ausente, perda esta que pode ser confirmada pela concentração de 20 mM. Além disso, comparado à linhagem selvagem, a linhagem mutante Δnpf apresentou também uma redução de crescimento significativa na concentração de 5 mM que foi mantida na concentração de 7 mM no tempo de 24 h, sugerindo que a concentração de 5 mM seja limitante para disparar eventos transcricionais modulando a inibição do crescimento do fungo nesta condição (Figura 18). Portanto, podemos inferir que o processo de detoxificação do fungo controlado pela via das catalases também é regulado por eventos epigenéticos mediados pela proteína NPF e que devido as diferenças de crescimento observadas para as concentrações de 5 mM e 10 mM, provavelmente NPF está envolvida nestas respostas participando de diferentes complexos proteicos regulatórios. A linhagem $\Delta npf::npf$ reproduziu o comportamento selvagem antes e após o evento estressante, em todos os ensaios de estresse oxidativo.

O estresse causado por **alterações de pH** nos meios intra e extracelular também foi analisado em *N. crassa* (Figura 19). O pH fisiológico de crescimento de *N. crassa* é ao redor de 5,8. Alterações de pH acarretam um desequilíbrio no potencial de membrana da célula, com consequente oxidação dos lipídeos de membranas e a geração de ROS. Quando cultivadas em pH ácido (pH 4,2), ambas as linhagens selvagem e mutante exibiram a mesma tolerância às altas concentrações de íons hidrônio, demonstrando que a resposta adaptativa de *N. crassa* encontra-se preservada para esta condição e que NPF não participa da regulação da expressão gênica que corrobora para a adaptação do fungo ao pH ácido do meio de cultivo. No entanto, quando as linhagens WT e Δnpf são cultivadas em valores de pH alcalino (pH 7,2 e pH 7,8), tanto a linhagem selvagem quanto a linhagem mutante apresentaram crescimentos defectivos significativos com 24h de cultivo, com perfis semelhantes de redução para o pH 7,2. Contudo, em pH 7,8 o decaimento observado no crescimento da linhagem selvagem não foi acompanhado pela linhagem mutante, que permaneceu semelhante ao pH 7,2 (Figura 19, comparar os raios das colônias obtidas para a linhagem mutante em 24h e 48h para valores de pH 7,2 e pH 7,8). Esta perda da regulação observada para a linhagem Δnpf em pH 7,8 tornou-se mais evidente após 48h de cultivo, sugerindo que NPF é importante para a regulação da resposta adaptativa do fungo em condições de pH alcalino.

É importante considerar que uma alteração de valores de pH no meio não implica apenas em gerar um ambiente oxidante para a célula – o excesso de íons hidrônio (H^+) ou

