

JONATAS ERICK MAIMONI CAMPANELLA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E BIOFÍSICA DAS PROTEÍNAS
RVB-1 E RVB-2 PERTENCENTES À FAMÍLIA AAA⁺ DO
FUNGO *Neurospora crassa***

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

Orientador: Prof^a Dr. Maria Célia Bertolini

**ARARAQUARA
2018**

FICHA CATALOGRÁFICA

C186c Campanella, Jonatas Erick Maimoni
Caracterização funcional e biofísica das proteínas RVB-1 e RVB-2 pertencentes a família AAA⁺ do fungo *Neurospora crassa* / Jonatas Erick Maimoni Campanella. – Araraquara : [s.n.], 2018
97 f. : il.

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

1. *Neurospora crassa*. 2. *Western blotting*.
3. Eletroforese em gel. 4. Dicroísmo circular. 5. Interação proteína-proteína. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Caracterização funcional de biofísica das proteínas RVB-1 e RVB-2 pertencentes a família AAA⁺ do fungo *Neurospora crassa*"

AUTOR: JONATAS ERICK MAIMONI CAMPANELLA

ORIENTADORA: MARIA CELIA BERTOLINI

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

Maria Célia Bertolini

Prof^a. Dr^a. MARIA CELIA BERTOLINI

Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Ana Paula Ulian de Araujo

Profa. Dra. ANA PAULA ULIAN DE ARAUJO

Departamento de Física e Ciência Interdisciplinar / Instituto de Física - USP - São Carlos

Julio Cesar Borges

Prof. Dr. JULIO CESAR BORGES

Instituto de Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 06 de março de 2018

DADOS CURRICULARES

Nome: Jonatas Erick Maimoni Campanella

RG: 49.806.566-2

CPF: 415.890.668-71

e-mail: jemcampanella@gmail.com

Telefone: (19) 99829-5959

Endereço profissional: Rua Prof. Francisco Degni, 55, Jd. Quitandinha – 14800-060, Araraquara – SP. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP. Instituto de Química, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos.

FORMAÇÃO

Bacharel em Química pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP em Araraquara – SP (Ano de conclusão:2015).

Auxiliar Técnico em Química na ETEC Coronel Fernando Febeliano da Costa, Piracicaba – SP.

BOLSAS

Bolsa de Mestrado CAPES no período de 02/2016 a 02/2018

Projeto: “Caracterização funcional das proteínas RVB-1 e RVB-2 do fungo *Neurospora crassa*, duas prováveis DNA helicases dependentes de ATP.

TRABALHOS ABRESENTADOS EM EVENTOS INTERNACIONAIS

Mateos, P. A.; **Campanella, J. E. M.**; Freitas, F. Z. ; Bertolini, Maria Célia. **The RVB-1/2 proteins have a functional role in heat shock response in *Neurospora crassa*** . In: 29th Fungal Genetics Conference, 2017, Pacific Grove. 29th Fungal Genetics Conference, 2017.

TRABALHOS ABRESENTADOS EM EVENTOS NACIONAIS

Campanella, J. E. M.; Freitas, F. Z.; Bertolini, M. C. “**Subcellular localization of RVB-1/2 proteins, two putative *Neurospora crassa* ATP-dependent DNA helicases**”. Apresentado na forma de pôster durante a 61º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP.

Campanella, J. E. M.; Freitas, F.Z ; Bertolini, M. C. “**Functional Characterization of the Proteins RVB-1 and RVB-2, Two Putative *N. crassa* ATP-Dependent DNA Helicases.**” In: 46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, 2017.

PRÊMIOS / MENSÃO HONROSA

Mensão honrosa:

Campanella, J. E. M.; Freitas, F. Z.; Bertolini, M. C. “Subcellular localization of RVB-1/2 proteins, two putative *Neurospora crassa* ATP-dependent DNA helicases”. Apresentado na forma de pôster durante a 61º Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia, SP.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, em Águas de Lindóia, SP, 2017.

OUTRAS ATIVIDADES

Ministrou o grupo de trabalho “**O Reconhecimento do Programa de Educação Tutorial Na Formação Discente**” no III Encontro dos PET UNESP - EPU, realizado no Faculdade de Ciências e Letras e Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Araraquara, no dia 29 de outubro de 2016.

Dedico esta conquista à minha família...

Em memória dos meus avós paternos, José e Olinda, que sempre apoiaram o estudo de seus filhos e netos.

Ao meu avô materno, Mauro (memória) e minha querida e amada vó Ana, que sempre foram pilares de sustentação na minha vida, e guardarei comigo todos os ensinamentos dados por vocês...

Meus pais, Celso e Fabiana e meu querido irmão Marcos, pelo incentivo, apoio irrestrito, suporte emocional e financeiro.

Mas, acima de tudo, dedico este trabalho ao amor dado por cada um de vocês...

Que Deus esteja sempre com vocês!

*“Pode-se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias,
se a pessoa se lembrar de voltar e acender a luz”*

*Albus Dumbledore
(Personagem fictício da escritora J. K. Rowling)*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Aos meus pais, que sempre colocaram minha educação em primeiro lugar, pela ajuda e confiança que depositaram. Também agradeço a meu irmão Marcos, pela sua amizade, que este trabalho sirva de incentivo para que ele continue estudando e sempre lute pelos seus sonhos.

Agradeço especialmente a minha orientadora, Maria Célia, pela confiança, oportunidade, por me passar seus conhecimentos e ter tido muita paciência comigo. Sempre lembrarei com muito carinho de você. Deixo aqui também um agradecimento muito especial para minha orientadora do coração, a Fernanda, que mesmo sem ter essa obrigação sempre me ajudou muito. Devo a vocês todo o conhecimento aprendido com este trabalho.

Também agradeço a todos meus amigos do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos, Tarciso, Stela, e Daniela que me ajudaram a completar meu trabalho, contribuindo com seus ensinamentos. Em especial a Juvana, Erika e Maria, que me deram muito apoio nestes últimos meses e me ajudaram a completar esta etapa. Meu agradecimento sincero!

Não poderia deixar de colocar um agradecimento especial a minha querida amiga Maria, por dividir casa comigo, me ajudado em momentos que eu perdi a esperança e ter sido um grande apoio em Araraquara. Você sempre será alguém muito especial para mim, muito obrigado.

Ao meu amado, grandioso, querido, estupendo, leal, magnifico, amigo Granola, que de longe só tenho o que agradecer, por ter sido um grande suporte emocional e ter me ajudado em muitos momentos que eu precisei. Que a nossa amizade permaneça por tempo indeterminado e que no futuro você possa contar nossas aventuras para seus filhos (pelo menos a parte que não os vão traumatizar). Gosto de mais de você meu amigo.

Ao meu amigo Arroyos, pelas eternas caronas, por todo apoio e suporte, sempre disposto a me ajudar, meu muito obrigado! Você é maravilhoso.

Aos meus amigos Maurício, Cartola, Muriel e Gabi, que com a amizade, companhia, lealdade e companheirismo de cada um de vocês, me incentivaram a nunca desistir e sempre estiveram dispostos a me ajudar em momentos nos quais eu precisei.

Ao laboratório de Biofísica Molecular de Proteínas, especialmente ao Prof. Dr. Júlio César e ao mestrando Sergio (Serginho) que me ajudaram nas análises de biofísica e bioquímica, meu muitíssimo obrigado.

Ao Instituto de Química, a UNESP e a Araraquara por me receber e me dar todo o apoio possível.

À CAPES, pela bolsa de mestrado que foi muito importante para minha permanência em Araraquara,

À FAPESP pelo financiamento do laboratório que eu desenvolvi meu trabalho.

E eu não poderia deixar de escrever parte do hino que todos os “unespianos” desta cidade maravilhosa levam no coração:

“Araraquara é um TESÃO!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!”

Resumo

Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo levaram à identificação da proteína RVB-1 de *Neurospora crassa* como capaz de se ligar a um fragmento de DNA contendo o *motif* STRE (Stress Responsive Element). Este elemento de DNA, em *Saccharomyces cerevisiae*, é descrito estar presente na região promotora de genes responsivos a estresse, incluindo o estresse térmico. Uma busca nos bancos de dados de proteínas mostrou que a RVB-1 apresenta homologia estrutural à proteína RuvBL1 de humanos. Além disso, esta proteína é descrita possuir uma proteína paróloga, RuvBL2 ou Rvb2 de humano e *S. cerevisiae*, respectivamente, cuja proteína ortóloga em *N. crassa* foi denominada RVB-2. As proteínas RuvBLs foram encontradas estarem associadas a vários processos celulares, muito provavelmente devido as suas capacidades de formar grandes complexos proteicos e possuírem atividade ATPásica. Neste trabalho, estas proteínas foram parcialmente caracterizadas do ponto de vista funcional, bioquímico e biofísico. Os resultados obtidos por microscopia de fluorescência mostraram que ambas apresentam localização nuclear quando o fungo foi exposto a estresse térmico. A análise da expressão da proteína RVB-V5 mostrou estar aumentada, nessa mesma condição ambiental, quando analisada por *Western blot*. As duas proteínas foram produzidas na forma recombinante em *Escherichia coli*, tanto isoladamente quanto juntas, e a análise da expressão mostrou alta estabilidade em solução quando ambas foram produzidas em uma mesma célula de bactéria. Ambas mostraram interagir *in vitro* por análise de *pull-down* e o complexo RVB-1/2 mostrou ser formado principalmente por α -hélices através de espectropolarimetria de dicroísmo circular. Análise em gel filtração analítica sugeriu que o complexo apresenta diferentes estruturas oligoméricas, quando analisado na ausência e na presença de ATP. O complexo apresentou atividade ATPásica *in vitro*, o que fortemente sugere que ambas pertencem à família AAA⁺. Resultados de retardamento em gel de agarose (EMSA), mostraram que tanto separadamente, como na forma de complexo, essas proteínas são capazes de se ligar a fragmentos de DNA dupla fita independentemente de ATP.

Palavras-chave: *N. crassa*, estresse térmico, atividade ATPásica, EMSA

Abstract

Previous work by our group identified the *Neurospora crassa* RVB-1 protein as able of binding to a DNA fragment containing the Stress Responsive Element (STRE). In *Saccharomyces cerevisiae*, this element is present in the promoter region of genes responsive to stress, including heat stress. RVB-1 shows structural homology to human RuvBL1 protein, and is described to have a paralog, the RuvBL2 or Rvb2 protein in human and *S. cerevisiae*, respectively. The *N. crassa* orthologous protein was identified and named RVB-2. The RuvBLs proteins have been found to be associated with diverse cellular processes, most likely due to their ability to form large protein complexes and to have ATPase activity. In this work, these proteins were functional, biochemical and biophysically characterized. The fluorescence microscopy results showed that both proteins present nuclear localization in the fungus exposed to heat stress. Analyses of protein expression by Western blot showed an increased expression of the RVB-1-v5 protein in this same condition. The two proteins were produced in *Escherichia coli*, and expression analyses showed higher stability in solution when both were produced together. Both proteins showed *in vitro* interaction by pulldown analysis. The RVB-1/2 complex has the secondary structure mostly formed by α -helices as analysis by CD. The size-exclusion chromatography suggested that the complex present different oligomeric structures when analyzed in the absence and presence of ATP. They present *in vitro* ATPase activity, which strongly suggest that both belong to the AAA⁺ family. Electrophoresis Mobility Shift Assay (EMSA) showed that both proteins are able to bind to dsDNA fragments, in an ATP-independently manner.

Keywords: *N. crassa*, heat stress, ATPase activity, EMSA, DNA- binding protein.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

2YT	<i>“2x Yeast Tryptone médium”</i>
5'- e 3'-UTR	5'- e 3'- “Untranslated Region”
ATP	adenosina trifosfato
bp	pares de base
cDNA	DNA codificador
C-terminal	Carboxi-terminal
DAPI	4',6-diamidino-2-fenil-indol
DIC	Contraste de Interferência Diferencial
DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	DNA codificador
EDTA	ácido etilenodiamino tetra acético
GFP	<i>“green fluorescent protein”</i>
Gly	glicina
gsn	gene da glicogênio sintase em <i>Neurospora crassa</i>
his	histidina
kb	kilobase
kDa	kilodalton
N-terminal	amino-terminal
ORF	<i>“Open Reading Frame”</i>
PCR	<i>“Polimerase Chain Reaction”</i>
PBS	<i>“Phosphate Buffered Saline”</i>
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
STRE	<i><u>Stress Responsive Element</u></i>
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
TBST	<i>“Tris-Buffered Saline and Tween”</i>
Tris	hidroximetilaminometano
VM	meio mínimo de Vogel

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	NEUROSPORA CRASSA COMO UM ORGANISMO MODELO	18
1.2	OS PRODUTOS DAS ORFs NCU03482 E NCU06854.....	22
1.3	AS DIVERSAS FUNÇÕES DAS PROTEÍNAS ORTÓLOGAS RVB-1/2.....	28
2	OBJETIVOS.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	LINHAGENS DE MICRORGANISMOS.....	35
3.1.1	<i>Escherichia coli</i>	35
3.1.2	<i>N. crassa</i>	35
3.2	CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS	36
3.3	OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	36
3.4	MEIOS DE CULTURA	36
3.4.1	<i>E. coli</i>	36
3.4.2	<i>N. crassa</i>	37
3.5	SOLUÇÕES E TAMPÕES	38
3.5.1	<i>Tampões de lise</i>	38
3.5.2	<i>Tampões para purificação das proteínas recombinantes</i>	39
3.5.3	<i>Soluções e tampões para SDS-PAGE</i>	40
3.5.4	<i>Soluções e tampões para Western blot</i>	41
3.5.5	<i>Soluções para microscopia</i>	41
3.6	REAGENTES.....	42
3.7	PROPAGAÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>N. CRASSA</i>	42
3.7.1	<i>Obtenção de conídios</i>	42
3.8	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>N. CRASSA</i>	42
3.9	CHOQUE TÉRMICO.....	43
3.10	EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	44
3.11	MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	44
3.11.1	<i>Reações de PCR e purificação de fragmentos de DNA</i>	45
3.12	CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE <i>N. CRASSA</i> EXPRESSANDO RVB-1-V5 E RVB-2-SFGFP	45

3.13	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RVB-1-V5 E RVB-2-GFP EM <i>N. CRASSA</i> DURANTE ESTRESSE TÉRMICO	46
3.14	PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DAS PROTEÍNAS RVB-1 E RVB-2 RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i> . ENSAIOS UTILIZANDO AS PROTEÍNAS ISOLADAS	47
3.14.1	<i>Produção das proteínas recombinantes</i>	47
3.14.2	<i>Ensaio de solubilidade das proteínas recombinantes</i>	48
3.14.3	<i>Purificação das proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2</i>	49
3.14.4	<i>Parâmetros físico-químicos das proteínas recombinantes</i>	49
3.14.5	<i>Quantificação das proteínas recombinantes</i>	50
3.14.6	<i>Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)</i>	50
3.14.7	<i>Espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano</i>	51
3.14.8	<i>Cromatografia de exclusão molecular analítica</i>	51
3.14.9	<i>Ensaio de atividade ATPásica</i>	52
3.15	ENSAIOS UTILIZANDO O DÍMERO RVB-1/RVB-2. CARACTERIZAÇÃO BIOFÍSICA DO COMPLEXO RVB-1/2	53
3.15.1	<i>Amplificação e clonagem dos cDNAs rvb-1-v5 e rvb-2 no vetor pRSFduet-1. Expressão das proteínas RVB-1-V5 e His-RVB-2</i>	54
3.15.2	<i>Ensaio de solubilidade das proteínas RVB-1/2 recombinantes</i>	56
3.15.3	<i>Confirmação da produção do complexo RVB-1/2 por pulldown</i>	56
3.15.4	<i>Quantificação das proteínas recombinantes</i>	56
3.15.5	<i>Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) do complexo RVB-1/2</i>	57
3.15.6	<i>Cromatografia de exclusão molecular analítica do complexo RVB-1/2 na presença de ATP e ADP</i>	57
3.15.7	<i>Atividade ATPásica do complexo RVB-1/2</i>	57
3.16	ENSAIOS DE “ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY” – EMSA	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
4.1	ENSAIOS DE LOCALIZAÇÃO CELULAR DAS PROTEÍNAS RVB-1 E RVB-2 EM <i>N. CRASSA</i> DURANTE CHOQUE TÉRMICO.	60
4.2	CONSTRUÇÃO DE UMA LINHAGEM DE <i>N. CRASSA</i> EXPRESSANDO RVB-1-V5 E RVB-2-SFGFP	62
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RVB-1-V5 E RVB-2-GFP EM <i>N. CRASSA</i> DURANTE ESTRESSE TÉRMICO	64

4.4	PRODUÇÃO DAS PROTEÍNAS RVB-1 E RVB-2 RECOMBINANTES EM <i>E. COLI</i> . ENSAIOS UTILIZANDO O VETOR PET28A	66
4.4.1	<i>Ensaio de purificação das proteínas.....</i>	68
4.4.2	<i>Espectrofotometria de Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência Intrínseca do triptofano</i>	70
4.4.3	<i>Estudo do estado oligomérico</i>	70
4.5	ENSAIOS UTILIZANDO O VETOR BICISTRÔNICO PRSFDUET-1	74
4.5.1	<i>Clonagem dos cDNAs rvb-1-v5 e rvb-2 no vetor e análise da expressão das proteínas recombinantes.....</i>	74
4.5.2	<i>Ensaio de pulldown com as proteínas recombinantes His-RVB-2 e RVB-1-V5</i>	77
4.5.3	<i>Espectropolarimetria de Dicroísmo circular do complexo.....</i>	80
4.5.4	<i>Cromatografia de exclusão molecular analítica do complexo.....</i>	80
4.5.1	<i>Atividade ATPásica do complexo</i>	82
4.6	ELETROPHORESES MOBILITY SHIFT ASSAY (EMSA)	84
5	PRINCIPAIS CONCLUSÕES	88
6	REFERÊNCIAS	90
7	APÊNDICES	94

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Neurospora crassa* como um organismo modelo

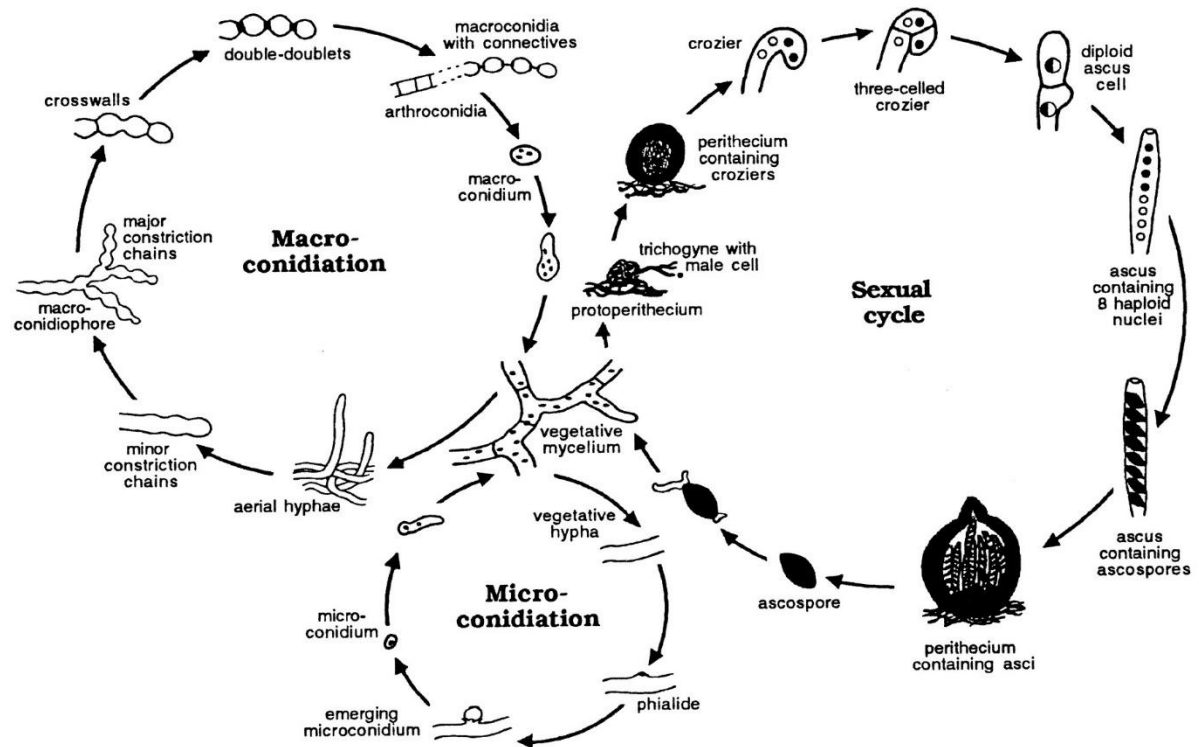
Os fungos filamentosos são eucariotos multicelulares e devido a isso contribuem com uma grande soma de conhecimento para o entendimento dos processos genéticos, bioquímicos e moleculares em organismos eucariotos. Dentre os fungos filamentosos, *Neurospora crassa* se destaca como um excelente organismo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

O ciclo de vida de *N. crassa* (Figura 1) compreende duas fases, uma fase vegetativa onde aparecem as estruturas denominadas conídios destinados à propagação do fungo e a fase sexual, onde se observa a presença dos corpos de frutificação (FINCHAN et al., 1979). Os conídios podem ser produzidos por duas vias distintas a macroconidiação e a microconidiação. A macroconidiação é controlada pelo ciclo circadiano e promovida por estruturas apicais denominadas conidióforos, os quais se encontram localizadas nas extremidades das hifas aéreas que permitem a formação de cadeias de macroconídios multinucleados. Na microconidiação, os esporos mononucleados são formados dentro das hifas basais e expelidos a partir da parede quando o processo de maturação se completa (PERKINS; TURNER; BARRY, 1976).

Sendo um fungo heterotático, *N. crassa* possui dois tipos de compatibilidade sexual, chamados de *mating type A* e *a*. Nenhuma diferença morfológica é observada em linhagens de *mating type* diferentes e quaisquer das linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento, sendo que tanto um tipo quanto o outro pode se comportar como “macho” exercendo a função de doador de

núcleos ou “fêmea” que exerce a função de receptora de núcleos (FINCHAN et al., 1979).

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



FONTE: SPRINGER, 1993.

A fase sexual acontece quando dois micélios de tipos opostos crescem juntos (A e a), sob condições limitantes de nitrogênio. Em resposta à privação deste nutriente, são originados corpos de frutificação (protoperitécios). A fertilização ocorre quando uma célula de tipo oposto, que pode ser um macroconídio, microconídio ou até mesmo um pequeno pedaço de micélio, entra em contato com o tricógino (hifa especializada para plasmogamia) presente no protoperitécio. Quando o contato acontece, ocorre plasmogamia e um ou mais núcleos da célula fertilizante migrarão através do tricógino até atingir a ascogônia. Nesse estágio ainda não ocorre fusão nuclear, mas apenas uma associação de núcleos aos pares, que começam a se dividir. O produto destas divisões resulta na formação de numerosas hifas. Enquanto isso acontece, a capa micelial que envolve a ascogônia começa a desenvolver uma espécie de parede, que vai abrigar as hifas recém-formadas originando uma estrutura denominada peritécio. Os núcleos de tipos opostos localizados na extremidade da hifa começam a se dividir, há formação de septos nesta região da

hifa, com uma célula central contendo dois núcleos de tipos opostos, a qual é denominada asco inicial. Após a formação do asco inicial, os dois núcleos se fundem (cariogamia) e ocorre meiose, originando quatro núcleos haplóides. Estes quatro núcleos haplóides sofrem mitose, originando oito núcleos dentro do asco maduro, sendo quatro núcleos de cada tipo de acasalamento (**A** e **a**). Esses núcleos originarão esporos (ascósporos), que sob eventuais circunstâncias germinarão originando novo micélio (FINCHAN et al., 1979).

N. crassa é também um fungo que responde a uma variedade de mudanças ambientais. Os fatores mais proeminentes são a luz e a temperatura, os quais afetam o sistema circadiano do organismo. A luz é conhecida por afetar a expressão de genes que influenciam os eventos como carotenogênese e conidiação. O efeito da luz deriva de seu papel central no estado do relógio circadiano, e mesmo a ausência de luz pode influenciar na expressão de grande parte do genoma. Em relação à resposta a temperatura, *N. crassa* apresenta uma classe de proteínas de choque térmico, as quais funcionam como chaperonas que orientam e estabilizam a conformação de outras proteínas (SCHULTE et al., 2002).

O genoma do *N. crassa* está organizado em sete cromossomos que variam entre 4 a 10 Mb de tamanho (SCHULTE et al., 2002). Seu genoma foi sequenciado por Galagan et al. (2003), revelando ser constituído por aproximadamente 40 Mb, genoma este, considerado maior se comparado a outros organismos modelos clássicos como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*. Uma grande quantidade de seus genes não possui ortólogos em *S. cerevisiae*, o que sugere uma relação mais estreita entre fungos filamentosos e eucariotos superiores, se comparado com leveduras e outros eucariotos inferiores (DUNLAP et al., 2007). A presença de um grande número de genes no genoma de *N. crassa* ainda com funções desconhecidas aponta este organismo como um promissor modelo para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos não identificados até o momento (DUNLAP et al., 2007). Atualmente, o número crescente de genomas de fungos filamentosos finalizados vem permitindo o estudo dos mecanismos biológicos envolvidos nos diferentes processos celulares nestes organismos e informações importantes vêm sendo descritas na literatura científica. O sequenciamento do genoma aliado aos avanços das metodologias para a inativação de genes específicos (NINOMIYA et al., 2004) permitiram que análises de genômica funcional neste fungo fossem iniciadas. Como consequência, uma coleção de linhagens

mutantes contendo genes que codificam fatores de transcrição individualmente nocauteados foi construída (COLOT et al., 2006) e disponibilizada para a comunidade científica pelo *Fungal Genetics Stock Center* (FGSC, Kansas City, Missouri, USA). Nosso laboratório adquiriu parte desta coleção de linhagens mutantes, a qual vem sendo utilizada em diferentes estudos.

Nosso laboratório possui um projeto central que estuda a regulação do metabolismo de carboidratos no fungo *N. crassa* em diferentes situações, sendo uma delas o choque térmico. Estudos previamente realizados mostraram que, em *N. crassa*, o choque térmico causa uma redução no conteúdo de glicogênio das células e que essa redução é acompanhada pela repressão de gene *gsn* que codifica a enzima glicogênio sintase, regulatória do processo de síntese de glicogênio (DE PAULA et al., 2002; FREITAS; BERTOLINI, 2004). Ao contrário do que ocorre em *N. crassa*, em *S. cerevisiae*, o choque térmico causa acúmulo de glicogênio, o qual é acompanhado por um aumento nos níveis do transcrito GSY2 (codifica a glicogênio sintase 2) de uma maneira dependente do elemento de DNA STRE (Stress Responsive Element) (NI; LAPORTE, 1995). Os STRE estão presentes em uma ou mais cópias nos promotores de genes responsivos a diferentes formas de estresse. Estes *motifs* são reconhecidos e ligados pelos transativadores Msn2/4p, os quais translocam para o núcleo em condições de estresse, causando uma indução na expressão gênica (MARTÍNEZ-PASTOR et al., 1996).

A análise usando BLAST no genoma de *N. crassa* não resultou na identificação de ortólogos às proteínas Msn2p/4p (FREITAS; BERTOLINI, 2004), o que levou ao desenvolvimento de um trabalho visando a identificação de proteínas capazes de se ligar a este elemento de DNA no fungo. Utilizando uma abordagem proteômica associada à espectrometria de massas, FREITAS et al. (2008) identificou algumas proteínas capazes de reconhecer e ligar um fragmento de DNA do promotor *gsn* contendo o *motif* STRE e, entre elas, o produto da ORF NCU03482. Posteriormente, utilizando uma abordagem bioquímica diferente, o fator de transcrição SEB-1 também foi identificado. Esta proteína foi funcionalmente caracterizada e mostrou estar envolvida não apenas na resposta a estresse térmico, mas também a outros tipos de estresse, tais como estresse oxidativo e osmótico (FREITAS et al., 2016). O produto da ORF NCU03482 está anotada no banco de dados do fungo como sendo uma proteína do tipo RuvB-like helicase 1, uma proteína com múltiplas funções celulares. Por se tratar de uma proteína com

possível função regulatória, ela se tornou um alvo interessante de estudo em nosso grupo.

1.2 Os produtos das ORFs NCU03482 e NCU06854

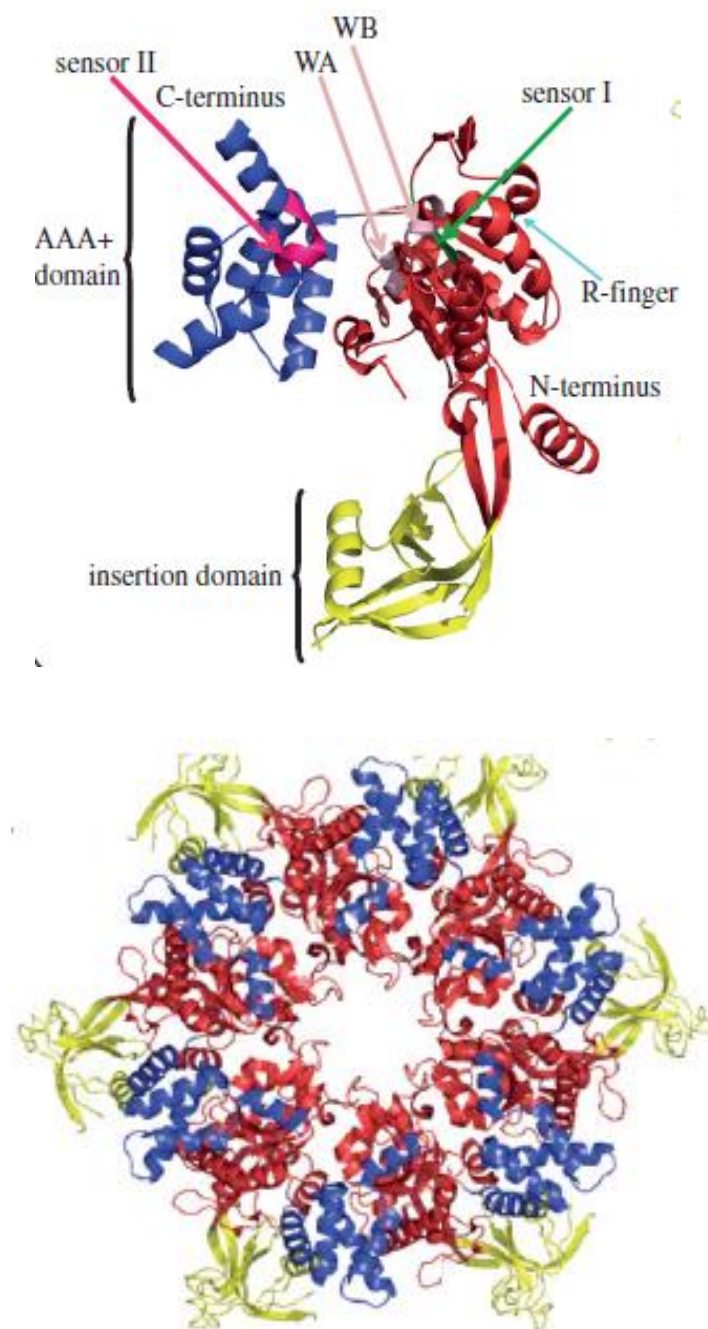
Como descrito acima, o produto da ORF NCU03482 está anotado no banco de dados do fungo (<http://fungidb.org/fungidb/app/record/gene/NCU03482>) como uma *RuvB-like helicase 1*, uma DNA helicase dependente de ATP. Proteínas ortólogas estão amplamente distribuídas no genoma de eucariotos e dados da literatura mostram que a proteína possui uma proteína parceira paróloga, denominada RuvBL2, ambas pertencentes à família das ATPases conhecidas como AAA⁺ (*ATPases associated with diverse celular activities*). Uma análise da sequência polipeptídica da proteína RuvBL1 de humanos revelou a presença dos domínios TIP49 [TBP (*TATA binding protein*)-interacting protein 49] e motivos conservados de ligação e hidrólise de ATP como o Walker A, Walker B e Arg finger.

A estrutura tridimensional da RuvBL1 (PDB 2c9o) humana foi inicialmente determinada por cristalografia de raios-X (MATIAS et al., 2006) e importantes conclusões foram obtidas em relação à sua estrutura. O monômero contém três domínios proteicos (denominados DI, DII e DIII), dos quais o primeiro e o terceiro estão envolvidos na ligação e hidrólise do ATP (Walker A e B). Os estudos de homologia estrutural demonstraram que o segundo domínio, o qual é único entre as proteínas AAA⁺ é um domínio de união a DNA/RNA (MATIAS et al., 2006). A RuvBL1 apresenta estrutura cristalográfica na forma de um hexâmero contendo um canal central de interação com moléculas de DNA (Figura 2). Uma porção da parte externa se apresenta carregada negativamente, enquanto que a parte interna da estrutura se apresenta carregada positivamente indicando assim uma possível ligação e translocação de cadeias simples de DNA, mas que também poderiam interagir com DNA dupla fita e RNA (MATIAS et al., 2006).

Com base na estrutura da proteína humana elucidada por Matias (MATIAS et al., 2006) a estrutura tridimensional do produto da ORF NCU03482 de *N. crassa* foi determinada por modelagem molecular em um trabalho em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Marcos Fontes (IB, UNESP, Botucatu). A proteína de *N. crassa* apresenta uma alta identidade com a proteína humana (88% - material em anexo) e o modelo estrutural gerado nos levou a concluir que o produto da ORF NCU03482

corresponde a uma proteína ortóloga da RuvBL1 humana (Figura 3). A proteína foi denominada como RVB-1, seguindo a nomenclatura de *N. crassa*. Em *N. crassa*, a proteína ortóloga a RuvBL2 foi posteriormente identificada como o produto da ORF NCU06854, a qual está anotada no banco de dados do fungo como uma *RuvB-like helicase 2* e foi denominada como RVB-2.

Figura 2- Estrutura da proteína RuvBL1 de humano (PDB 2c9o).

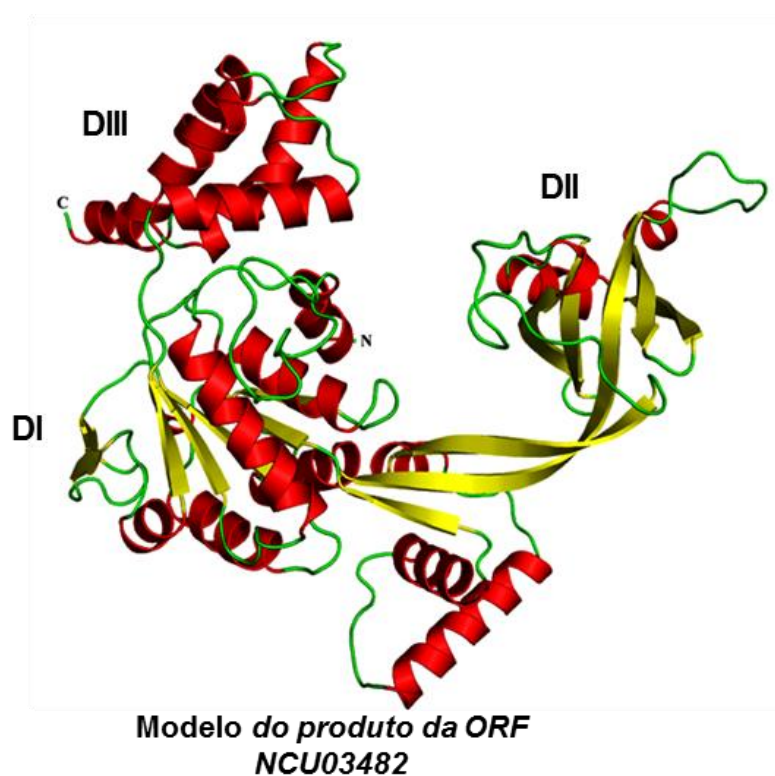
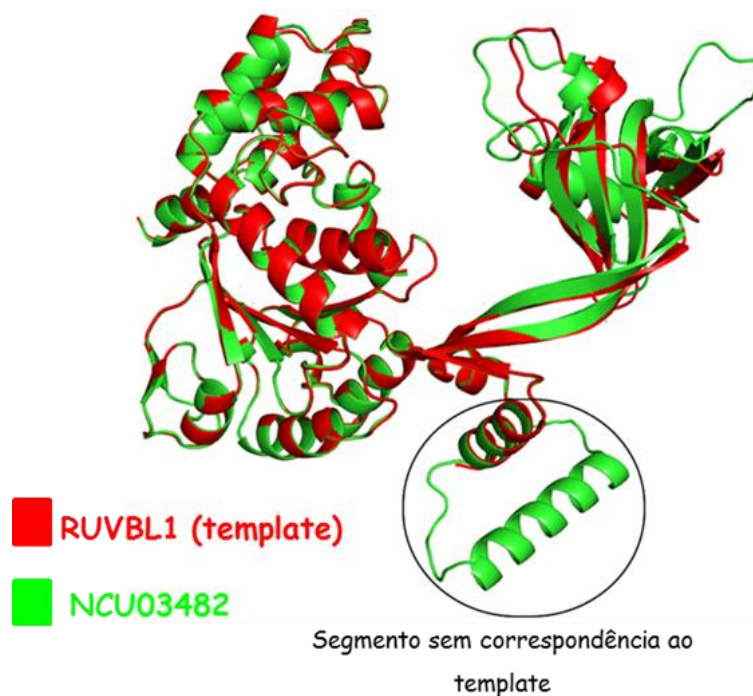


FONTE: NANO, N., HOURY, W. A., 2013.

Vários trabalhos descrevem que a proteína RuvBL2 atua em conjunto com a proteína RuvBL1 na maioria dos processos celulares, formando estruturas hexaméricas e dodecaméricas e inseridas em grandes complexos proteicos (NANO e HOURLY, 2013). Estas proteínas são também conhecidas, respectivamente, como *Pontin* e *Reptin*, ou ainda como TIP49 e TIP48 [TBP (TATA *binding protein*)-*interacting protein*] (TBP) e são portanto, proteínas parálogas. As proteínas Rvb1 e Rvb2 de *S. cerevisiae* mostraram se organizar como dodecâmeros *in vivo* em análises realizadas por microscopia crio-eletrônica (Crio-EM), sendo que as mesmas apresentavam estruturas oligoméricas distintas na presença e na ausência de nucleotídeos (JEGANATHAN et al., 2015). Mais recentemente, a estrutura tridimensional do complexo Rvb-1/2 do fungo termófilo *Chaetomium thermophilum* (PDB 4WW4 e 4WVY) foi descrita na sua totalidade. Neste trabalho, a proteína Rvb-1 recombinante foi cristalizada juntamente com a proteína Rvb-2 (dímero Rvb-1/2, Figura 4), dando origem à formação de complexos hetero-hexaméricos (Figura 5), organizados na forma de complexos hetero-dodecaméricos (Figura 5). Em cada hetero-hexâmero as proteínas encontram-se agrupadas de maneira alternada (LAKOMEK et al., 2015).