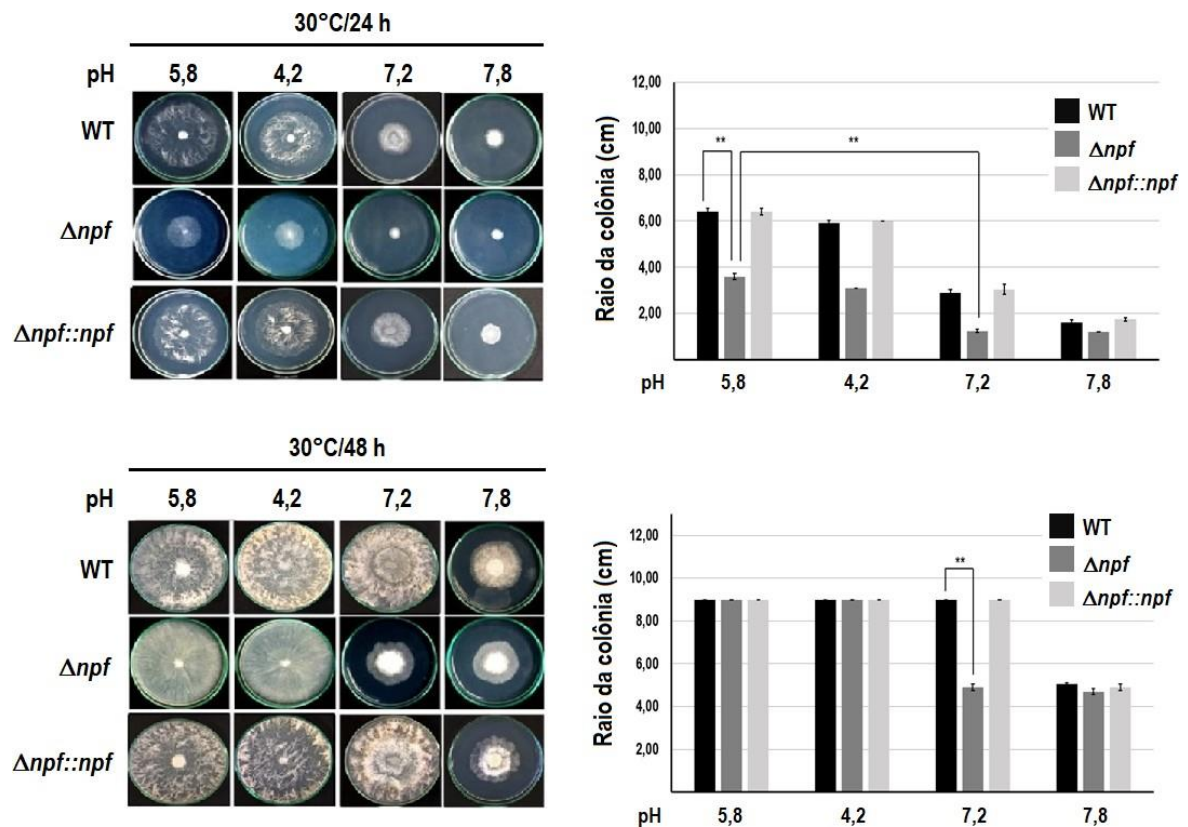


Figura 19. Δnpf exibe sensibilidade a altos valores de pH. As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2%, em valores de pH ácido (4,2) e alcalinos (7,2 e 7,8) em relação ao pH fisiológico de crescimento do fungo (pH 5,8), durante 24 h e 48 h. Os raios das colônias foram determinados nos diferentes valores de pH e estão representados no gráfico. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$).

hidróxido (OH^-) também submete as células a um estresse osmótico ocasionado por estas espécies. Logo, ao aplicarmos um estresse de pH, é necessário considerarmos tanto a formação de um ambiente oxidante quanto de um ambiente hiperosmótico.

Sabe-se que em plantas, estresse salino-alkalino respondem pelos seus desenvolvimentos e afetam diretamente o agronegócio. Solos alcalinos-salinos apresentam uma alta concentração de íons sódio (Na^+) e altos valores de pH e ocasionam efeitos estressantes importantes nas culturas de grãos, quando comparados a solos salinos com pH neutro, afetando drasticamente a função fotossintética e o metabolismo de nitrogênio da planta, ocasionando prejuízo financeiro para o setor agrícola (TANG ET AL., 2014; WANG ET AL., 2021). Para sobreviver, as plantas que crescem em solos salino-alkalinos precisam lidar com a perda fisiológica de água e a toxicidade do Na^+ , além do dano celular induzido pelo alto pH (CHENG ET AL., 2020; LIU ET AL., 2010).

Neste contexto, fungos halo e/ou alcalifílicos são agentes promissores para a biorremediação de solos salinos-alkalinos. Felizmente, nas últimas décadas, uma série de fungos halofílicos e alcalifílicos capazes de viver em ambientes altamente salinos e alcalinos (ou ambos) foram identificados, sendo grande parte deles pertencentes aos gêneros *Eurotium* e *Aspergillus* (WEI E ZHANG, 2017). *Aspergillus sydowii* e *Aspergillus destruens* foram a primeira demonstração de que ascomicetos halofílicos (e não basidiomicetos) podem ser usados no tratamento de águas residuais salinas (GONZÁLEZ-ABRADELO ET AL., 2019). É importante ressaltar que estes fungos representam um recurso extremamente considerável para a clonagem de genes relacionados à resistência (ou tolerância) abiótica e podem ser aplicados futuramente para melhorar ou criar fungos altamente ativos para biorremediação de solos salinos-alkalinos. Além disso, foi recentemente demonstrado que a resposta adaptativa de uma espécie de arroz ao estresse salino-alkalino é dependente da ativação transcricional de genes por meio da metilação do resíduo de lisina K4 da histona H3 (H3K4me3) por uma proteína contendo um domínio SET (LIU ET AL., 2021).

Neurospora é um ascomiceto bastante promissor para ser explorado neste aspecto. Sua via de sinalização Osmoticamente Sensível mediada por MAPK (via OS) é altamente conservada e relacionada à via HOG de *S. cerevisiae* – é uma via que sente e responde a múltiplos estresses ambientais, porém é mais conhecida por seu papel em resposta a choques hiperosmóticos (JONES ET AL., 2007; POSAS ET AL., 2000; ZHANG ET AL., 2002; HOHMANN, 2002; KRANTZ ET AL., 2006). Considerando a diversidade funcional de processos celulares que são afetados no fungo em estresse alcalino (VIRGILIO E BERTOLINI, 2018) e os resultados obtidos neste trabalho para os estresses osmótico com NaCl (Figura 14, observar a perda da regulação na linhagem mutante em 1,5 M de sal) e alcalino (Figura 19, observar a perda de regulação na linhagem mutante em pH 7,8), podemos inferir que NPF participa de alguma maneira, da via de sinalização OS e da via de sinalização

de pH mediada por PAC-3 e com isto, tornar NPF um alvo interessante a ser explorado em estudos de biorremediação de solos salino-alcálinos.

A participação da proteína NPF na tolerância ao estresse causado por íons cálcio (Ca^{+2}) também foi analisada (Figura 20). Íons cálcio atuam como segundos mensageiros intracelulares de modo bastante versátil, regulando uma grande variedade de processos celulares e respostas adaptativas em organismos eucariotos (BERRIDGE ET AL.; 1998; SANDERS ET AL., 2002; DAVIES E TERHSAZ, 2009). Contudo, altas concentrações deste íon são tóxicos para a célula, logo sua presença livre no citoplasma é altamente regulada tanto no fungo (CORNELIUS E NAKASHIMA, 1987) quanto em humanos (BERRIDGE ET AL. 1998). Sua sinalização intracelular é disparada quando níveis de Ca^{+2} citossólicos livres (níveis basais) aumentam e estes são mantidos por mecanismos de transporte através da membrana plasmática e organelas (BARMAN E TAMULI, 2015).