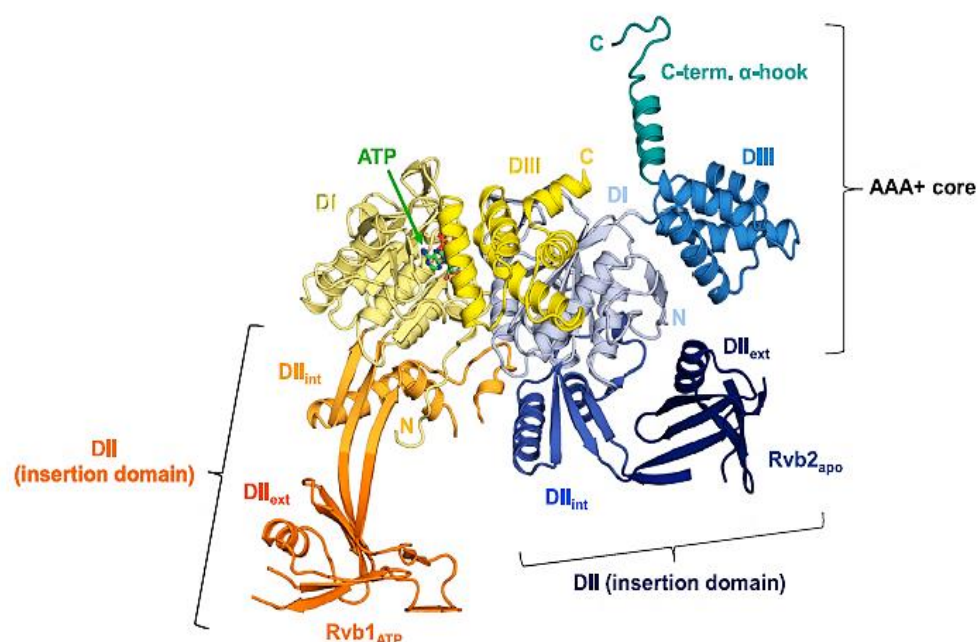
Com base na estrutura da proteína do fungo termófilo *C. thermophilum*, as estruturas tridimensionais das proteínas RVB-1 e RVB-2 de *N. crassa* foram determinadas por modelagem e dinâmica molecular pelo aluno Pablo Acera Mateos (MATEOS P. A., Dissertação de Mestrado, 2015) em um trabalho em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Marcos Fontes (IB, UNESP, Botucatu). Com isso, foi possível obter as prováveis estruturas tridimensionais de ambas proteínas de *N. crassa* (Figura 6) e o resultado mostrou uma alta conservação entre as sequências de aminoácidos (91% para a proteína RVB-1 e 73% para a proteína RVB-2 - material em anexo). Além disso, foram identificados nas sequências de ambas proteínas os motivos típicos de proteínas AAA⁺, como o Walker A e Walker B, de ligação e hidrólise de ATP, bem como os motivos Sensor I, Sensor II, e *Arginine finger*. Com base nesta modelagem, foi possível obter a provável estrutura do dímero RVB-1/2 (Figura 7) e o mesmo mostrou ser estável por dinâmica molecular.

Figura 3 – Sobreposição do modelo teórico do produto da ORF NCU03482 e da proteína RUVBL1 de humanos (MATIAS et al., 2006).



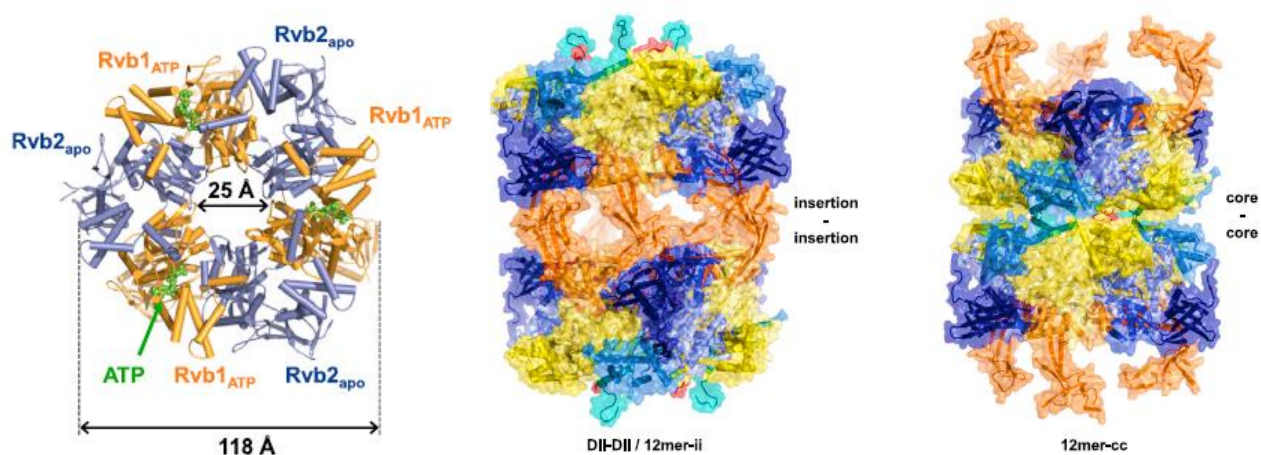
FONTE: Dados do próprio grupo ainda não publicados.

Figura 4 - Estrutura do hetero-dímero Rvb1/2 em *C. thermophilum*.



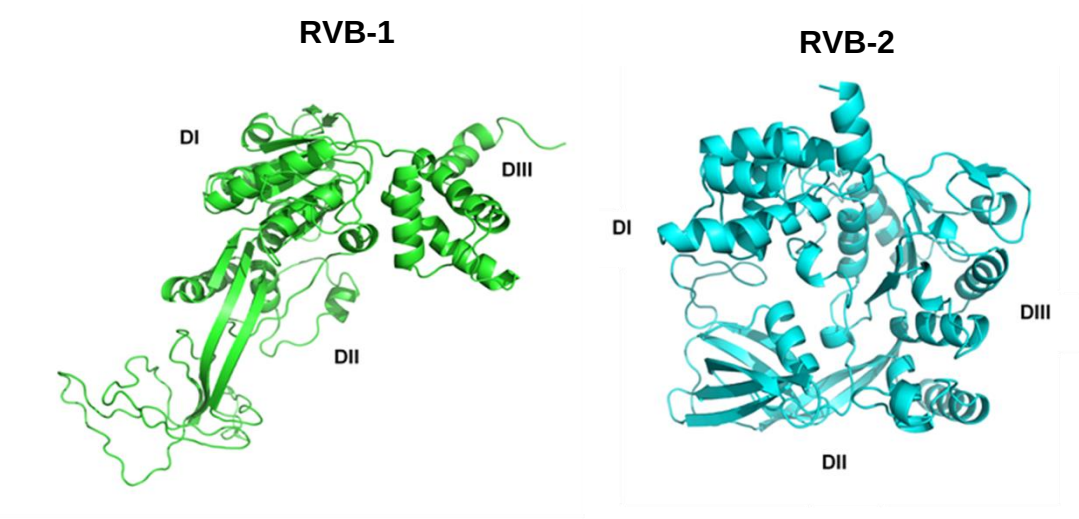
FONTE: LAKOMEK et al., 2015.

Figura 5 - Estrutura do hetero-hexâmero e duas prováveis estruturas do dodecâmero formado pelas proteínas Rvb-1 e Rvb-2 no fungo termófilo *C. thermophilum*.



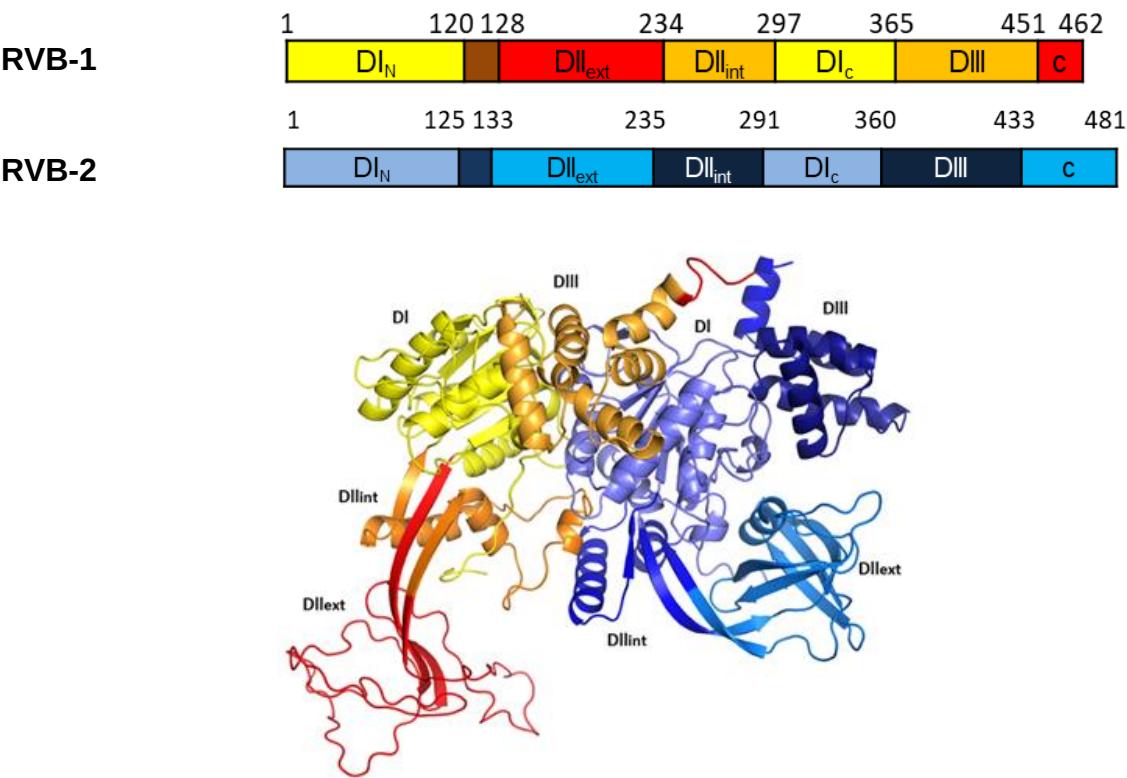
FONTE: LAKOMEK et al., 2015.

Figura 6 - Modelagem das proteínas RVB-1 e RVB-2 do fungo *N. crassa*, utilizando como template as estruturas depositadas para o fungo termófilo *C. thermophilum* (PDB 4ww4).



FONTE: MATEOS P. A., Dissertação de Mestrado, 2015.

Figura 7 – Modelagem do hetero-dímero formado pelas proteínas RVB-1 e RVB-2 do fungo *N. crassa*, utilizando como template as estruturas depositadas para o fungo termófilo *C. Thermophilum*.



FONTE: MATEOS P. A., Dissertação de Mestrado, 2015.

Além disso, o hetero-dímero formado por ambas as proteínas de *N. crassa* (Figura 8) mostrou ser estável por dinâmica molecular e apresentou uma conformação muito semelhante da encontrada para o fungo termófilo *C. thermophilum*. Todos os domínios foram encontrados no hetero-dímero de *N. crassa*, indicando que, de fato ambas as ORFs NCU03482 e NCU06854 codificam as proteínas RVB-1 e RVB-2, ortólogas às proteínas Rvb1p e Rvb2p de leveduras e Rvb-1 e Rvb-2 do fungo termófilo *C. thermophilum*.

1.3 As diversas funções das proteínas ortólogas RVB-1/2

A proteína RuvBL1 foi originalmente descoberta como parte de um complexo com a proteína TATA *binding* (TBP) em ratos (MAKINO et al., 1998). RuvB1 e RuvBL2 foram encontradas em complexos com o grande oligômero da holoenzima RNA polimerase II (QIU et al., 1998). Posteriormente, RuvBL2 foi identificada como uma proteína parceira de RuvBL1 em células humanas (KANEMAKI et al., 1999).

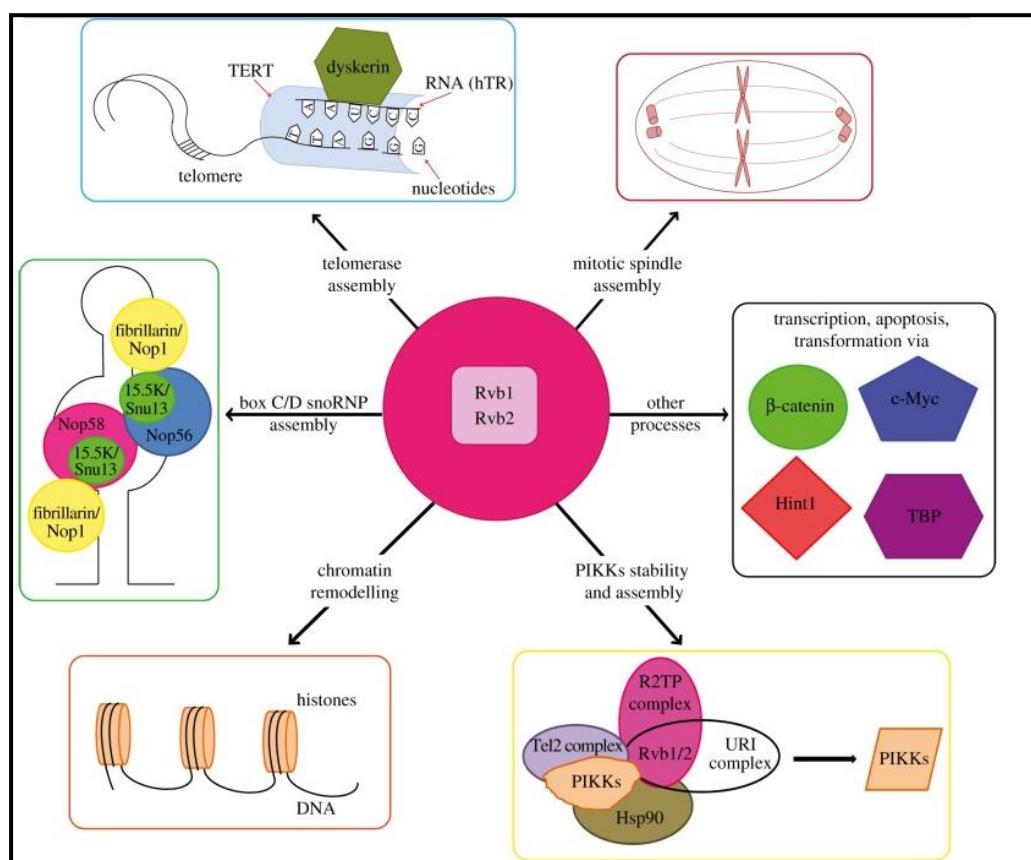
Ambas proteínas de levedura compartilham similaridade de sequência limitada (variando ao redor de 30%) com a helicase bacteriana RuvB (PUTNAM et al., 2001). RuvB impulsiona a migração e a resolução da junção Holliday em complexo com RuvA e RuvC durante recombinação homóloga e reparo do DNA em bactéria. Essa similaridade sugeriu que as Rvbs poderiam ter atividade helicase dependente de ATP, desde de que a supressão por RNAi dos genes *RVB1* e *RVB2* em *S. cerevisiae* foi complementada pela superexpressão do complexo bacteriano RuvAB (RADOVIC et al., 2007). Sabe-se ainda que as proteínas Rvbs de levedura purificadas, produzidas na forma recombinante em *E. coli*, exibem atividade ATPásica e helicase dependente de ATP e que estas aumentam significativamente quando ambas as proteínas estão juntas (GRIBUN et al., 2008).

Os genes codificadores de ambas proteínas foram considerados essenciais em todos os organismos modelo utilizados até agora, incluindo *S. cerevisiae* (QIU et al., 1998), *Drosophila melanogaster* (BAUER et al., 2000) e *Caenorhabditis elegans* (MATIAS et al., 2006) e em células de mamífero (BERESHCHENKO et al., 2012; MIR et al., 2015). Desde a sua descoberta, as proteínas RuvBLs foram encontradas associadas a muitos processos celulares (JHA; DUTTA, 2009), incluindo remodelagem da cromatina (JÓNSSON et al., 2001), regulação da expressão gênica (OHDATE et al., 2003), biogênese do complexo de

ribonucleoproteínas nucleolares (MCKEEGAN; DEBIEUX; WATKINS, 2009), mitose (GARTNER et al., 2003), complexo da transcriptase reversa da telomerase (VENTEICHER et al., 2008), montagem do complexo da RNA polimerase II (BOULON et al., 2010; FORGET et al., 2010) e sinalização relacionada com a proteína quinase fosfatidilinositol-3-quinase (PIKK) (IZUMI; YAMASHITA; OHNO, 2012) (Figura 8).

Muitos estudos afirmam que estas proteínas podem ter atividade como chaperonas-like em diferentes complexos celulares, nos quais suas atividades ATPásicas são requeridas para a formação de complexos multimoleculares e as proteínas Rvbs poderiam, ou não, continuar participando da função celular de tais complexos (NANO et al., 2013).

Figura 8 - As múltiplas funções celulares das proteínas RuvBLs.

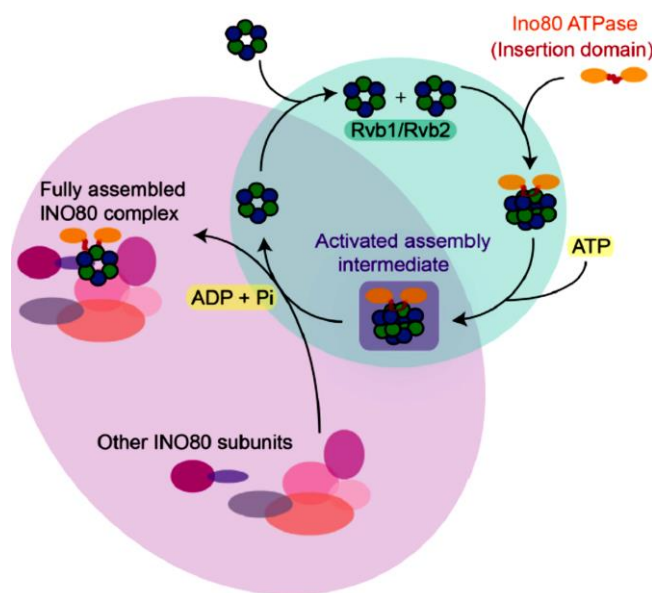


FONTE: NANO e HOURY, 2013.

As proteínas Rvb1 e Rvb2 são parte integral do complexo INO80 de levedura, o qual catalisa, de maneira ATP-dependente, o deslizamento ao longo dos

nucleossomos e está envolvido com o reparo de DNA de cadeia dupla e na regulação transcricional (JÓNSSON et al., 2001). Estudos recentemente realizados, mostraram que as proteínas do complexo INO80 são capazes de se ligar ao hexâmetro formado pelas proteínas Rvb1 e 2, induzem dodecamerização e aumentam a atividade ATPásica do complexo Rvb1/2 em levedura, promovendo a formação do complexo INO80 completo, como pode ser observado na Figura 9 (ZHOU et al., 2017).

Figura 9 - A participação das proteínas Rvb1 e Rvb2 na formação do complexo INO80 de levedura.



FONTE: ZHOU et al., 2017.

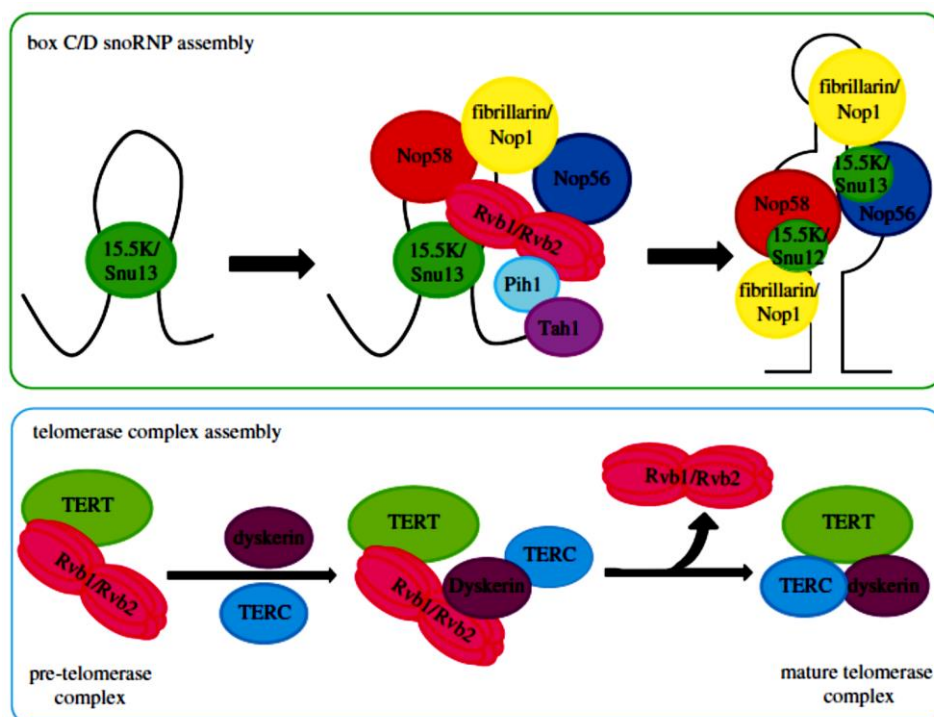
No complexo da transcriptase reversa da telomerase, sabe-se que as proteínas Rvb1 e Rvb2 atuam como chaperonas-*like*, recrutando de forma ATP-dependente duas proteínas essenciais para a formação do complexo completo. De uma maneira geral, o complexo hetero-dodecâmero Rvb1/2 recruta a proteína TERC (*telomerase reverse transcriptase*) e sua proteína parceira Dyskerin (*binding TERC protein*) para formar o complexo formado por TERT (transcriptase reversa da telomerase)-TERT-Dyskerin (Figura 10). Estudos mostraram que a ausência do *motif* Walker B (responsável pela hidrólise do ATP) na proteína Rvb1 inviabilizou a formação do complexo da telomerase indicando que a proteína, bem como sua atividade ATPásica, é essencial para a formação do complexo (NANO et al., 2013).