Em *Neurospora*, o cálcio participa de diferentes processos biológicos, tais como regulação da conidiação, crescimento, ramificação das hifas, transporte de íons, desenvolvimento sexual do fungo, tolerância a estresse, termotolerância e adaptação e sobrevivência a radiação UV (DEKA ET AL., 2011; TAMULI ET AL., 2011 E 2016; KUMAR E TAMULI, 2014; BARMAN E TAMULI, 2015 E 2017; LAXMI E TAMULI, 2015 E 2017). Uma análise do genoma do fungo revelou que o sistema de sinalização mediado por cálcio é complexo e bastante diferente de plantas e animais, especialmente com relação aos sistemas de transdução de sinal e segundos mensageiros responsáveis pela liberação de cálcio a partir do seu estoque no retículo endoplasmático rugoso (GALAGAN ET AL. 2003). *Neurospora* possui em seu genoma do fungo existem nove genes codificando proteínas com função ATPásica dependentes de Ca^{+2} , três genes codificando proteínas canais de cálcio, pelo menos seis proteínas fazendo o simporte entre Ca^{+2} e H^{+} , quatro genes codificando subunidades de fosfolipase C, 23 genes codificando proteínas ligadoras de Ca^{+2} /calmodulina (CaM), além de um gene codificando uma proteína altamente relacionada com o sensor neuronal de cálcio-1 (NCS-1) de mamíferos (GALAGAN ET AL. 2003; TAMULI ET AL. 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que as linhagens WT e Δnpf exibem sensibilidade a concentrações elevadas de íons cálcio após 24h de cultivo, sendo esta sensibilidade bastante acentuada a partir da concentração de 500 mM do íon (Figura 20). No entanto, foi observado que após 48h de cultivo, o efeito dos íons sobre o crescimento radial das linhagens permaneceu apenas para a concentração de 500 mM, sendo que para concentrações mais altas (Figura 20, comparar as concentrações de 700 mM e 1,0 M), ambas as linhagens exibiram a mesma inibição, sinalizando uma perda de regulação. No entanto, mesmo apresentando um comportamento semelhante à linhagem WT, a redução de crescimento em resposta ao cálcio exibida pela linhagem Δnpf é significativamente maior, sugerindo que NPF provavelmente participa da regulação do influxo de cálcio pela célula.

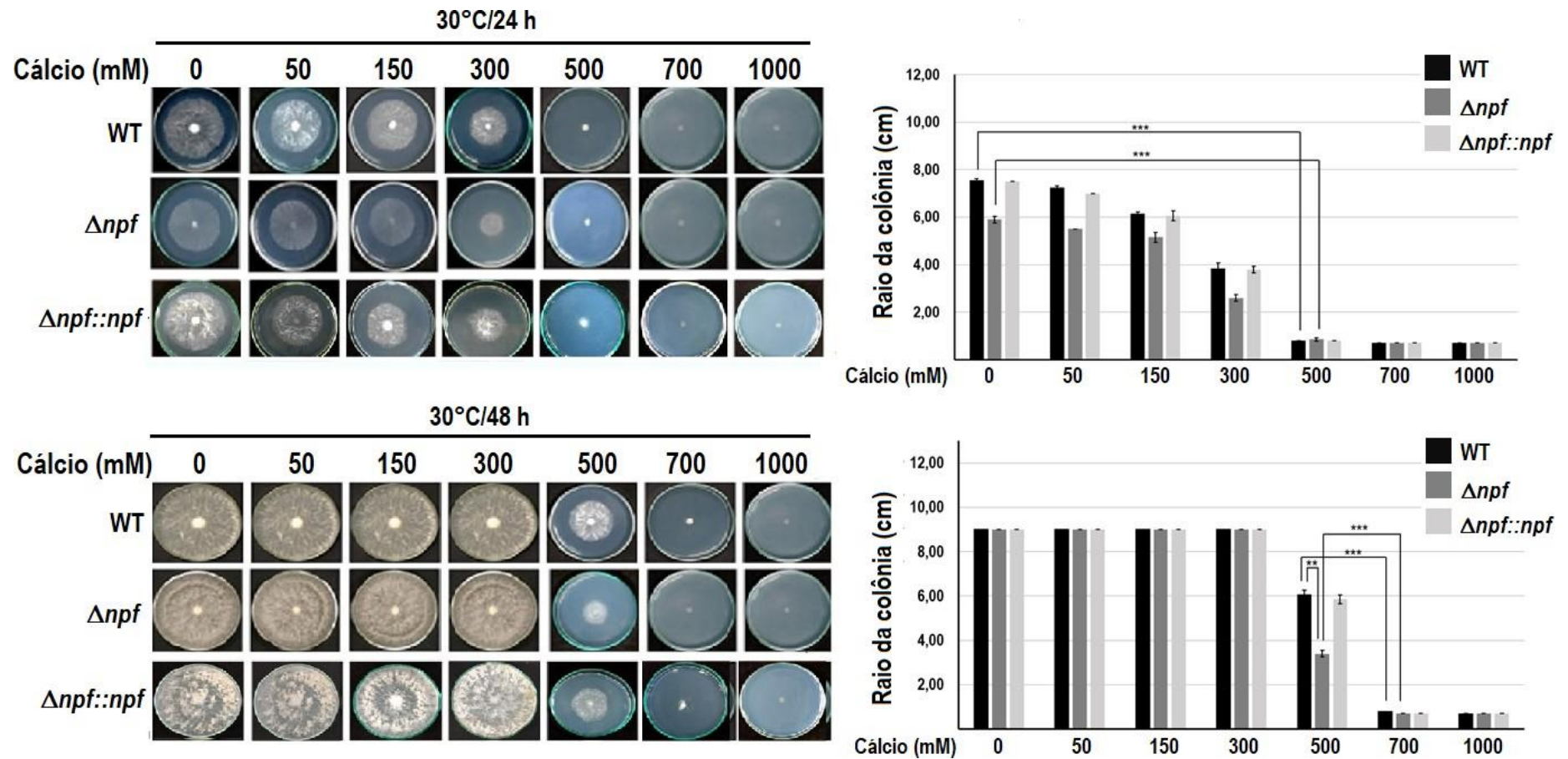


Figura 20. Estresse com cálcio afeta o crescimento da linhagem Δnpf . As linhagens WT, Δnpf e $\Delta npf::npf$ foram cultivadas a 30°C em placas de Petri contendo meio VM acrescido de sacarose 2%, em concentrações crescentes de cloreto de cálcio, durante 24 h e 48 h. Os raios das colônias foram determinados nos diferentes valores de pH e estão apresentados nos gráficos. As barras de erros representam os desvios padrões. Para as análises estatísticas foram usados dados de 3 experimentos independentes e as significâncias entre as linhagens foram estimadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey-Kramer (** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Além disso, para os eventos de sinalização intracelular mediados por cálcio, a participação da proteína NPF deve acontecer de maneira indireta e não deve ser a forma predominante de modulação da resposta ao íon no fungo.

Em uma tentativa de estabelecer qual seria a sublocalização celular da proteína NPF durante os eventos estressantes estudados, realizamos inicialmente ensaios de estresse térmico em meio VM líquido utilizando conídios da linhagem complementada, a qual expressa a proteína de fusão NPF-sfGFP. Para isto, os conídios foram cultivados sobre lamínulas submersas em meio VM, as culturas foram submetidas ou não a um aumento de temperatura de 45°C e as fluorescências dos micélios formados foram monitoradas em um microscópio óptico de fluorescência (AXIO Imager.A2 Zeiss) acoplado a uma câmera (AXIO-Cam MR3), utilizando filtro para GFP. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 21. As imagens revelam que NPF-sfGFP está sendo produzida na linhagem complementada e sugerem uma localização nuclear durante o estresse térmico, uma vez que a mesma se encontra concentrada nos núcleos das hifas quando comparado às imagens obtidas para o micélio não submetido ao estresse, que apresenta NPF-sfGFP dispersa no citoplasma. No entanto, estes resultados ainda são preliminares e necessitam ser repetidos para confirmarmos as possíveis sublocalizações de NPF neste e nos demais eventos de estresse estudados aqui.

O conjunto de resultados que apresentamos neste trabalho demonstraram claramente a participação de NPF na resposta celular de *Neurospora* frente a diferentes desafios ambientais, como aumentos de temperatura, presença de agentes oxidantes, ambientes hiperosmóticos e excesso de cálcio. Diante disso, podemos inferir a NPF um importante papel na modulação da expressão de genes regulatórios envolvidos em respostas adaptativas do fungo frente a estímulos ambientais. Como NPF é apenas um dos quatro componentes centrais do complexo repressor PRC2, podemos por hora especular que diferentes proteínas parceiras, além das identificadas neste trabalho baseadas em evidências, possam estar intermediando juntamente com NPF a ação repressora de PRC2 em eventos de remodelagem de cromatina, controlando a expressão de genes responsivos a estresse, possivelmente envolvidos nestas respostas. Além disso, demonstramos também que NPF participa do metabolismo de carboidratos de reserva uma vez que o acúmulo de glicogênio durante o choque térmico mostrou-se prejudicado no mutante Δnpf . Dados da literatura atribuem a NPF papel em eventos de repressão gênica via formação de heterocromatina facultativa em regiões subteloméricas e participação de NPF na formação da heterocromatina centromérica (Lewis, 2017; Jamieson et al., 2013). Nossos resultados são, portanto, inéditos e demonstram que além da formação de heterocromatina, NPF também atua na resposta adaptativa de *Neurospora* frente a diferentes estímulos ambientais adversos e ainda participa da repressão de genes envolvidos no acúmulo de glicogênio no fungo. Se NPF participa destes eventos de maneira direta ou indireta via remodelagem de cromatina

mediada por PRC2 necessita ser investigado, assim como a identidade das proteínas parceiras relacionadas aos eventos estressantes também necessita ser futuramente estabelecida.