Na levedura *S. cerevisiae*, as proteínas Rvb1 e Rvb2 são parte integral do complexo R2TP, que interage com a chaperona Hsp90. Esta interação se dá através

de duas proteínas chamadas Tah1 (*tetratricopeptide repeat (TPR)-containing protein associated with Hsp90*) e Pih1 (*protein interacting with Hsp90*), e junto com o complexo Rvb1/2, da origem ao complexo R2TP, sendo este muito conservado em eucariotos, inclusive em humanos (NANO; HOURY, 2013). O complexo R2TP tem várias funções celulares, entre elas a montagem da ribonucleoproteína nucleolar pequena (snoRNP), apresentado na figura 10 e processamento de RNA pré-ribossômico em células humanas e de levedura. A formação do complexo R2TP é essencial para a localização nucleolar do complexo snoRNP e embora as interações entre as proteínas Rvbs e os outros componentes deste complexo sejam fracas, o ATP parece estimular estas interações (NANO; HOURY, 2013).

Sabe-se que as proteínas Rvb1 e Rvb2 estão envolvidas em diferentes tipos de câncer, podendo estar associadas à regulação de diferentes fatores de transcrição envolvidos na tumorigênese. Devido à importância delas na proliferação celular, bem como, por serem essenciais para sua sobrevivência da célula, as proteínas Rvb1/2 tornaram-se alvo cada vez mais detalhados de estudos (MAO; HOURY, 2017).

Figura 10 – Participação das proteínas Rvb1 e Rvb2 na formação do complexo da transcriptase reversa da telomerase e na formação do complexo snoRNP.



Objetivos

2 OBJETIVOS

Como descrito anteriormente, a proteína RVB-1 de *N. crassa* foi identificada como sendo uma das proteínas ligantes do *motif* STRE presente no promotor do gene responsivo a estresse térmico que codifica glicogênio sintase (*gsn*). Esta proteína tem como paróloga a proteína RVB-2 e o principal objetivo deste trabalho foi investigar o papel das proteínas RVB-1 e RVB-2 na situação de estresse térmico, bem como realizar parcialmente a caracterização bioquímica e biofísica das mesmas. Para isso, foram traçados os seguintes objetivos para este trabalho:

- Validar os ensaios de localização subcelular destas proteínas durante estresse térmico.
- Analisar a expressão das proteínas RVB-1 e RVB-2 por *Western blot*.
- Produzir ambas proteínas na forma recombinante em *E. coli* utilizando um vetor bicistrônico (pRSFduet-1).
- Analisar a atividade ATPásica das proteínas recombinantes.
- Avaliar os estados de oligomerização das proteínas em solução, na presença e ausência de ATP/ADP.
- Analisar a capacidade de ligação das proteínas recombinantes a fragmentos de DNA dupla fita através de experimentos de retardamento em gel, na presença e ausência de ATP.

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

As técnicas moleculares que foram utilizadas na construção plasmidial, tais como amplificação de fragmentos de DNA por PCR, extração de DNA plasmidial, digestão com enzimas de restrição, transformação de células de *E. coli* competente e *N. crassa*, são metodologias de uso rotineiro no laboratório, que seguem os procedimentos recomendados por Sambrook e Russell (2001).

3.1 Linhagens de microrganismos

3.1.1 *Escherichia coli*

Tabela 1 – Linhagens de *E. coli* utilizadas no trabalho.

Linhagem	Genótipo	Referência
DH10B	F ⁻ endA1 deoR ⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr hsdRMS mcrBC) Str ^R λ ⁻ .	openwetware.org
Rosetta (DE3) pLysS	<i>E. coli</i> str. B F ⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB ⁻ mB ⁻) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB ⁺]K- 12(λS) pLysS[T7p20 orip15A](Cm ^R).	openwetware.org

FONTE: Autoria própria

3.1.2 *N. crassa*

Tabela 2 – Linhagens de *N. crassa* utilizadas no trabalho

Linhagem	Genótipo	Referência
FGSC#2489 (selvagem)	A	FGSC*
FGSC#2489 <i>his-3</i>	A, <i>his-3</i>	FGSC
FGSC#9718	a, <i>mus51::hph</i> **	FGSC
FGSC#9717	a, <i>mus52::bar</i> ***	FGSC
<i>pNat-rvb-1-sfgfp</i>	A, <i>his3::pNat-rvb-1-sfgfp</i> , <i>his-3</i> ⁺	CAMPANELLA, 2015
<i>pNat-rvb-2-sfgfp</i>	A, <i>his3::pNat-rvb-2-sfgfp</i> , <i>his-3</i> ⁺	CAMPANELLA, 2015
<i>rvb-1-v5</i>	A, <i>rvb-1::rvb-1-v5</i> , <i>hph</i> ⁺	MATEOS, P. A., Dissertação, 2016
<i>rvb-1-v5 his-3</i>	A, <i>rvb-1::rvb-1-v5</i> , <i>hph</i> ⁺ , <i>his-3</i>	Este trabalho
<i>rvb-1-v5/rvb-2-sfgfp</i>	A, <i>rvb-1::rvb-1-v5</i> , <i>hph</i> , <i>his-3::pNat-rvb-2-sfgfp</i> , <i>his-3</i> ⁺	Este trabalho

*FGSC (Fungi Genetics Stock Center, USA).

**O gene *hph* é o responsável por conferir resistência a higromicina (Invitrogen).

***O gene *bar* é o responsável por conferir resistência ao herbicida glufosinato de amônio (Bayer).

3.2 Construções plasmidiais

Tabela 2 – Construções plasmidiais utilizadas neste trabalho

Construção	Plasmídeo	Referência
pET28a- <i>rvb-1</i>	pET28a	FREITAS, F.Z.
pET28a- <i>rvb-2</i>	pET28a	MATEOS, P. A., Dissertação, 2016
pRSFduet- <i>His-rvb-2</i>	pRSFduet-1	Este trabalho
pRSFduet- <i>His-rvb-2/rvb1-v5</i>	pRSFduet-1	Este trabalho
pTSL91A-pNat- <i>rvb-2-sfgfp</i>	pTSL91A	CAMPANELLA, J.E.M., TCC, 2015
pJET- <i>rvb-1-v5</i>	pJET <i>blunt</i> 1.2	Este trabalho
pJET- <i>rvb-2</i>	pJET <i>blunt</i> 1.2	Este trabalho

3.3 Oligonucleotídeos

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados no trabalho.

Primer	Sequências	Sítios/função
pRSFduethistagRVB2-F	5' – CGCGGATCCGATGGCTGCTCAGGTCGTTAC – 3'	Clonagem / BamHI
pRSFhistagRVB-2-R	5' – TTTATAGCGGCCGCTTAGCTGCTGGTATCCATG – 3'	Clonagem / NotI
pRSFRVB-1-v5– F	5' – GGGAATTCCATATGGTGCAAATCAGCGAGG – 3'	Clonagem / NdeI
pRSFRVB-1-v5– R	5' – CGGGGTACCTCACGTAGAATCGAGACCGAG- 3'	Clonagem KpnI
EMSA – Stre1-F	5' – CACTGCACAGATCTGGAGGACC – 3'	EMSA
EMSA – Stre1-R	5' – TCTTGAGACATCCATGGGCATTTCAG – 3'	EMSA

3.4 Meios de cultura

3.4.1 *E. coli*

2YT:

1,6% triptona

1,0% de extrato de levedo

0,5 % de NaCl

Para culturas sólidas foi adicionado ao meio 2% de ágar

3.4.2 *N. crassa*

Mínimo de Vogel:

O meio de cultivo utilizado para o crescimento, manutenção das linhagens do fungo *N. crassa* e para os experimentos, foi o meio mínimo de Vogel (VM) (Vogel, 1956), acrescido de sacarose 2%. Para as culturas realizadas em meio sólido, o meio VM foi acrescido de sacarose 2% e ágar 2%.

O meio VM é um meio quimicamente definido, preparado a partir da diluição de uma solução estoque 50x concentrada. Esta solução estoque é feita a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 mL de água destilada:

510 g citrato de sódio

250 g KH_2PO_4

100 g NH_4NO_3

10 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (previamente dissolvido em água destilada)

5 mL solução de elementos traços

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

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

5,0 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

5,0 g ácido cítrico. H_2O

5,0 g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,0 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

0,25 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0,05 g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

0,05 g H_3BO_3

0,05 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Synthetic cross:

O meio utilizado para realizar cruzamentos entre diferentes linhagens foi o meio SC (WESTERGARD; MITCHELL, 1947) na concentração de 0,5x acrescido de sacarose 0,5% e ágar 2% (EBBOLE; SACHS, 1990) O meio SC é um meio

quimicamente definido com pH 6,5 e preparado como uma solução estoque de 2x concentrada, por meio da dissolução completa dos seguintes sais:

- 2 g KNO₃
- 1,4 g K₂HPO₄
- 0,2 g KH₂PO₄
- 0,2 g NaCl
- 1 g MgSO₄·7H₂O
- 0,2 g CaCl₂·2H₂O
- 0,1 mL biotina (0,1 mg/mL)
- 0,2 mL solução estoque de elementos traços.

Após a dissolução completa dos sais, o volume foi ajustado para 1 L com água destilada e 667 µL de clorofórmio foram adicionados para conservação. A solução foi armazenada a 4°C.

Top agarose:

- 1,5% Agarose
- 2M Sorbitol
- 2 x FGS

Bottom ágar:

- 1x VM
- 1,5% Ágar
- 1x FGS
- 2 M sorbitol

Estes meios foram utilizados durante a seleção de segregantes do cruzamento e de transformações. É composto por um meio VM 1x acrescido de 1% de solução FGS (Frutose 0,5%, Glicose 0,5% e Sorbose 20%).

3.5 Soluções e tampões

3.5.1 Tampões de lise

Tampão de lise para *N. crassa*:

50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0

115 mmol L⁻¹ NaCl

5% glicerol

0,01% NP-40

Inibidores de protease:

50 mmol L⁻¹ NaF

1 mmol L⁻¹ EDTA

1 mmol L⁻¹ PMSF

1 mmol L⁻¹ Benzamidina

2 mmol L⁻¹ TLCK

1 µg/mL Aprotinina

1 µg/mL Pepstatina A

Tampão de lise para proteínas recombinantes:

50 mmol L⁻¹ Hepes pH 7.5

500 mmol L⁻¹ NaCl

50 mmol L⁻¹ Imidazol

0,01% Triton X-100

10% glicerol

Inibidores de protease:

1 mmol L⁻¹ Benzamidina

1 mmol L⁻¹ PMSF

3.5.2 Tampões para purificação das proteínas recombinantes

Tampão para afinidade A:

50 mmol L⁻¹ Hepes pH 7,5

500 mmol L⁻¹ NaCl

50 mmol L⁻¹ Imidazol

10% glicerol

Tampão para afinidade B:

50 mmol L⁻¹ Hepes pH 7,5

500 mmol L⁻¹ NaCl

500 mmol L⁻¹ Imidazol

10% glicerol

Tampão para gel filtração:

50 mmol L⁻¹ Hepes pH 7,5

500 mmol L⁻¹ NaCl

5% glicerol

3.5.3 Soluções e tampões para SDS-PAGE

Tampão Tris-glicina 10 x:

250 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,0

2,5 M glicina

Tampão de Amostra:

100 Mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 6,8

4% SDS

0,2% Azul de bromofenol

20% glicerol

100 mmol L⁻¹ DTT

Solução corante:

2,5 g *Coomassie Brilliant Blue*

450 metanol

100 mL ácido acético glacial

q.s.p 1L água ultra pura

Solução descorante:

450 mL metanol

100 mL ácido acético glacial

q.s.p 1L água ultra pura

3.5.4 Soluções e tampões para *Western blot*

Solução de Transferência:

2,42 g Tris
11,26 g glicina
200 mL metanol
q.s.p 1L água ultra pura

TBST:

2,43 g Tris
22,5 g NaCl
0,5 mL Tween-20
q.s.p 1L água ultra pura

Tampão de bloqueio:

1x TBST
8% leite em pó desnatado

Solução Reveladora:

100 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 8,5
0,2 mmol L⁻¹ ácido p-cumárico
1,2 mmol L⁻¹ luminol
1,5 µL H₂O₂ 30% para cada 10 mL de solução antes do uso.

3.5.5 Soluções para microscopia

Solução de fixação:

3,7% (v/v) formaldeído
50 mmol L⁻¹ NaH₂PO₄ ,pH 7,0
0,2% (v/v) Tween 80

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

350 mmol L⁻¹ NaCl
180 mmol L⁻¹ KCl

25 mmol L⁻¹ Na₂HPO₄

18 mmol L⁻¹ KH₂PO₄

pH 7,4

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

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

3.6 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico e fornecidos pela Sigma, Amresco ou Merck. As endonucleases de restrição, assim como as demais enzimas modificadoras, foram fornecidas pela *New England Biolabs*.

3.7 Propagação das linhagens de *N. crassa*

3.7.1 Obtenção de conídios

Para a obtenção de conídios, as diferentes linhagens foram cultivadas em garrafas de vidro contendo 50 mL de meio VM sólido, acrescido de sacarose 2%, a 30°C durante 3 dias. Em seguida, as linhagens foram expostas à luz e à temperatura ambiente por 8 a 9 dias. Após esse período, os conídios foram coletados com água destilada estéril gelada, filtrados através de gaze estéril, e a concentração das suspensões de conídios foi determinada em câmara de Neubauer.

3.8 Extração de DNA genômico de *N. crassa*

O DNA genômico foi extraído a partir dos micélios das linhagens de interesse após crescimento a 250 rpm, 30°C por 24 h em meio de cultura VM líquido, acrescido de 2% sacarose. Para isto, uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo uma mistura de 500 µL de tampão de extração de DNA genômico (200 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8,0, 250

mmol L⁻¹ NaCl, 25 mmol L⁻¹ EDTA e 1% SDS) e 500 µL de uma solução de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico na proporção 25:24:1 e homogeneizado em vortex.

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

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

3.9 Choque térmico

Uma suspensão de conídios (1 mL de uma solução 10⁸ cels/mL) foi inoculada em 1 L de meio VM líquido e colocada a 30°C, sob agitação constante, de 250 rpm por 24 h. Após esse período, o micélio foi coletado por filtração a vácuo em papel filtro, e igualmente dividido em cinco amostras. Uma delas foi congelada em nitrogênio líquido e armazenada a -80°C (amostra controle, não submetida a estresse térmico) e as outras amostras foram transferidas para frascos contendo 200 mL de meio VM 1x líquido contendo sacarose 0,5%, previamente aquecido a 45°C (choque térmico). Amostras de micélio foram retiradas após 30, 60, 120 e 240 min de incubação, imediatamente filtradas a vácuo, congeladas em nitrogênio líquido e guardadas -80°C. Os experimentos foram realizados em triplicatas biológicas.

3.10 Extração de RNA total

Amostras de micélio da linhagem selvagem submetidas ou não ao estresse térmico foram utilizadas para a extração de RNA. O procedimento utilizado para a extração de RNA total foi descrito por Sokolovsky et al. (1990). Uma pequena quantidade de micélio congelado foi pulverizado em cadinho de porcelana com nitrogênio líquido e o pó resultante foi transferido para microtubos contendo uma mistura de 750 μL de tampão de lise ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8,0; $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ NaCl; 10 mmol L^{-1} EDTA; 4%SDS) e 750 μL de fenol saturado em 100 mmol L^{-1} Tris-HCl, pH 8,0. A suspensão foi homogeneizada em *vortex* durante 5 min a temperatura ambiente e centrifugada a $10.000 \times g$, 10 min a 4°C . O sobrenadante foi transferido para novo tubo contendo igual volume de fenol e agitado em *vortex* rapidamente para homogeneização. Uma nova centrifugação foi realizada a $10.000 \times g$, 10 min a 4°C . O RNA contido na fase aquosa foi precipitado com 0,75 volumes de uma solução de 8 mol L^{-1} LiCl, mantido a 4°C por 2 h e coletado a $10.000 \times g$, 10 min a 4°C .

O precipitado foi solubilizado em 300 μL de água tratada com DEPC e novamente precipitado com 30 μL de 3 mol L^{-1} acetato de sódio pH 5,2 e 750 μL de etanol absoluto gelado a 4°C durante 5 min. O RNA total foi coletado a $10.000 \times g$, 10 min a 4°C , lavado duas vezes com uma solução de etanol 70% gelada a $10.000 \times g$, 10 min a 4°C , seco e dissolvido em 100-130 μL de água previamente tratada com DEPC (Diethyl Pirocarbonato). A concentração do RNA foi quantificada a 260 nm utilizando o espectrofotômetro Beckman, modelo DU-640 e a pureza das amostras foi analisada através da relação das absorbâncias a 260/280 e 230/270 nm.

3.11 Microscopia de fluorescência

Conídios das linhagens *pNat-rvb-1-sfgfp* e *pNat-rvb-2-sfgfp* foram inoculados em placas de Petri contendo lamínulas com meio VM 1x acrescido de sacarose 2% e incubados por 12 h a 30°C . Em seguida, uma lamínula foi separada e o meio de cultura das outras placas foi substituído por outro previamente aquecido na temperatura de 45°C e as placas foram mantidas nesta condição por 30 min. O micélio foi então lavado com tampão PBS 1x, fixado com formaldeído e os núcleos corados com uma solução de DAPI ($0,5 \mu\text{g/mL}$). A seguir, as lâminas foram lavadas

em PBS, montadas em lamina e levadas ao microscópio ótico de fluorescência AXIO Imager.A2 Zeiss acoplado com uma câmera AXIOCam MR3. Imagens das laminas foram coletadas e processadas pelo *software AxioVision*. A fluorescência da GFP foi visualizada com a excitação e emissão nos comprimentos de onda de 490 e 525 nm (filtro FITC), respectivamente, e a fluorescência do DAPI, nos comprimentos de onda de excitação em 358 nm (UV) e emissão 461 nm (azul).

3.11.1 Reações de PCR e purificação de fragmentos de DNA

Para a amplificação das sequências de DNA desejadas, 1 µL de DNA molde foi adicionado de 10 µL de Phusion *master mix* 2x (Thermo Scientific), 1 µL do primer R (50 µM) e 1,0 µL do primer F (50 µM), e o volume completado para 20 µL com água ultra pura destilada. As reações de amplificação foram realizadas em um termocilador, utilizando o seguinte programa:

1º ciclo: 98°C por 10 s

2º ciclo: 98°C por 2 s; X°C por 10 s e 72°C por 1 min 30 s (35 x), em que “X” é a temperatura de anelamento dos primers utilizados na reação

3º ciclo: 72°C por 5 min

4°C

Após a PCR, o fragmento de DNA amplificado foi purificado por eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão TAE 1x (0,04 mol L⁻¹ Tris, 50 mmol L⁻¹ EDTA, 1 mol L⁻¹ ácido acético glacial, em pH 8,0), contendo 75,0 µL de brometo de etídeo (1 µg/µL), a 100 V por aproximadamente 45 min. As bandas de DNA foram visualizadas em um transluminador, recortadas e purificadas a partir do gel, utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA and Band purification (GE HealthCare), segundo instruções do fabricante e analisados em gel de agarose.

3.12 Construção de uma linhagem de *N. crassa* expressando RVB-1-V5 e RVB-2-sfGFP

Foi utilizada a linhagem de *N. crassa rvb-1-v5* (Hyg^R), construída em nosso laboratório por outro aluno de Mestrado, na qual o gene *RVB-1* está fusionado ao epítipo V5 no locus nativo, o que permite analisar a expressão da proteína por hibridização com o anticorpo anti-V5. Para construir a linhagem expressando ambas

proteínas com diferentes *tags*, foi realizado um cruzamento entre a linhagem FGSC#2489 (A, *his-3*) com a linhagem *rvb-1-v5* (a, Hyg^R). Inicialmente, uma das linhagens foi plaqueadas em meio SC acrescido de sacarose 0,5% e ágar 2% e deixada no escuro a 30°C durante 6-7 dias. A seguir, a linhagem de *mating-type* oposto foi inoculada sobre o micélio formado e a placa foi deixada até o aparecimento dos ascósporos provenientes da reprodução sexuada.