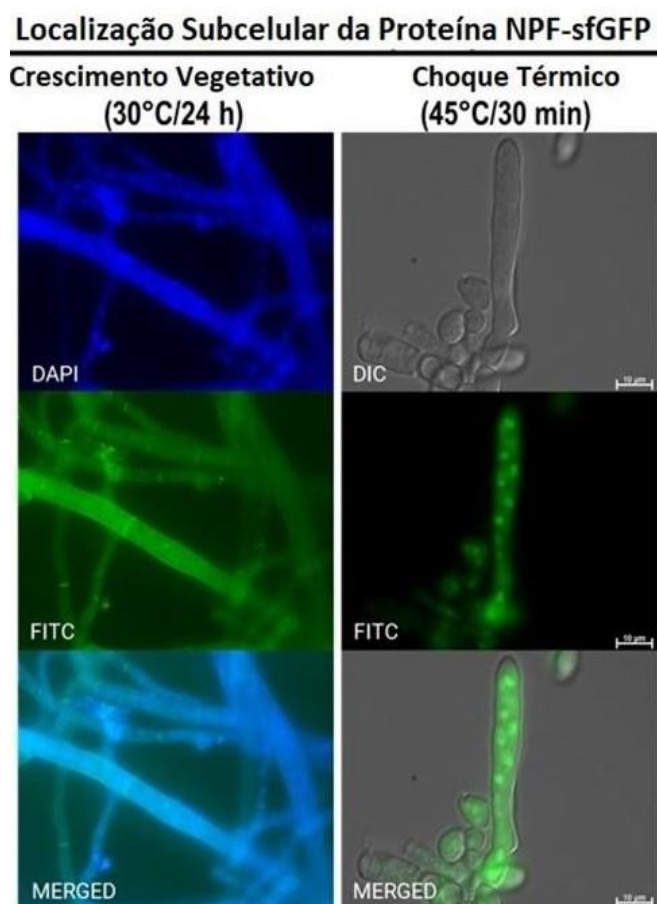


Figura 21. Sublocalização celular da proteína de fusão NPF-sfGFP durante o choque térmico. Conídios da linhagem complementada $\Delta npf::npf$ foram cultivados sobre lamínulas submersas em meio VM líquido contendo sacarose 0,5% durante 10h. Para o choque térmico, os micélios formados foram incubados em meio VM líquido pre-aquecido a 45°C/30 min. Os núcleos foram visualizados após corados com DAPI, em um aumento de 100x. Para NPF-sfGFP, a fluorescência foi visualizada após excitação e emissão os comprimentos de onda de, respectivamente, 490 e 525 nm usando filtro FITC. As imagens foram capturadas usando uma câmera AxioCam MRm acoplada a um microscópio de fluorescência AXIO Imager.A2 (Zeiss) e processadas usando o software AxioVision. Como os resultados de WolFPSORT sugerem que NPF apresenta sinal de localização nuclear (cyto_nucl: 12.5, cyto: 12, nucl.: 11, pero: 2, golg: 1, vacu:1), a fim de não perturbar a detecção da proteína de fusão no núcleo, o micélio submetido ao choque térmico não foi corado com DAPI para a confecção desta imagem.

PRINCIPAIS CONCLUSÕES

Neste trabalho, iniciamos com os estudos de caracterização da proteína NPF, uma proteína isolada em nosso laboratório como participando da modulação negativa da expressão do gene *gsn* de maneira dependente de STRE em *N. crassa* na condição de estresse térmico. Na literatura, esta proteína se encontra descrita como estando envolvida em eventos de remodelagem de cromatina, participando da formação da heterocromatina centromérica e de heterocromatina facultativa em regiões subteloméricas do fungo. Para atingir nossos objetivos, uma linhagem do fungo mutante no gene *npf* foi analisada em condições de crescimento vegetativo do fungo e também submetida a diferentes formas de estresse, tendo como controles uma linhagem selvagem do fungo e a linhagem nocauteada complementada. Como uma consequência direta do nosso trabalho, os resultados obtidos até o momento mostraram que NPF encontra-se envolvida em vários eventos celulares e nos permitiram inferir à mesma importantes funções adicionais, além das supramencionadas, tais como sua participação na modulação da resposta adaptativa do fungo a diferentes formas de estresse ambiental e sua participação no acúmulo de glicogênio (carboidrato de reserva) em situações de aumento de temperatura.

A seguir, listamos as principais conclusões que suportam nossas afirmações:

- 1. NPF encontra-se envolvida em diversos eventos celulares.** Quando cultivada em condições de crescimento vegetativo, comparado às linhagens WT e *!1npf::npf*, a mutante *!1npf* mostrou uma baixa produção de conídios, um crescimento radial reduzido, uma taxa de extensão apical das hifas basais diminuída e uma produção de carotenoides defectiva;
- 2. NPF participa da adaptação do fungo a aumentos de temperatura.** Quando submetida ao estresse térmico, *!1npf* apresentou uma ausência total de crescimento colonial após 24h de cultivo a 45°C e esta resposta pode ser atribuída à ausência do gene *npf*, uma vez que as linhagens WT e complementada apresentaram um discreto crescimento nesta temperatura. Além disso, quando transferidas para a temperatura fisiológica de crescimento do fungo (30°C), todas as culturas apresentaram crescimento, o que indica que os conídios da linhagem nocauteada que inoculados ainda permaneciam viáveis mesmo após 24h a 45°C, reforçando que a ausência de crescimento foi devida à falta do gene *npf* na linhagem;
- 3. NPF participa do fenótipo para acúmulo de glicogênio em *Neurospora* durante o choque térmico.** O conteúdo de glicogênio encontrado para as células submetidas ao estresse térmico mostraram-se reduzidos na *!1npf*, quando comparados às linhagens WT e *!1npf::npf*. Em *N. crassa*, a redução no acúmulo de glicogênio é atribuída a uma redução na expressão do gene *gsn*, o qual codifica a enzima glicogênio sintase – enzima limitante do processo de síntese deste carboidrato. Sabe-se que a regulação negativa

do transcrito *gsn* é controlada pelo binômio SEB1-STRE e durante o processo de identificação de SEB1 como sendo o fator de transcrição que liga STRE no choque térmico em *Neurospora* por espectrometria de massas, encontramos NPF como sendo uma das prováveis proteínas parceiras de SEB1 ligando a região do promotor *gsn* nesta condição. Os resultados obtidos neste trabalho para acúmulo de glicogênio na linhagem !1*npf* os dados publicados anteriormente pelo nosso grupo e ainda permitem inferir a NPF um papel na regulação da expressão do gene *gsn* e consequente acúmulo deste carboidrato de reserva no fungo, na condição de estresse analisada.

- 4. NPF participa da resposta adaptativa de *Neurospora* à diferentes formas abióticas de estresse.** Quando cultivada em condições de pH alcalino e níveis elevados de íons cálcio, agentes osmóticos (sorbitol e NaCl) e agentes oxidantes (paraquat, menadiona e peróxido de hidrogênio), !1*npf* apresentou uma redução no diâmetro das colônias formadas, o qual mostrou ser resultante da ausência do gene *npf* nesta linhagem, uma vez que as linhagens WT e complementada apresentaram diâmetros coloniais significativamente maiores nas mesmas condições ambientais, sugerindo que as vias de transdução de sinal e de desintoxicação de *Neurospora* são, de alguma forma, moduladas pela atividade NPF. Além disso, os resultados obtidos ainda sugerem que exista um *crosstalk* entre as diferentes vias de sinalização, onde NPF parece ser um elo comum,
- 5. NPF parece translocar para o núcleo na situação de estresse térmico.** A sequência polipeptídica da proteína NPF apresentou um sinal de localização nuclear não clássico, sugerindo inicialmente que esta proteína deva translocar entre citoplasma e núcleo com a ajuda de proteínas cargo, como as importinas, por exemplo. A construção da linhagem complementada, expressando a proteína NPF fusionada a GFP permitiu iniciarmos os estudos de localização subcelular de NPF em condições ambientais adversas. Embora nossos resultados sejam preliminares, foi possível detectarmos por microscopia de fluorescência a presença de NPF no núcleo das células da linhagem complementada do fungo submetidas ao estresse térmico, mostrando sua translocação citoplasma-núcleo é dependente de estresse, uma vez que antes do choque térmico, a proteína fluorescente encontrou-se dispersa no citoplasma das células.

Logo, podemos concluir que a proteína NPF é importante para as células modularem adequadamente a expressão de genes regulatórios que respondem aos desafios ambientais em fungos, participando ativamente nas respostas adaptativas ao estresse. Se as respostas observadas derivam do binômio NPF-PRC2 ou se decorrem da interação de NPF com outros complexos proteicos regulatórios, necessita ser melhor investigado.

REFERÊNCIAS

- AASLAND, R., ET AL. *Trends Biochem Sci.*, **21**: 87-8 (1996).
- AHMED, A.; CASE, M. E.; GILES, N. H. *Brookhaven Symposia in Biology*, **17**: 53-65 (1964).
- BAKER, C. L.; LOROS, J. J.; DUNLAP, J. C. *FEMS Microbiol.*, **36**: 95-110 (2012).
- BARSKI, A., ET AL. *Cell*, **129**: 823–837 (2007).
- BEADLE, G. W.; TATUM, E. L. *Proc. Natl. Acad. USA*, **27**: 499-506 (1941).
- BEISEL, C., PARO, R. *Nat. Rev. Genet.*, **12**: 123-135 (2011).
- BISTIS, G. N., ET AL. *Fungal Genet. Newsl.*, **50**: 17-19 (2003).
- BORKOVICH, K.A. ET AL. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**: 1-108 (2004).
- COLOT, H. V., ET AL. *Proc Natl Acad. USA*, **103**: 10352-10357 (2006).
- CRICK, F. H. C. *Symp. Soc. Exp. Biol.*, **12**: 8 (1958).
- DAGANZO, S.M., ET AL. *Current Biology*, **13**: 2148–2158 (2003).
- DAVIS R. H.; PERKINS, D. D. *Nat. Rev. Genet.*, **3**: 397-403 (2002).
- DAVIS, R. H.; F. J. DE SERRES. *Methods Enzymol.*, **17**: 79-143 (1970).
- DE GROOT, E., ET AL. *Microbiology*, **146**: 367–375 (2000).
- DINAMARCO, T. M., ET AL. *Eukaryot. Cell*, **11**: 518-53 (2012).
- DUNLAP, J. C., ET AL. *Adv. Genet.*, **57**: 49-96 (2007).
- DVASH, E., ET AL. *Eukaryot. Cell*, **9**: 502-513 (2010).
- EBBOLE, D.; SACHS, M.S. *Fungal Genet. Reports*, **37** article 7 (1990).
- EISSENBERG, J.C. *Gene*, **275**: 19-29 (2001).
- ESSER, K.; KUENEN, R. *Genetics of Fungi*. In Heidelberg: Springer-Verlag (1967).
- FINCHAN J.R.S., ET AL. *Mycologia*, **93**: 265-269 (1979).
- FRANÇOIS, J.; PARROU, J. L. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**: 125-145 (2001).
- FARIA, H.C.L. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química). Araraquara: UNESP (2018).
- FRASER, P.D., ET AL. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1289**: 203-208 (1996).
- FREITAS ET AL. *G3: Genes, Genome and Genetics*, **6**: 1327-1343 (2016).
- FREITAS, F. Z., ET AL. *Proteomics*, **8**: 2052-2061 (2008).
- FREITAS, F. Z., M. C. BERTOLINI. *Mol. Genet. Genomics*. **272**: 550-561 (2004).
- GALAGAN, J. E., ET AL. *Nature*, **422**: 859-868 (2003).
- GORBALENYA A.E., ET AL. *Nucleic Acids Res.*, **17**: 4713-30 (1989).
- GOW, N. A. R. *The growing fungus*. In: London-Chapman & Hall: 277-299 (1994).
- HAN, K. H., PRADE, R. A. *Mol. Microbiol.*, **43**: 1065–1078 (2002).
- HARDY, T.A., ROACH, P.J. *Journal of Biological Chemistry*, **268**: 23799-23805 (1993).
- HARRIS, S. D. *Curr. Opin. Microbiol.*, **4**: 736-739 (2001).

- HICKEY, P. C., ET AL. *Fungal Genet. Biol.*, **37**: 109-119 (2002).
- HONDA, S.; SELKER, E. U. *Molecular and Cellular Biology.*, **28**: 6044-6055 (2008).
- HOULARD, M., ET AL. *PLoS Genet.*, **2**: 181 (2006).
- HUTCHISON, E., ET AL. *Microbiology*, **155**: 3957-3970 (2009).
- JACOBSON D.J., ET AL. *Mycologia*, **96**: 66-74 (2004).
- JACQUET, M., ET AL. *J. Cell Biol.*, **161**: 497-505 (2003).
- JAMIESON, K., ET AL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**: 6027-6032 (2013).
- KANHERE, A., ET AL. *Molecular Cell*, **38**: 675-688 (2010).
- KAUFMAN, P.D., ET AL. *Genes Dev.* **11**: 345-357 (1997).
- KIRMIZIS, A., ET AL. *Genes Dev.* **18**: 1592-1605 (2004).
- KOBAYASHI, N., K. McEntee. *Mol. Cell. Biol.*, **13**: 248-256 (1993).
- KOBAYASHI, N., K. MCENTEE. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**: 6550-6554 (1990).
- KORENJAK, M., ET AL. *Cell*, **119**: 181-193 (2004).
- KUZMICHEV, A., ET AL. *Genes Dev.*, **16**: 2893-905 (2002).
- LACHNER, M. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **69**: 209-218 (2004).
- LAMB J.R., ET AL. *Trends in Biochemical Sciences*, **20**: 257-259 (1995).
- LEWIS, Z. A., ET AL. *Genome Res.* **19**: 427-437 (2009).
- LEWIS, Z. A., ET AL. *Trends Genet.* **33**: 220-231 (2017).
- LI, M., ET AL. *Molecular Microbiology*, **66**: 1136-1147 (2007).
- LUGER, K., ET AL. *Nature*, **389**: 251-260 (1997).
- MAHESHWARI, R. *Fungal Genet. Biol.*, **26**: 1-18 (1999).
- MANNHAUPT, G., ET AL. *Nucleic Acids Res.*, **31**(3): 1944-1954 (2003).
- MARGUERON, R.; REINBERG D. *Nature*, 469: 343-9 (2011).
- MARTINEZ-PASTOR, M. T. ET AL. *The EMBO Journal*, **15**: 2227-2235 (1996).
- MENDITI, K. B. C.; KANG, H. C. *Revista Brasileira de Cancerologia*, **53**: 453-460 (2007).
- MIKKELSEN, T., ET AL. *Nature*, **448**: 553-560 (2007).
- MISHRA, N.C; TATUM, E.L. *Proc Natl Acad Sci USA*, **69**: 313-317 (1972).
- MORTENSEN, A., ET AL. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **385**: 13-19 (2001).
- MORTENSEN, A., ET AL. *Febs Letters*, **418**: 91-97 (1997).
- MÜLLER, J., ET AL. *Cell*, **111**: 197-208 (2002).
- NATURE EDUCATION, GENE EXPRESSION, FIGURE 1, 2010. DISPONÍVEL EM: <<https://www.nature.com/scitable/topicpage/gene-expression-14121669>>. ACESSO EM 09 DE ABRIL DE 2022.
- NEUWALD A.F; LANDSMAN, D. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 154-155 (1997).