Os ascósporos foram coletados com água, ativados por 1h / 60°C e incubados numa suspensão 1:100 de água em meio VM contendo 2% de sorbose, frutose 0,5% e glicose 0,5% para crescimento colonial. A sorbose induz crescimento colonial em *N. crassa* (EBBOLE; SACHS, 1990) e permite uma seleção individual dos segregantes. No meio, também foi adicionado higromicina (4 µL/mL) e histidina (1 µg/mL) para selecionar clones com resistência à higromicina e auxótrofos para histidina. Esta linhagem resultante foi denominada *rvb-1-v5 his3⁻* e foi utilizada para a transformação com o plasmídeo pTSL91A-pNat-*rvb-2*, construído anteriormente, o qual permite a integração no *locus his3* e complementação da marca de auxotrofia para histidina (AHMED; CASE; GILES, 1964). Para isto, conídios recém coletados da linhagem foram lavados 3 x com 1 mol L⁻¹ sorbitol estéril e misturados a 3 µL da construção. A mistura foi então transferida para uma cubeta de eletroporação estéril e eletroporada em um eletroporador GenePulser(II) da BioRad nas seguintes condições: 2000V, 25 µF e 300 Ω. Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL de solução 1 M de sorbitol gelado foi adicionado. A suspensão de células foi então misturada a 10 mL de meio *top* agarose e colocado em placas contendo meio *bottom* ágar na presença de 4 µL/mL de higromicina. As placas foram mantidas a 30°C por dois dias. Os transformantes foram removidos das placas com o auxílio de agulhas estéreis e inoculados em meio VM sólido acrescido ou não com histidina (1 µL/mL). Apenas os transformantes capazes de crescer na ausência de histidina e resistentes a higromicina foram selecionados. A linhagem resultante deste cruzamento foi denominada *rvb-1-v5 rvb-2-sfgfp*.

3.13 Análise da expressão das proteínas RVB-1-V5 e RVB-2-GFP em *N. crassa* durante estresse térmico

Conídios da linhagem foram utilizados em experimentos de estresse térmico como descrito no item 3.9. Cerca de 1 g dos micélios obtidos foi pulverizado em

nitrogênio líquido e, em seguida, transferido para tubo Eppendorf de 1,5 mL contendo 1 mL de solução gelada de tampão de lise. A mistura foi fortemente agitada em *vortex* e, em seguida, centrifugada a $10.000 \times g/4^{\circ}\text{C}/10$ min. O sobrenadante foi recolhido em um tubo Eppendorf novo. Uma alíquota foi utilizada para a determinação das proteínas totais do extrato celular pelo método de Lowry modificado (HARTREE, 1972).

Para a análise da expressão da proteína RVB-1-V5, ensaios de *Western blot* foram realizados. Aproximadamente 25 μg (proteína total) foram fracionados por SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970) e as proteínas transferidas para membrana de nitrocelulose. A membrana foi bloqueada sob agitação em solução tampão de bloqueio por 16h / 4°C . Em seguida, ela foi lavada com TBST 1x e incubada com anticorpo primário anti-V5 (Invitrogen) na diluição 1:5000 em 1x TBST + 3% leite, por 6 h, 4°C . Após lavagem da membrana em 1x TBST, adicionou-se um anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma, diluição 1:15.000 em 1x TBST + 3% leite) por 2 h a temperatura ambiente. A membrana foi novamente lavada em 1x TBST. As membranas foram deixadas durante 40 s em contato com 5 mL de solução reveladora e rapidamente expostas ao filme de raio X.

3.14 Produção e caracterização biofísica das proteínas RVB-1 e RVB-2 recombinantes em *E. coli*. Ensaio utilizando as proteínas isoladas

3.14.1 Produção das proteínas recombinantes

Nesse estudo, foram realizadas a transformação das construções plasmidiais pET28a-*rvb-1* e pET28a-*rvb-2* na linhagem de *E. coli* Rosetta (DE3) pLys. Para isso, as células competentes da bactéria foram incubadas durante 15 min em banho de gelo com 1 μL das construções. As misturas foram, em seguida, submetidas a um choque térmico de 42°C durante 30 s. As amostras foram acrescidas de 400 μL de meio 2YT e incubadas por 30 min a 37°C . Após a incubação, o produto da transformação foi inoculado em placas de meio 2YT, acrescido de 2% glicose e 2% ágar, contendo canamicina (100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) e cloranfenicol (25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). As placas foram colocadas na estufa durante 12-16 h a 37°C .

Três clones de cada construção foram crescidos em pré-inóculos de 5 mL de meio 2YT + 2% glicose por cerca de 16 h e uma alíquota de 1 mL foi transferida para 50 mL de meio 2YT acrescido de antibióticos e deixado, sob agitação constante a 37°C, até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6. As células foram então induzidas com IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídio) numa concentração final de 0,4 mmol L⁻¹ durante 4 h. Após o período de indução, 1,5 mL da cultura foram coletadas a 10.000 rpm, 1 min. A seguir, o precipitado de células da cultura foi suspenso em 25 μ L de água e 5 μ L de tampão de amostra. Após o preparo das amostras, elas foram centrifugadas e 20 μ L do sobrenadante foram aplicados em gel SDS-PAGE 12% e a eletroforese foi realizada tampão Tris-glicina a 100 V. Os géis foram corados com solução corante e descorados com a solução descorante.

Um clone produtor de cada construção foi utilizado para um ensaio de *Western blot* com anticorpo anti-His conjugado com fosfatase alcalina (Sigma) e revelado em tampão bicarbonato (100 mmol L⁻¹ NaHCO₃, 1 mmol L⁻¹ MgCl₂, pH 9,8) acrescido de 100 μ L de NBT (cloreto p-nitroazul de tetrazólio, 30 mg/mL em 70% DMF) e 100 μ L de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato de p-toluidina, 15 mg/mL em DMF).

3.14.2 Ensaio de solubilidade das proteínas recombinantes

Para verificar se as proteínas recombinantes eram solúveis, 1 mL do pré-inóculo de cada construção foi transferido para 1 L de meio 2YT acrescido de glicose e incubados a 37°C até atingir uma DO_{600nm} de aproximadamente 0,6. As células foram induzidas com IPTG numa concentração final de 0,4 mmol L⁻¹ durante 12 h / 18°C. O objetivo foi realizar uma indução longa a baixa temperatura a fim de promover um melhor resultado de solubilidade para as proteínas recombinantes. Ao final da indução, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi guardada -80°C (fração total) e o restante de células da cultura foram coletadas por centrifugação. O sobrenadante foi descartado e o precipitado mantido em gelo. Foram adicionados então 50 mL de tampão de lise para proteínas recombinantes acrescido de 0,01 mg / mL de lisozima e 5 unidades de DNase (Sigma) e após total suspensão, o homogeneizado ficou em repouso por 30 min em banho de gelo seguido de 10 ciclos de lise em um sonicador *Sonics Vibra-cell* a 40% de amplitude (10 ciclos de 30 s com intervalo de 1 min em banho de gelo). O lisado foi então centrifugado 20.000 x g

/ 4°C / 20 min para separar a parte insolúvel. O sobrenadante foi guardado em banho de gelo e o precipitado ressuspenso no mesmo tampão de lise acrescido de inibidores de proteases.

3.14.3 Purificação das proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2

As etapas de purificação e as análises bioquímicas e biofísicas foram realizadas em parceria com o laboratório de Biofísica Molecular de Proteínas do Instituto de Química da USP de São Carlos (IQSC), com colaboração do Prof. Dr. Júlio César Borges e do Mestrando Sérgio Luiz Ramos Junior. A purificação das proteínas recombinantes foi realizada pelos métodos cromatográficos de afinidade ao Ni^{2+} e de exclusão molecular preparativa. Na etapa cromatográfica de afinidade, o extrato celular solúvel foi aplicado na coluna HisTrap Chelating HP 5 mL (GE Helthcare Lifesciences), seguido por uma lavagem de 5 volumes de coluna (CV) com tampão para afinidade A; após a lavagem, as proteínas foram eluídas em 2 CV de tampão B. Imediatamente, as proteínas eluídas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular preparativa (CEMp), realizada em coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE Helthcare Lifesciences) acoplada ao sistema FPLC, utilizando o equipamento ÄKTA Prime plus (GE Helthcare Lifesciences), previamente equilibrada com tampão de gel filtração. As proteínas foram eluídas em mesmo tampão, sendo que um banho térmico de circulação foi acoplado para manter a temperatura constante de 4°C. Para acompanhar a eficácia do processo, todos os passos de expressão e purificação foram verificados por SDS-PAGE 12%.

3.14.4 Parâmetros físico-químicos das proteínas recombinantes

Utilizando o portal de Bioinformática ExPASy, alguns parâmetros foram calculados para as proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2 com o programa ProtParam (disponível em <http://web.expasy.org/protparam/>) e estão relacionados na tabela abaixo:

Tabela 4 – Parâmetros das proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2

Proteínas	$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{M}^{-1} / \text{cm}^{-1})$	Nº aa	MM (kDa)	pI
His-RVB-1	16390	478	52	6,14
His-RVB-2	18910	501	54	6,17

3.14.5 Quantificação das proteínas recombinantes

As proteínas foram quantificadas por espectrofotometria UV / VIS. A absorbância das proteínas foi monitorada a 280 nm e a lei de Beer-Lambert foi empregada no cálculo da concentração molar (Equação 1).

Equação 1:
$$A_{280 \text{ nm}} = [\text{Proteína}] \cdot l \cdot \epsilon_{280 \text{ nm}}$$

Em que:

$A_{280 \text{ nm}}$: Absorbância da proteína a 280 nm em unidades arbitrárias

l : é o caminho óptico em centímetros (1 cm)

$\epsilon_{280 \text{ nm}}$: coeficiente de extinção molar em $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ (Tabela 4).

3.14.6 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD)

Os experimentos de CD foram realizados apenas para a proteína His-RVB-2 em espectropolarímetro J-815 (JASCO) acoplado com sistema Peltier para controle de temperatura. Os espectros foram obtidos em tampão de gel filtração (pág. 40) com concentrações de proteína de 2, 5, 10 e 17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ utilizando uma cubeta circular de 0,1 cm de caminho ótico e os dados foram normalizados para elipticidade molar residual média (EMR) pela equação 2, conforme descrito por (CORREA; RAMOS, 2009)

Equação 2:
$$EMR = \frac{\theta \cdot 100 \cdot MM}{n \cdot [\text{Proteína}] \cdot l}$$

Na qual:

θ : Sinal do CD em graus

MM : massa molecular da proteína

n : número de resíduos de aminoácido da proteína em kDa

l : caminho óptico da em cm

3.14.7 Espectroscopia de fluorescência intrínseca do triptofano

Para investigar a estrutura terciária local, utilizou-se como sonda a fluorescência intrínseca do triptofano da proteína His-RVB-2. As medidas foram realizadas em um fluorímetro F4500 Hitachi em cubeta de 1 cm de caminho óptico. Para determinação da estrutura terciária, foi utilizado o comprimento de onda de excitação de 280 nm e a emissão foi acompanhada em um espectro de 295 a 420 nm. Os ensaios foram realizados em tampão de gel filtração, temperatura ambiente e foram utilizadas concentrações de proteínas de 2, 5, 10 e 17 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

Os resultados foram analisados pelo comprimento de onda máximo de emissão ($\lambda_{\text{máx}}$) e centro de massa espectral ($\langle \lambda \rangle$) pela equação 3:

Equação 3:
$$\langle \lambda \rangle = \frac{\sum (I_f \cdot \lambda)}{\sum I_f}$$

Em que:

$\langle \lambda \rangle$: centro de massa espectral

λ : Comprimento de onda

I_f : Intensidade de fluorescência

3.14.8 Cromatografia de exclusão molecular analítica

A cromatografia de exclusão molecular analítica (CEMa) foi realizada em coluna Superdex 200 GL 10/30 (GE Healthcare Lifesciences) acoplada a um AKTA Prime Plus (GE Healthcare Lifesciences) e equilibrada em tampão para gel filtração. Para determinação da massa molecular aparente (kDa_{app}) e do raio de Stokes (R_s) da proteína His-RVB-2, uma mistura de padrões proteicos constituídos por apoferritina (480 kDa / R_s 67 Å), γ -globulina (160 kDa / R_s 48 Å), BSA (67 kDa / R_s 36 Å), ovoalbumina (45 kDa / R_s 29 Å), anidrase carbônica (30 kDa / R_s 24 Å), e citocromo C (12 kDa / R_s 14 Å) (Sigma-Aldrich) foram utilizados. Para determinação do R_s utilizou-se os valores correspondentes ao volume de eluição das proteínas padrões e da proteína His-RVB-2, para tanto calculou-se o coeficiente de partição (K_{AV}):

Equação 4:
$$K_{AV} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Na qual:

K_{AV} = coeficiente de partição;

V_e = Volume de eluição;

V_0 = Volume da fase móvel

V_t = Volume de coluna total

Para cálculo do R_s experimental da proteína His-RVB-2, foram plotados os valores de R_s das proteínas padrões em função do $\text{Log}K_{AV}^{1/2}$, realizando-se um ajuste linear da curva obtida de forma que:

Equação 5:
$$R_s = a \cdot \left(-\text{Log}K_{AV}^{1/2} \right) + b,$$

Na qual:

K_{AV} = coeficiente de partição;

R_s = Raio de Stokes;

a = Coeficiente angular

b = Coeficiente linear

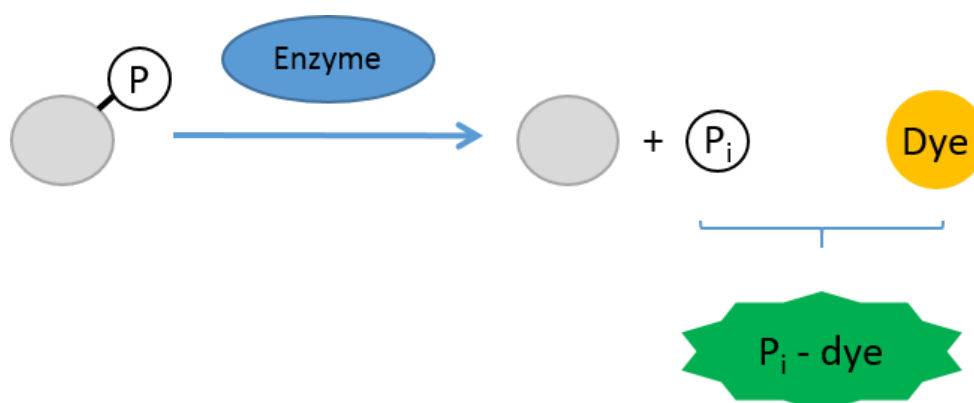
Assim, a razão friccional (f/f_0) foi estimada pela razão do raio de Stokes experimental (R_s) e o raio de uma esfera de mesma massa (LEBOWITZ; LEWIS; SCHUCK, 2009), calculado por meio da sequência de aminoácidos da proteína pelo programa Sednterp. A razão friccional permite avaliar a assimetria da proteína, uma vez que quanto maior que 1 for o valor encontrado, mais assimétrica e alongada é a proteína.

3.14.9 Ensaio de atividade ATPásica

A atividade ATPásica da proteína recombinante His-RVB-2 foi investigada pelo monitoramento da concentração de P_i (fosfato inorgânico) liberado pela hidrólise do ATP. A quantificação de P_i foi realizada em uma placa de 96 poços e a leitura da absorbância da placa no Varioskan® LUX (*Thermo Scientific*) em 650 nm. Para a reação, pipetou-se em duas triplicatas volumes fixos de proteína His-RVB-2, de tal forma que se obtivesse uma concentração final de proteína de 5 e 10 μM para cada triplicata. Adicionou-se cloreto de magnésio (MgCl_2) suficiente para se obter uma

concentração final de 2 mmol L⁻¹ em cada poço. Pipetou-se então uma curva crescente em concentração de ATP e um controle foi realizado, também em triplicata, nos mesmos moldes da reação, na ausência da proteína His-RVB-2. Incubou-se a placa em estufa à 30 °C por 60 min, sob pequena agitação. A medida de fosfato liberado na hidrólise do ATP foi comparada com uma curva fosfato construída em duplicata pela utilização do kit *PiColorLock* (Innova Biosciences). A leitura baseia-se na reação colorimétrica entre o cromóforo verde de malaquita (alaranjado) e o P_i liberado pela hidrólise do ATP, formando um complexo de cor verde (Figura 11). A atividade foi medida em tampão de gel filtração.

Figura 11 – Princípio do método *PiColorLock*TM



FONTE: Inova Biosciences

3.15 Ensaio utilizando o dímero RVB-1/RVB-2. Caracterização biofísica do complexo RVB-1/2

O vetor pRSFduet-1 (Figura 12) permite co-expressar as duas proteínas recombinantes em uma mesma cepa de bactéria produtora. O objetivo principal de utilizar o vetor bicistrônico é conseguir as duas proteínas juntas e, portanto, com uma maior estabilidade devido à possível interação entre ambas em solução. O vetor foi gentilmente cedido pelo laboratório da Prof^a Dr. Ana Paula Ulian Araújo, do Instituto de Física da USP de São Carlos.

Com o intuito de estudar a interação destas proteínas *in vitro*, foi realizada uma construção que permite expressar ambas as proteínas com diferentes *tags* de tal modo que a visualização poderia ser acompanhada por *Western blot*.

Para a proteína RVB-2, optamos pela fusão na região N-terminal da cauda poli-His e para a proteína RVB-1, foi realizada a clonagem de um cDNA proveniente da linhagem de *rvb-1-v5* Hyg⁺ de *N. crassa*. Dessa forma, a expressão de ambas proteínas poderia ser verificada por diferentes anticorpos comerciais contra esses diferentes *tags*.

3.15.1 Amplificação e clonagem dos cDNAs *rvb-1-v5* e *rvb-2* no vetor pRSFduet-1. Expressão das proteínas RVB-1-V5 e His-RVB-2

O cDNA *rvb-2* foi amplificado, através de PCR, utilizando oligonucleotídeos desenhados com sítios para as enzimas BamHI/NotI (Tabela 2) que permite clonar no MCS1 do vetor pRSFduet-1. Como molde para a síntese do PCR, foi utilizada a construção plasmidial pET28a-*rvb-2*, e a temperatura de anelamento dos primers a 60°C. Para o cDNA *rvb-1-v5*, a amplificação foi realizada utilizando oligonucleotídeos desenhados para o início da ORF contendo o sítio para endonuclease de restrição NdeI e outro para o fim, no qual foi adicionado um *stop* códon e sítio para KpnI (Tabela 2). A reação foi realizada utilizando como molde uma coleção de cDNA previamente preparada da linhagem *rvb-1-v5* (Hyg⁺). Os cDNAs amplificados e purificados (como descrito no tópico 3.11.1) foram clonados no vetor pJET *blunt* 1.2 (Invitrogen), dando origem às construções pJET-*rvb-1-v5* e pJET-*rvb-2*.

Primeiramente, a construção pJET-*rvb-2* foi digerida com as endonucleases de restrição BamHI/NotI, o inserto foi purificado e subclonado no vetor pRSFduet-1, previamente digerido com as mesmas enzimas, dando origem à construção pRSFduet-*His-rvb-2*. A mesma foi transformada na linhagem produtora *Rosetta* (DE3) pLys e a proteína induzida nas condições previamente descritas. A produção foi confirmada por SDS-PAGE e *Western blot* com anticorpo anti-His (item 3.13). Após confirmação, o inserto correspondente ao cDNA *rvb-1-v5* foi inserido no MCS2. Para isto, a construção pJET-*rvb-1-v5* foi digerida com as endonucleases de restrição NdeI/KpnI, o inserto foi purificado e subclonado na construção pRSFduet-*His-rvb-2*, previamente digerida com as mesmas enzimas, dando origem à construção pRSFduet-*His-rvb-2* *rvb-1-v5*. A mesma foi transformada na linhagem

[illegible]

O vetor permite expressar duas proteínas recombinantes por meio da clonagem dos cDNAs em seus dois sítios de clonagem múltipla (MCS). O MCS1 permite produzir a proteína fusionada à His-Tag para identificação e purificação, ao passo em que o MCS2 permite expressar a proteína em fusão ao S-tag. Nesse trabalho apenas o His-Tag foi utilizado.

FONTE: Invitrogen

3.15.2 Ensaio de solubilidade das proteínas RVB-1/2 recombinantes

Para verificar se as proteínas recombinantes RVB-1-V5 e His-RVB-2 eram solúveis, um ensaio de solubilidade foi realizado com a linhagem de *E. coli* Rosetta (DE3) pLys transformada com a construção pRSFduet-His-rvb-2 / rvb-1-v5, seguindo a metodologia já descrita (item 3.14.1).

3.15.3 Confirmação da produção do complexo RVB-1/2 por *pulldown*

Para verificar se as proteínas His-RVB-2 e RVB-1-V5 formam complexos estáveis em solução, um ensaio de *pulldown* foi realizado. Para isso, foi realizada uma purificação do extrato celular solúvel obtido por cromatografia de afinidade ao Ni^{2+} , na qual apenas a proteína His-RVB-2 seria capaz de se ligar pela presença His-tag. A metodologia utilizada foi a mesma já previamente descrita (3.14.3). Após esta etapa, as proteínas foram dialisadas em membrana de celulose (Sigma) contra tampão de Gel Filtração por 16 h / 4°C, para verificar sua estabilidade. Após esta etapa, o dialisado foi centrifugado 16 000 x *g* e as proteínas foram submetidas a cromatografia de exclusão molecular preparativa, realizada em coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE *Helthcare Lifesciences*) acoplada ao sistema FPLC, utilizando o equipamento ÄKTA Prime plus (GE *Helthcare Lifesciences*), previamente equilibrada com tampão de gel filtração. As proteínas foram eluídas em mesmo tampão, sendo que um banho térmico de circulação foi acoplado para manter a temperatura constante de 4°C. Para acompanhar a eficácia do processo, todos os passos de expressão e purificação foram verificados por SDS-PAGE, seguidos de *western blot*.

3.15.4 Quantificação das proteínas recombinantes

Como a proteína RVB-1 não possui triptofanos, para quantificação do complexo foi escolhido o método colorimétrico de Lowry modificado (HARTREE, 1972).

3.15.5 Espectropolarimetria de dicroísmo circular (CD) do complexo RVB-1/2

Os experimentos de CD foram realizados com o complexo RVB-1/2 seguindo a mesma metodologia já previamente descrita (vide tópico 3.14.6), porém a análise foi realizada apenas na concentração de 10 μM de proteínas totais (5 μM RVB-1-V5 + 5 μM His-RVB-2). Para as análises realizadas com ATP e ADP, foi utilizado o tampão para gel filtração acrescido de 2 mmol L^{-1} de ATP ou ADP como branco e a amostra de proteína foi encubada previamente com ATP ou ADP por 1 h a temperatura ambiente.

3.15.6 Cromatografia de exclusão molecular analítica do complexo RVB-1/2 na presença de ATP e ADP

A CEMa foi realizada com 10 μM de proteínas analisadas na forma APO (sem ATP / ADP) e na presença de ATP e ADP numa concentração mínima de 1 mmol L^{-1} , em coluna Superdex 200 GL 10/30 acoplada a um AKTA Prime Plus e equilibrada em tampão para gel filtração (acrescidos ou não de ATP ou ADP) a metodologia foi realizada conforme descrito no tópico 3.14.8.

3.15.7 Atividade ATPásica do complexo RVB-1/2

A atividade ATPásica do complexo formado entre as proteínas recombinantes His-RVB-2 e RVB-1-V5 foi investigada pelo monitoramento da concentração de P_i (Fosfato inorgânico) liberado pela hidrólise do ATP, pela mesma metodologia empregada anteriormente. A concentração de proteína testada foi de 1 e 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de proteínas totais.

3.16 Ensaios de “Electrophoretic Mobility Shift Assay” – EMSA

Para verificar se as proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2, bem como o complexo His-RVB-2/RVB-1-V5, ligam a DNA dupla fita, foram realizados um ensaio de deslocamento em gel de agarose, seguindo o procedimento descrito por HELLMAN e FRIED (2007) com algumas modificações, no qual quantidades crescentes em $\mu\text{mol L}^{-1}$ do complexo recombinante foi incubado com uma sequência

de DNA dupla fita por 1 h / 30°C em tampão de ligação (43 mmol L⁻¹ de Tris-HCl pH 7.5, 115 mmol L⁻¹ de KCl, 5 mmol L⁻¹ de MgCl₂, 10 µg / mL de BSA, 5% glicerol, acrescido de 5 mmol L⁻¹ de NaF, 1 mmol L⁻¹ de PMSF, 1 mmol L⁻¹ de benzamidina, 2 mmol L⁻¹ de TLCK, 1 µg/mL de aprotinina e 1 µg/mL de pepstatina A). O fragmento de DNA utilizado foi uma sequência dupla fita de 156 bp contendo o *core* da sequência STRE1 (5'-tcCCCCTtg-3'), chamado neste trabalho de STRE1. Para verificar se a ligação é dependente de STRE, outro fragmento de DNA de 156 bp foi amplificado, mas contendo o *core* STRE1 mutado (5'-tcAAAAGtg-3'), chamado neste trabalho de mSTRE1 (FREITAS et al., 2016). As amostras foram aplicadas em gel de agarose 3% em tampão TBE 0,5x (diluído de uma solução 10x com 890 mmol L⁻¹ de Tris-borato pH 8, acrescido de 20 mmol L⁻¹ de EDTA) com brometo de etídio (5 µg/mL) e corrida a 20 V por aproximadamente 12 h no mesmo tampão. Para os testes na presença de ATP, foi adicionado à reação de ligação uma quantidade suficiente para uma concentração final de 1 mmol L⁻¹.

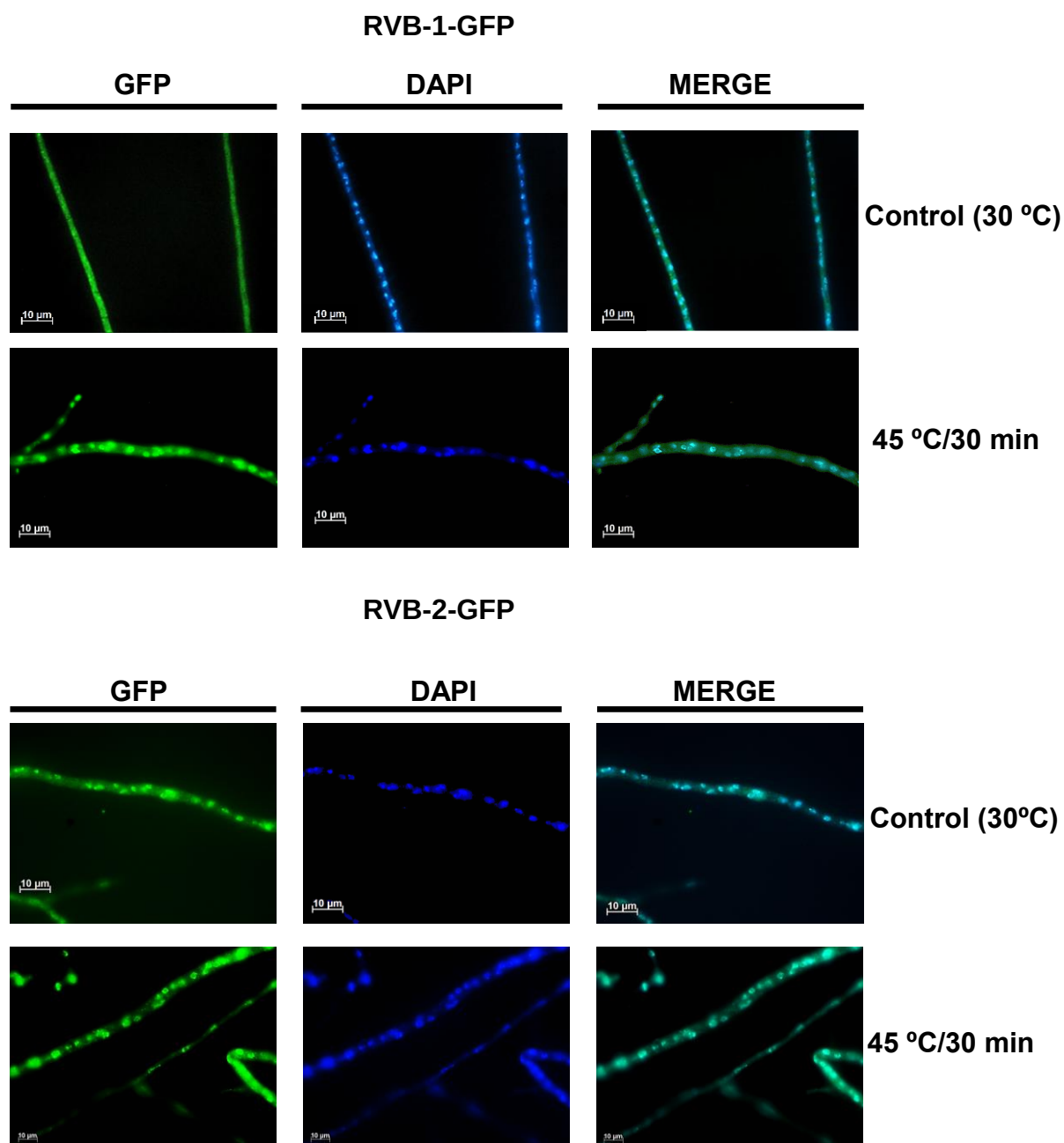
Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios de localização celular das proteínas RVB-1 e RVB-2 em *N. crassa* durante choque térmico.

Os experimentos de localização subcelular das proteínas RVB-1 e RVB-2 foram iniciados durante a realização da Iniciação Científica e foram confirmados no presente trabalho. As análises foram realizadas sob estresse térmico devido ao fato de que a proteína RVB-1 foi identificada inicialmente como uma das proteínas capazes de ligar STRE na mesma condição experimental (FREITAS et al., 2008). Os resultados obtidos mostraram que a proteína RVB-1-sfGFP encontra-se predominantemente no citoplasma na temperatura de 30°C, embora uma pequena parcela também pode ser encontrada no núcleo nesta mesma situação, quando comparada a localização do núcleo corado com DAPI (Figura 13). O fato dela possuir localização tanto no núcleo como no citoplasma em condições fisiológicas, colaboram com os resultados encontrados na literatura de que estas proteínas são requeridas para participar de diferentes complexos proteicos. Porém, nas hifas expostas a 45°C por 30 minutos, percebemos uma mudança significativa na localização desta proteína, passando a apresentar uma localização predominantemente nuclear. Um resultado diferente pode ser observado para a célula expressando a proteína fluorescente RVB-2-sfGFP, isto é, foi observado para a temperatura de 30°C que a proteína RVB-2 encontra-se predominantemente no núcleo da célula e permanece no núcleo após a célula ser submetida ao aumento de temperatura (figura 13). Os resultados obtidos sugerem fortemente que ambas as proteínas são requeridas no núcleo na situação de estresse térmico, corroborando com a literatura que aborda um importante papel para as mesmas em eventos como regulação da expressão genica e remodelagem de cromatina, ambos os eventos são importantes para modular a expressão de genes responsivos a esta forma de estresse. O fato de ambas as proteínas apresentarem localização distinta no citoplasma nas condições fisiológicas podem insinuar que em *N. crassa* estas proteínas podem estar exercendo funções separadas, no entanto, quais são estas funções poderão ser investigadas futuramente.

Figura 13 - Localização subcelular das proteínas RVB-1-sfGFP e RVB-2-sfGFP durante choque térmico.



Conídios das linhagens complementadas foram inoculados em meio VM e após 10 h / 30°C foram submetidos a um aumento de temperatura de 45°C durante 30 min. A localização subcelular das proteínas de fusão foram determinadas por microscopia de fluorescência.

FONTE: Autoria própria.

4.2 Construção de uma linhagem de *N. crassa* expressando RVB-1-V5 e RVB-2-sfGFP

Com o intuito de estudar a interação entre as proteínas RVB-1 e RVB-2 *in vivo*, foi realizada uma construção de uma linhagem do fungo que permite co-expressar ambas as proteínas com diferentes *tags*, de tal forma que a interação proteína-proteína possa ser monitorada por *Western Blot*. Para isso, a linhagem RVB-1-V5 (Hyg^R) foi cruzada com a WT2489 (A, *his-3*) de tal forma que obtivemos segregantes que puderam ser selecionados como sendo resistentes a higromicina (característica que garante a linhagem possuir o gene *rvb-1* fusionado a sequência nucleotídica que codifica o *tag* V5) e também ser *his3*, característica esta que faz com a linhagem possua mutações neste gene que impossibilita a síntese da histidinol desidrogenase, enzima essencial da via metabólica do aminoácido histidina. Dessa maneira, a linhagem necessita que seja acionado histidina ao meio de cultura.

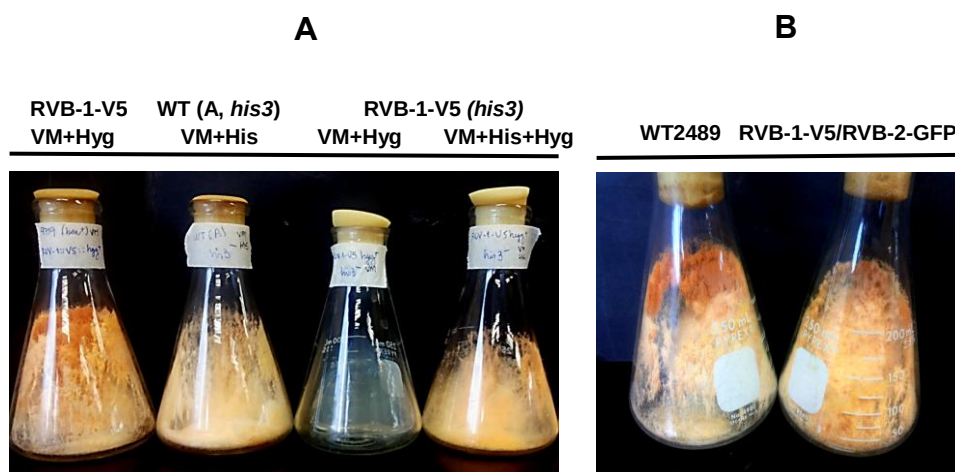
Esta linhagem foi denominada RVB-1-V5 (*his-3*, *hph*⁺). A linhagem obtida foi analisada fenotipicamente (Figura 14A) e se mostrou semelhante à linhagem selvagem, quando a sua capacidade de crescimento em meio sólido, aspecto físico das hifas sob o microscópio ótico e também a habilidade em produzir conídios e estimular a produção de carotenoides quando expostas a luz.

Uma suspensão de 10⁸ de conídios frescos da linhagem selecionada RVB-1-V5 foram transformadas com o DNA plasmidial pTSL91A-pNat-*rvb-2*, o qual permite a integração no locus *his3* e complementação da marca de auxotrofia para histidina (CASE, 1964), com a sequência do gene *rvb-2-sfgfp*, sob controle do promotor nativo *rvb-2*. Um transformante foi selecionado e seus conídios inoculados em garrafas contendo meio VM 1x acrescido de ágar 2%, deixados 3 dias a 30°C no escuro e mais 7 dias na presença de luz para estimular a conidiação (Figura 14B).

A linhagem também foi avaliada fenotipicamente e não apresentou diferenças quando comparada à linhagem selvagem, indicando que as mudanças no genótipo não alteraram suas características de crescimento e conidiação. A complementação da marca de auxotrofia também foi confirmada pelo crescimento da linhagem na ausência de histidina, o que garante que a construção plasmidial foi corretamente integrada no genoma. Porém, para confirmar a presença da proteína de fusão RVB-2-sfGFP, conídios da linhagem selecionada foram submetidos a uma análise de

microscopia de fluorescência que mostrou, assim como os resultados anteriores, que a proteína apresentava localização predominantemente nuclear, quando comparada a localização do núcleo corado com DAPI (figura 15).

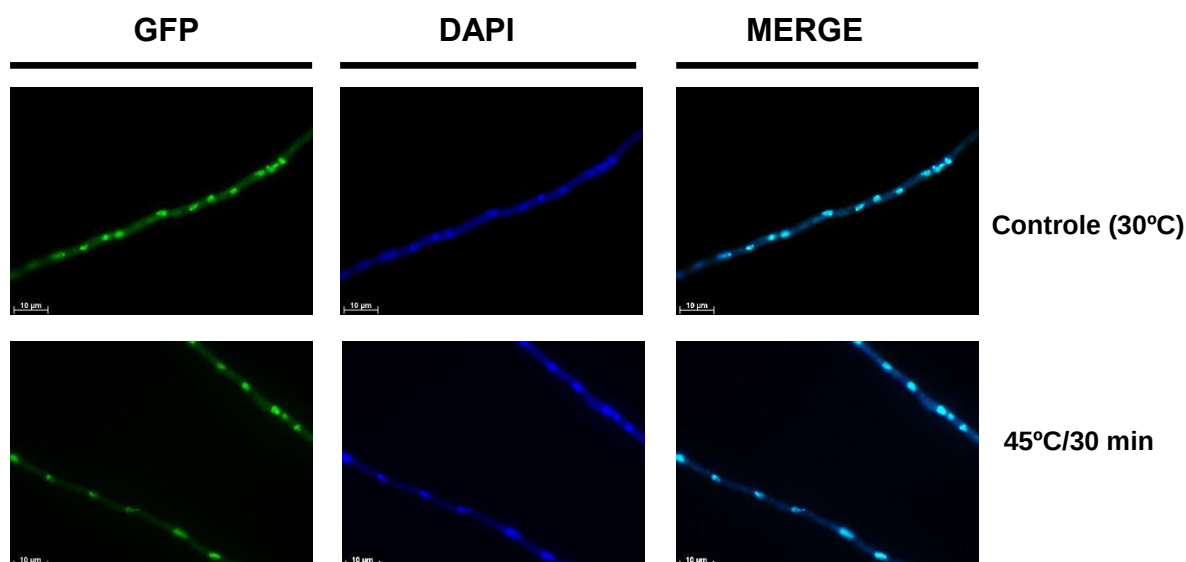
Figura 14 - Análise fenotípica da linhagem de *N. crassa* expressando RVB-1-V5 e RVB-2-sfGFP.



A. Os segregantes foram obtidos por cruzamento entre a linhagem RVB-1-V5 (*a*, *hph*⁺) e WT2489 (*A* *his3*). A linhagem RVB-1-V5 (*his3*) foi selecionada pela resistência à higromicina e auxotrofia para histidina. **B.** Análise fenotípica da linhagem complementada RVB-1-V5/RVB-2-sfGFP.

FONTE: Autoria própria.

Figura 15 - Localização subcelular da proteína RVB-2-sfGFP durante choque térmico na linhagem RVB-1-V5/RVB-2-sfGFP.



Conídios da linhagem foram inoculados em meio VM e após 10 h / 30°C o micélio foi submetido a um aumento de temperatura de 45°C durante 30 min. A localização subcelular da proteína de fusão RVB-2-sfGFP foi determinada por microscopia de fluorescência.

FONTE: Autoria própria.

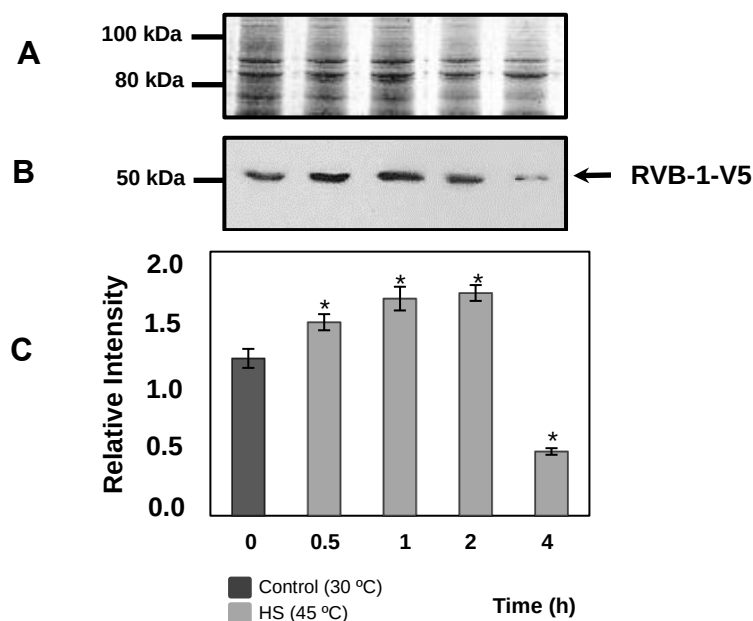
4.3 Análise da expressão das proteínas RVB-1-V5 e RVB-2-GFP em *N. crassa* durante estresse térmico

Conídios da linhagem expressando as proteínas RVB-1-V5 e RVB-2-sfGFP sob controle de seus promotores nativos foram utilizados em experimentos de estresse térmico e submetidas a uma extração de proteínas totais.