- NICHOLLS S., ET AL. *Eukaryot Cell*, **3**: 1111-23 (2004).
- NICOLAS, E., ET AL. *J. Biol. Chem.* **275**: 9797-9804 (2000).
- NINOMIYA, Y., ET AL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 12248-12253 (2004).
- NOGUCHI R, ET AL. *Fungal Genet Biol.*, **44**: 208–218 (2007).
- PARTHUN, R. M. R., ET AL. *Cell*, **87**: 85-94 (1996).
- PASCHON, V., ET AL. Formação da memória está associada com mecanismos epigenéticos que são passados de geração para geração (cérebro lamarkiano). **1**:11 (2014).
- PAULER, F. M., ET AL. *Genome Res.* **19**: 221-233 (2009).
- PERKINS, D. D., ET AL. *Evolution*, **30**: 281–313 (1976).
- PETERBAUER, C. K. ET AL. *Mol. Genet. Genomics*, **268**: 223-31 (2002).
- RODWELL, V. W., ET AL. *Bioquímica Ilustrada de Harper* (2017).
- ROETZER A, ET AL. *Mol. Microbiol.* **69**: 603-620 (2008).
- ROSSIER, C., ET AL. *Arch. Mikrobiol.* **91**: 345–353 (1973).
- RUIZ-HIDALGO, M.J., ET AL. *Current Microbiology*, **39**: 259-264 (1999).
- SASAKI, T., ET AL. *Eukaryotic Cell*. **13**: 990–1000 (2014).
- SCHMITT, A. P., MCENTEE, K. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, **93**: 5777-82 (1996)
- SCHULTE U., ET AL. *J. Biotechnol.*, **94**: 3-13 (2002).
- SCHWARTZ, Y., ET AL. *Nat. Genet.* **38**: 700-705 (2006).
- SEIDL, V., ET AL. *Fungal Genetics and Biology*, **41**: 1132–1140 (2004).
- SMITH, K. M., ET AL. *Epigenetics Chromatin*, **1**: 5 (2008).
- SMITH, K. M., ET AL. *Eukaryotic Cell*, **9**: 1549–1556 (2010).
- SPRINGER, M. L.; YANOFSKY, C. *Genes Dev.*, **3**: 559-571 (1989).
- STOCK, J., ET AL. *Nat. Cell Biol.*, **9**: 1428-1435 (2007).
- TAMARU, H., ET AL. *Nat. Genet.*, **34**: 75-79 (2003).
- TANNER, N.K.; LINDER, N.P. *Molecular Cell*. **8**: 251-262 (2001).
- TAUNTON, J., ET AL. *Science*, **272**: 408-411 (1996).
- THEDEI JUNIOR, G., ET AL. *Brazilian J. Med. Biol.* **27**: 1129-1134 (1994).
- TOTO, M., ET AL. *Chromosoma*, **123**: 91-102 (2014).
- TRINCI, A. P. J. *The ecology and physiology of the fungal mycelium*. In: Cambridge University Press: 23-52 (1984).
- TRINCI, A. P. J., ET AL. The mycelium as an integrated entity, p. 173-193. In J. G. H. Wessels and F. Meinhardt (ed.), *The mycota: growth, differentiation and sexuality*, vol. 1. Springer-Verlag KG, Berlin, Germany (1994).
- TURNER, G.; HARRIS, S. D. Genetic control of polarized growth and branching in filamentous fungi, p. 229-260. In N. A. R. Gow, G. D. Robson, and G. M. Gadd (ed.), *The fungal colony*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom (1997).

- VERREAULT, A., ET AL. *Cell*. **87**: 95-104 (1996).
- VERREAULT, A., ET AL. *Curr. Biol.*, **8**: 96-108 (1998).
- VOGEL, H. J. *Microbiol. Genet. Bull.* **13**: 42-43 (1956).
- WANG TY., ET AL. *Mol Biosyst.* **7**: 2278-85 (2011).
- WANG Z., ET AL. *Fungal Genet Biol.* **49**: 405-413 (2012a).
- WANG Z., ET AL. *Fungal Genet Biol.* **49**: 533–543 (2012b).
- WATSON, J. D., ET AL. *Biologia molecular do gene*. In: Artmed Editora (2015).
- WESTERGAARD, M.; MITCHELL, H.K. *Am. Journal of Botany*. **34**: 573-577 (1947).
- WU, C., ET AL. *G3: Genes Genetics Genomics*, **4**: 1731–1745 (2014).
- XIONG, Y., ET AL. *Biochemistry*. **49**: 5236–5243 (2010).
- XIONG, Y., ET AL. *PLOs Genet.*, **13**: E1006737 (2017).
- ZAHA, A., ET AL. *Biologia Molecular Básica-5*. In: Artmed Editora (2014).
- ZHANG, X., ET AL. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **14**: 869-871 (2007).
- ZHANG, Y., ET AL. *Genes Dev.*, **13**: 1924-1935 (1999).
- ZHAO, X., ET AL. *Smart Mater. Struct.*, **16**: 1218 (2007).