Para a análise da expressão da proteína RVB-1-V5, ensaios de *Western blot* foram realizados com anticorpo primário anti-V5. As bandas foram quantificadas pelo *Software ImageJ*. Para este experimento, foram realizadas triplicatas biológicas, sendo que cada uma delas foram lidas pelo *Software* pelo menos 10 x. Como é possível observar na figura 16, quando comparado com o controle a 30°C, a expressão da proteína aumenta significativamente ($p > 0,01$) após 30 min, 1 h e 2 h de choque térmico. Após 4 h de estresse, a expressão da proteína cai drasticamente, muito provavelmente devido ao tempo de exposição à temperatura de 45°C, porém nenhum ensaio de viabilidade celular do micélio foi realizado.

Para a análise da expressão da proteína RVB-2-sfGFP, o mesmo ensaio de *Western blot* foi realizado, mas utilizando anticorpo primário anti-GFP e secundário conjugado à peroxidase. Porém, como é possível observar na figura 17, a hibridização não ficou satisfatória, indicando que o anticorpo anti-GFP não é um bom anticorpo para proteínas de *N. crassa*. Porém, o resultado sugere que a expressão da proteína se manteve estável mesmo após 4 h de choque térmico e parece estar aumentada nesta mesma condição o que pode indicar que, assim como sua parceira RVB-1, a proteína RVB-2 também pode estar envolvida na resposta a estresse térmico em *N. crassa*. Para podermos ter um resultado mais preciso, uma linhagem expressando a proteína RVB-2-V5 está atualmente sendo construída em nosso laboratório.

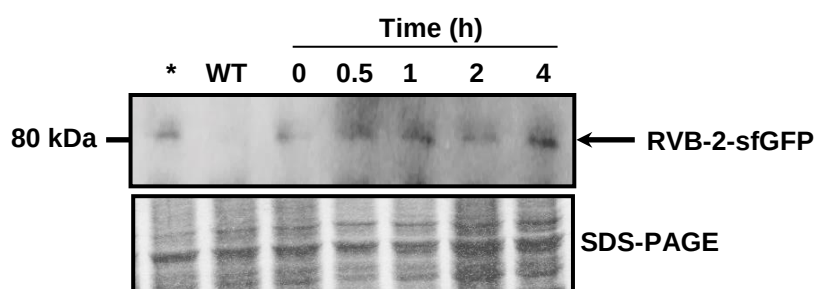
Figura 16 - Análise por *Western blot* da proteína RVB-1-V5 durante choque térmico.



Foi analisada a expressão da proteína a 30°C (0) e 30 min, 1 h, 2 h, 4 h após choque térmico (45°C). **(A)** gel SDS-PAGE 10% corado com Coomassie Brilliant Blue, **(B)**, *Western blot*, utilizando anticorpo anti-V5, **(C)** análise densitométrica das bandas de hibridização em relação a uma banda no gel corado. *diferenças significativas $p > 0,01$.

FONTE: Autoria própria.

Figura 17 - Análise por *Western blot* da expressão da proteína RVB-2-sfGFP durante choque térmico.



Foi analisada a expressão da proteína 30°C (0) e 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h após choque térmico (45°C). O gel de SDS-PAGE foi corado com Coomassie Brilliant Blue e usado como controle de *loading*.

* Extrato total da linhagem expressando apenas a proteína RVB-2-GFP usada como controle.

FONTE: Autoria própria.

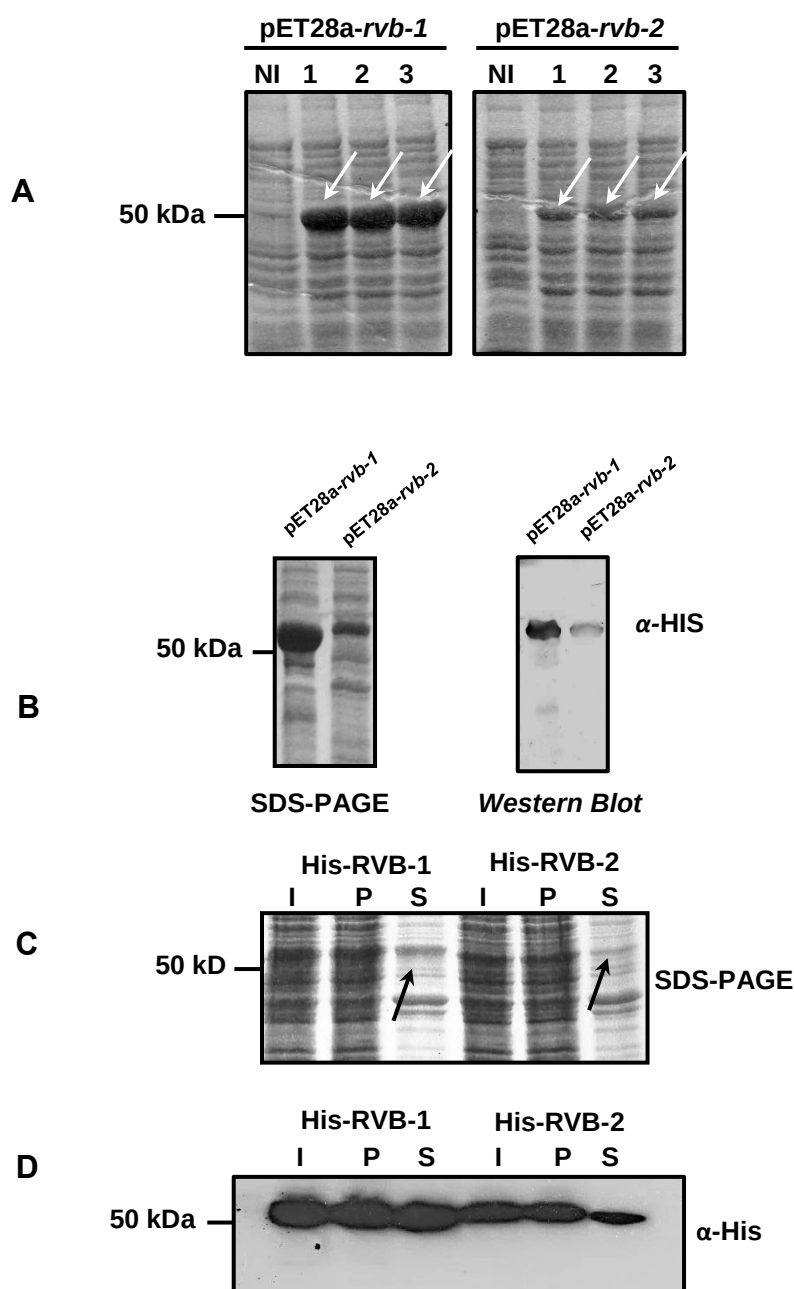
4.4 Produção das proteínas RVB-1 e RVB-2 recombinantes em *E. coli*. Ensaio utilizando o vetor pET28a

Com o intuito de obter as proteínas RVB-1 e RVB-2 na forma recombinante para futuros ensaios funcionais e estruturais, foram realizadas construções com os cDNAs de ambas as proteínas clonados no vetor de expressão pET28a (trabalhos anteriores), através do qual as proteínas são produzidas fusionadas na região N-terminal com uma cauda poli-His. Algumas análises previamente realizadas, indicavam que a proteína RVB-2 apresentava baixa solubilidade quando na forma recombinante, usando como linhagem produtora a *E. coli* BL21.

Nesse trabalho, foi realizado a transformação das construções plasmidiais em outra linhagem, *E. coli* Rosetta™ (DE3) pLys (Novagen) e novos ensaios de indução foram testados, a fim de verificar uma maior produção e solubilidade dessas proteínas. Três clones de cada construção foram induzidas com IPTG durante 4 h. (Figura 18A). Um clone produtor de cada construção foi utilizado para um ensaio de *Western blot* com anticorpo anti-His (Figura 18B). Como é possível observar nas figuras, nas mesmas condições de indução ambas proteínas são expressas em quantidade diferentes, sendo a proteína His-RVB-2 produzida em menor quantidade quando comparado à proteína His-RVB-1.

Para verificar se as proteínas recombinantes eram solúveis, foram realizados vários testes de indução, os quais mostraram que uma indução mais longa, a baixa temperatura, melhorava o perfil de solubilidade das proteínas. Para isso, a melhor condição foi a de 12 h / 18°C / 180 rpm. Nesta análise, pudemos observar que ambas proteínas apresentaram quantidades suficientes na porção solúvel (Figura 18C/D), quando comparado às condições analisadas anteriormente. Nessas condições, ambos os extratos podem ser utilizados em ensaios de purificação das proteínas por cromatografia de afinidade.

Figura 18 - Análise de expressão e solubilidade das proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2.



(A) Análise da expressão a partir de células *E. coli* BL21 (DE3) pLys Rosetta transformadas com as construções pET28a-RVB-1 e pET28a-RVB-2. SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Brilliant Blue (B) Análise por SDS-PAGE e *Western blot* com anticorpo anti-His dos clones selecionados. NI. Amostras não induzidas. Os números correspondem aos clones analisados. As setas indicam as proteínas produzidas. (C) Análise das frações: células após indução (I), precipitado (P) e sobrenadante (S) por SDS-PAGE 12% gel corado com Coomassie Brilliant Blue. (D) *Western blot* com anticorpo anti-His para a visualização das proteínas recombinantes His-RVB-1 e HIS-RVB-2. As setas indicam as frações solúveis das proteínas no gel de SDS-PAGE.

FONTE: Autoria própria.

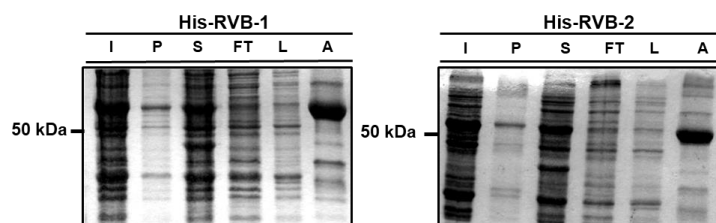
4.4.1 Ensaios de purificação das proteínas

Com intuito de caracterizar as proteínas individualmente, tanto de forma funcional, como estrutural, ensaios de purificação por cromatografia de afinidade e exclusão molecular foram realizados para ambas as proteínas. Como é possível de observar na figura 19, ambas as proteínas foram purificadas satisfatoriamente por afinidade, obtendo-se uma grande porção solúvel. Porém, a proteína His-RVB-1 mostrou-se ser muito instável após sua purificação e concentração na coluna de níquel. A proteína apresentou a característica de agregar-se em solução, o que muito provavelmente expunha seus aminoácidos hidrofóbicos e dificultava sua forma estável, precipitando dentro da coluna de cromatografia de exclusão molecular. Isso ficou evidente na figura 20, uma vez que, durante a eluição da coluna, a proteína saía majoritariamente no volume morto e as frações coletadas posteriormente, quando analisadas por SDS-PAGE, apresentavam pouca quantidade de amostra.

Uma dificuldade também foi monitorar a corrida, pois a proteína His-RVB -1 não apresenta resíduos de triptofano e, portanto, tinha baixa absorção neste comprimento de onda, quando comparado a outras proteínas que possuem resíduos deste aminoácido. No entanto, a presença de 11 tirosinas na sua estrutura, permitia acompanhar o processo cromatográfico a 280 nm. De qualquer maneira, fica evidente na figura 20A, que a proteína estava precipitando e agregando na coluna, pois quando se compara a quantidade de amostra injetada na CEMp (correspondente à fração “A” da figura 19) e as proteínas eluídas da CEMp (Figura 20A), observa-se um baixíssimo rendimento.

Ao contrário do que foi observado para a proteína His-RVB-1, a proteína His-RVB-2 foi possível de ser purificada e apresentou um pico de eluição na CEMp com um bom rendimento (Figura 20B). As frações foram coletadas, juntadas e concentradas em AMICON® Ultra centrifugal filters 30K. A amostra foi quantificada a 280 nm e utilizada para caracterização estrutural e bioquímica.

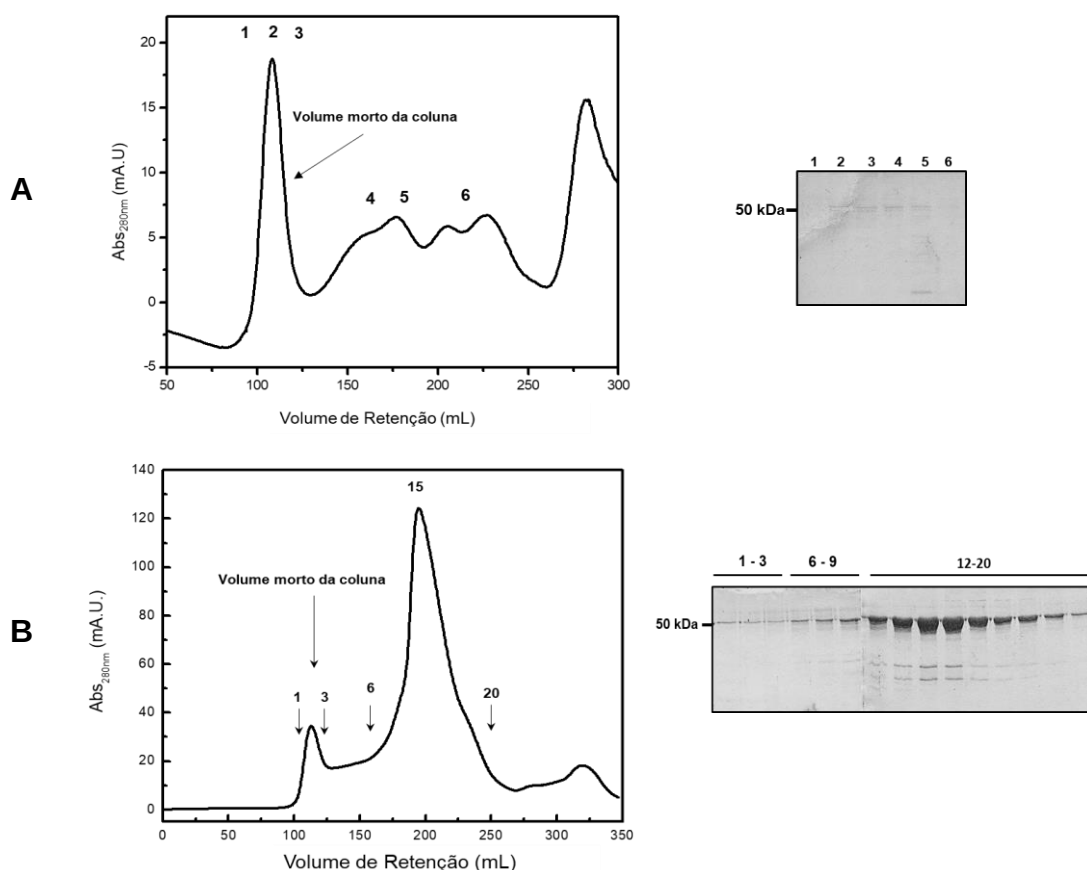
Figura 19 - Purificação das proteínas His-RVB-1 e His-RVB-2 em coluna HisTrap Chelating HP 5 MI.



Os extratos solúveis foram passados em coluna de afinidade pelo Ni^{2+} e eluídas em tampão A com 500 mmol L⁻¹ de imidazol. As frações compostas de cada etapa da purificação foram analisadas por SDS-PAGE em gel 12% corados com Coomassie Brilliant Blue. **I.** Fração induzida. **P.** Precipitado. **S.** Fração solúvel. **FT.** Flow through. **L.** Lavagem. **A.** Proteínas eluídas em tampão B.

FONTE: Autoria própria.

Figura 20 - Cromatografia de Exclusão Molecular preparativa das proteínas recombinantes.



Cromatografia de exclusão molecular preparativa realizada em coluna HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE) acoplada ao sistema FPLC ÅKTA Prime *plus* (GE), previamente equilibrada com tampão de gel filtração. **A.** CEMP da proteína His-RVB-1. **B.** CEMP da proteína His-RVB-2. As frações coletas foram analisadas por SDS-PAGE em gel 12%, corados com Coomassie Brilliant Blue e estão representadas ao lado dos gráficos. Os números e as setas indicam as frações coletadas.

FONTE: Autoria própria.

4.4.2 Espectrofotometria de Dicroísmo Circular (CD) e Fluorescência Intrínseca do triptofano

Para verificar se a proteína recombinante His-RVB-2 possuía estrutura secundária, amostras foram analisadas em diferentes concentrações por CD. Como pode ser observado na figura 21 e na tabela 5, a proteína apresentou estrutura do tipo α -hélice (característico pelos dois picos negativos em 208 e 222nm), mas também apresenta estruturas do tipo folhas beta, confirmando os dados de modelagem para esta proteína.

Além disso, a absorção se tornava menos ruidosa com o aumento da concentração, indicando que para a proteína His-RVB-2 pode ter uma oligomerização dependente de concentração. Não foi possível investigar comprimentos de onda menores do 195 nm porque o tampão utilizado necessitava de uma alta concentração de NaCl (500 mmol L⁻¹) e todas as tentativas de diminuir a quantidade de sal, resultaram em precipitação da proteína (resultados não mostrados).

A estrutura terciária foi averiguada pela Fluorescência Intrínseca do triptofano, que descreve o quão exposto está este resíduo na região em que o mesmo está localizado. Como a proteína His-RVB-2 possui apenas um resíduo de triptofano na posição de 281, o qual está localizado no domínio DII interno, os resultados estarão diretamente relacionados à exposição deste único resíduo. Os resultados mostraram que a fluorescência não alterou significativamente seu centro de massa espectral ($\langle\lambda\rangle$) com o aumento da concentração e o $\lambda_{\text{máx}}$ sofreu pequenos desvios, corroborando para que pudéssemos afirmar que as proteínas estavam estruturadas em solução e que quanto mais concentrada a amostra da proteína, melhor seria esta estruturação (Figura 23, Tabela 5).

4.4.3 Estudo do estado oligomérico

Para analisar os estados oligoméricos da proteína recombinante His-RVB-2, foram realizados géis filtrações analíticas da proteína em diferentes concentrações. Para isso, foi necessário correr padrões de peso molecular definidos, sendo estas proteínas globulares padronizadas. Com os valores de eluição dos padrões e seus respectivos valores tabelados de Massa Molecular e Raio de Stokes, foi possível

construir curvas analíticas que permitiram calcular esses parâmetros para a proteína recombinante.

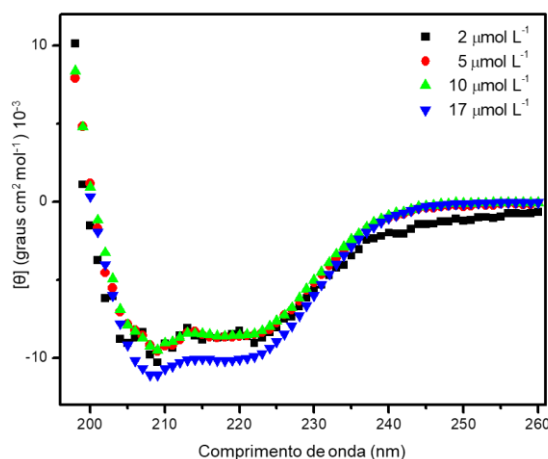
Tabela 5 – Propriedades estruturais e espectroscópicas da proteína His-RVB-2

Técnica	Propriedade		Proteína His-RVB-2	
CD	α -Helice (%)		31	
	β -Sheet (%)		12	
Fluorescência	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Ex 280 nm	2 μM	338
			5 μM	335
			10 μM	336
			17 μM	335
	$\langle\lambda\rangle$ (nm)	Ex 280 nm	2 μM	348
			5 μM	348
			10 μM	348
			17 μM	348

Na figura 24, foram plotadas as curvas de Raio de Stokes em função do volume de retenção dos padrões, bem como, LogMM (logaritmo na base 10 da MM) em função do volume de eluição dos padrões. Ao lado, observa-se o gráfico da cromatografia normalizado, com os respectivos padrões indicados. Vale lembrar que a corrida dos padrões ocorreu no mesmo tampão de gel filtração utilizado para a proteína e foram corridos no mesmo dia e sob as mesmas condições da proteína recombinante, de tal forma que, erros do equipamento pudessem ser desconsiderados. Como foi possível de ser observado na figura 24, a proteína possui majoritariamente dois estados oligoméricos sendo um em menor quantidade. O cálculo obtido da MM por meio da curva analítica mostrou que a proteína His-RVB-2 tem uma MM aparente de aproximadamente 86 kDa e um Raio de Stokes de 35 Å no pico de maior eluição (13,48 mL), com razão friccional de 1,3 para o monômero. Embora o valor de MM seja diferente do esperado, considerando a sequência de aminoácidos (54 kDa), ele pode ser justificado pelo fato desta proteína possuir pelo menos 3 domínios distintos que podem conferir à proteína uma estrutura mais alongada com relação aos padrões que são totalmente globulares, ficando menos retida na coluna. No pico de menor eluição (10,14 mL) a MM aparente foi de 454 kDa, com um raio de Stokes de 64 Å e coeficiente ficcional de 1,4. Estes dados nos permitiram concluir que a forma oligomérica da proteína His-

RVB-2 em solução é majoritariamente monomérica, entretanto uma pequena porção se organiza na forma hexamérica.

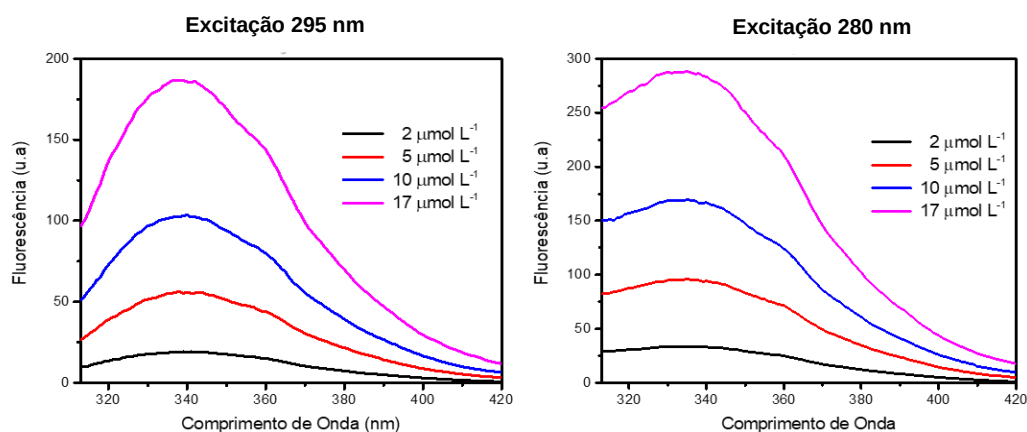
Figura 21 - Espectropolarimetria de dicroísmo molecular da proteína His-RVB-2 em diferentes concentrações



Espectros de CD da proteína recombinantes realizados em espectropolarímetro J-815 (JASCO) acoplado com sistema Peltier para controle de temperatura. Os espectros foram obtidos em tampão de gel filtração com concentrações de proteína de 2, 5, 10 e 17 μM , utilizando uma cubeta circular de 0,1 cm de caminho ótico e os dados foram normalizados para elipticidade molar residual média (EMR) da proteína.

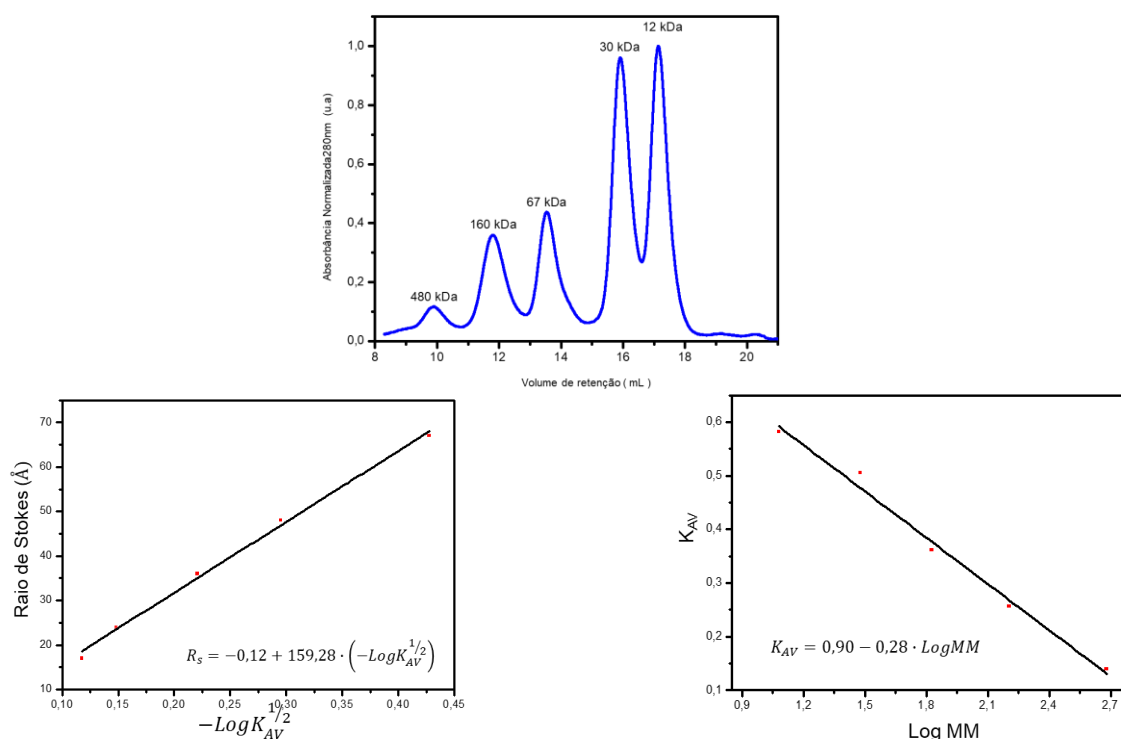
FONTE: Autoria própria.

Figura 22 - Fluorescência Intrínseca do triptofano da proteína His-RVB-2.



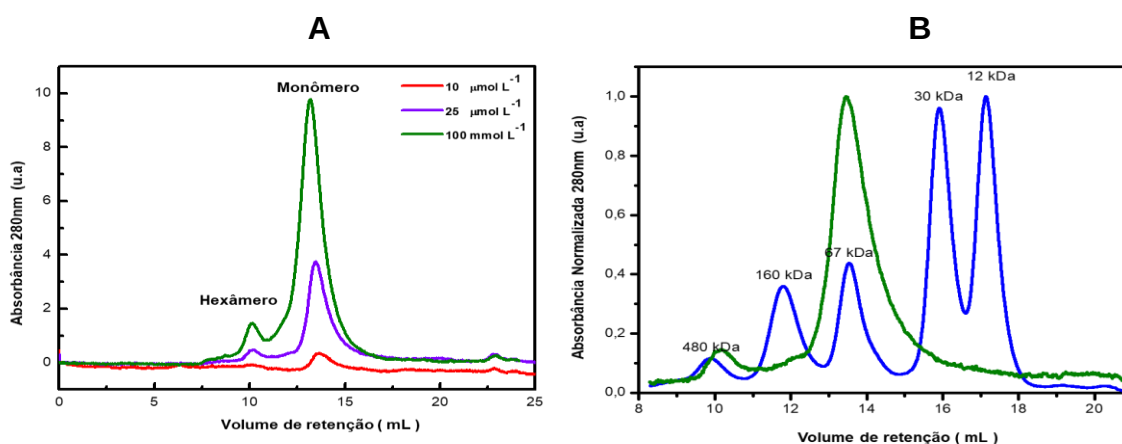
Utilizou-se como sonda a fluorescência intrínseca do triptofano da proteína His-RVB-2. As medidas foram realizadas em um fluorímetro F4500 Hitachi em cubeta de 10x2 mmol L⁻¹ de caminho óptico. Para determinação da estrutura terciária utilizou-se comprimento de onda de excitação de 280 nm e acompanhou-se a emissão em um espectro de 295 a 420 nm, os ensaios foram realizados em tampão de gel filtração, temperatura ambiente e, forma utilizadas concentrações de proteínas de de 2, 5, 10 e 17 μM .

FONTE: Autoria própria.

Figura 23 – Curvas analíticas para os cálculos hidrodinâmicos.

Para determinação da massa molecular aparente ($\text{kmol L}^{-1}_{\text{app}}$) e do raio de Stokes (R_s) da proteína His-RVB-2, uma mistura de padrões proteicos constituídos por Apoferritina (480 kDa / R_s 67 Å), γ -Globulina (160 kDa / R_s 48 Å), BSA (67 kDa / R_s 36 Å), Anidrase carbônica (30 kDa / R_s 24 Å), e Citocromo C (12 kDa / R_s 14 Å) foram utilizados.

FONTE: Autoria própria.

Figura 24 – Cromatografia de Exclusão Molecular Analítica da proteína recombinante His-RVB-2.

Os estados oligoméricos bem como a massa molecular da proteína His-RVB-2 foram determinados por CEMA em tampão de gel filtração. **A.** CEMA em diferentes concentrações de proteínas. **B.** Comparação entre a CEMA da proteína His-RVB-2 e os padrões.

FONTE: Autoria própria.

4.5 Ensaios utilizando o vetor bicistrônico pRSFduet-1

O vetor pRSFduet-1 permite co-expressar duas proteínas recombinantes em uma mesma cepa de bactéria produtora. O objetivo principal de utilizar o vetor bicistrônico é conseguir expressar duas proteínas parceiras juntas e, portanto, com uma maior estabilidade devido à possível interação entre ambas em solução. Esta seria uma maneira de caracterizar as proteínas RVB-1 e RVB-2 do fungo, uma vez que a proteína RVB-1 mostrou não ser possível de ser purificada e caracterizada. Esta linhagem também poderia ser utilizada para mostrar que ambas as proteínas interagem entre si e para isso, foi necessário produzi-las com diferentes *tags* de tal forma que elas pudessem ser identificadas separadamente por *Western blot*. As proteínas RVB-1/2 de *N. crassa* não possuem anticorpos específicos e testes anteriormente realizados com o anticorpo para as proteínas RUVBL1/2 de humanos, mostraram serem ineficazes para a identificação destas proteínas (dados não mostrados).

4.5.1 Clonagem dos cDNAs *rvb-1-v5* e *rvb-2* no vetor e análise da expressão das proteínas recombinantes

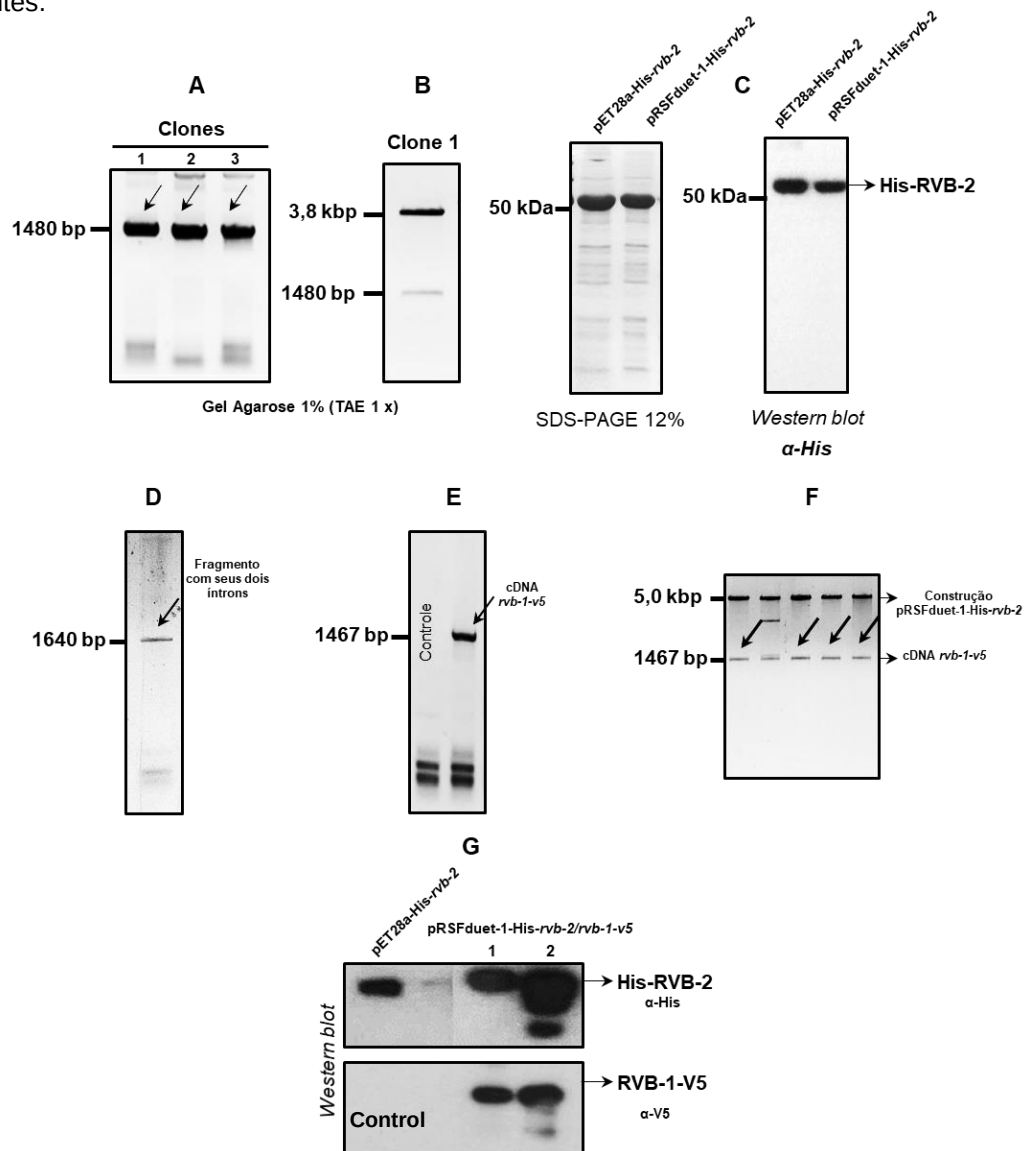
Primeiramente, o cDNA da proteína RVB-2 foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos descritos na tabela 2, contendo sítios de restrição BamHI/NotI. O fragmento foi purificado, digerido com as enzimas de restrição e clonado no MCS1 do vetor pRSFduet-1, previamente digerido com as mesmas enzimas. Os clones resultantes foram selecionados por PCR de colônia (Figura 25A), e os que apresentaram o fragmento de cDNA *rvb2* clonado, foi submetido a uma extração de DNA plasmidial e novamente foi verificado a presença do inserto por digestão com as enzimas BamHI e NotI (Figura 28B). Uma construção positiva foi denominada de pRSFduet-1-His-*ruv2* e utilizada para transformar a linhagem de *E. coli* Rosetta (DE3) pLys. Foi então feito um teste de expressão da proteína recombinante, a qual mostrou estar sendo expressa. Como controle, foi utilizado o plasmídeo pET28a-*ruv-2*, o qual expressa a proteína nas mesmas condições (Figura 25C).

Uma vez clonado o inserto *rvb-2*, foi dado início à clonagem do inserto *rvb-1-v5*. O cDNA foi obtido por RT-PCR a partir do RNA total extraído do micélio da linhagem do fungo produzindo a proteína RVB-1-V5. A ORF foi amplificada, através

de PCR utilizando um oligonucleotídeo para o início da ORF e outro no final da sequência V5 (Tabela 2). Como controles da reação, foram utilizados o RNA total tratado com DNase, para verificar a ausência de DNA genômico na amostra, e também o DNA genômico da linhagem, que deve amplificar uma sequência de aproximadamente 1650 bp correspondente ao gene contendo seus dois introns (figura 28D). O cDNA amplificado apresentou 1467 bp, tamanho correspondente ao cDNA da proteína RVB-1-V5 (459 aa da proteína, 10 x glicinas/30aa e a sequência V5 de 14 aa (Figura 25E). O cDNA foi clonado no vetor pJET blunt 1.2 (Invitrogen). O fragmento de DNA foi então digerido com as enzimas NdeI e KpnI e subclonado no vetor pRSFduet-1-His-*ruv2*, o qual também foi digerido com as mesmas enzimas de restrição.

O produto da ligação (pETduet-1-His-*rvb-2/ruv-1-V5*) foi utilizado para transformar uma cepa DH10 β de *E. coli* e os clones positivos foram confirmados por análise de restrição da extração do DNA plasmidial (figura 25F). Duas construções plasmidiais positivas foram utilizadas para transformar células competentes de *E. coli* da linhagem produtora Rosetta (DE3) pLys-S para verificar a produção de ambas as proteínas recombinantes. Após o período de indução de 12 h / 18°C / 180 rpm, as células foram coletadas, suspensas em tampão de amostra, fracionadas em duplicata por SDS-PAGE 12% e submetidas a um ensaio de *Western blot*. Uma membrana foi incubada com anticorpo anti-V5 e a outra com o anticorpo anti-His, ambas reveladas pelo ensaio de peroxidase. Como é possível observar na figura 25G, ambas proteínas foram visualizadas, indicando que as proteínas RVB-1-V5 e His-RVB-2 foram produzidas satisfatoriamente em uma mesma célula de bactéria produtora. As diferenças de expressão podem estar associadas à sensibilidade do anticorpo e o tempo de exposição do mesmo no filme radiográfico. Para verificar se as proteínas eram solúveis, um teste de solubilidade foi realizado nas mesmas condições descritas em métodos. Como pode ser observado na figura 25G (amostra 1) ambas as proteínas mostraram estar solúveis e em quantidade suficiente para dar continuidade aos processos de purificação. A especificidade do anticorpo anti-V5 contra a proteína RVB-1-V5 foi monitorada com um controle expressando a proteína His-RVB-2 pelo pET28a (Figura 28G - controle). O anticorpo mostrou ser específico para a proteína RVB-1-V5 recombinante e não ligar na proteína His-RVB-2 de forma inespecífica, indicando que de fato, temos a expressão de ambas as proteínas.

Figura 25 – Clonagem no vetor bicistrônico pRSFduet-1 e análise da expressão das proteínas recombinantes.



A. Clones testados por PCR de colônia, apresentando o fragmento *rvb-2* de aproximadamente 1480 bp. **B.** Digestão da construção plasmidial pRSFduet-1-His-*rvb-2* com as enzimas BamHI e NotI. **C.** Expressão da proteína His-RVB-2 e análise por SDS-PAGE e Western blot, mostrando a presença da proteína fusionada ao His-tag. **D.** Amplificação da sequência *rvb-1-V5* a partir do DNA genômico da linhagem RVB-1-V5, a seta indica a banda com tamanho correspondente à sequência contendo os 2 íntrons. **E.** Amplificação do cDNA de aproximadamente 1400 bp (indicado pela seta) a partir da biblioteca de cDNA amplificado por RT-PCR e um controle apresentando ausência de bandas e, portanto, ausência de DNA genômico, na biblioteca de cDNA utilizada como molde para a síntese de PCR. **F.** Digestão da extração de DNA plasmidial dos clones selecionados com as mesmas enzimas de restrição utilizadas na clonagem do inserto *rvb-1-v5* (KpnI e NdeI). As setas indicam os clones positivos. **G** Teste de expressão das proteínas recombinantes por Western blot, indicando a presença da proteína RVB-1-V5 e His-RVB-2 no extrato total (**2**) e no extrato solúvel (**1**) obtido da linhagem *Rosetta* induzida com IPTG. Os géis de agarose foram corados com brometo de etídio e os géis SDS-PAGE com Coomassie Brilliant Blue.

FONTE: Autoria própria.

Como as proteínas possuem Massas Moleculares semelhantes (52 kDa, RVB-1-V5 e 54 kDa, His-RVB-2) foi difícil separá-las por SDS-PAGE 12% corado com Coomassie Blue e os ensaios de *Western blot* mostraram ser essenciais para comprovar a produção de ambas proteínas.

4.5.2 Ensaio de *pulldown* com as proteínas recombinantes His-RVB-2 e RVB-1-V5

Os resultados apresentados acima mostraram que as proteínas foram produzidas em uma mesma célula de bactéria utilizando o vetor bicistrônico pRSFduet-1. Com o intuito de verificar se as proteínas recombinantes His-RVB-2 e RVB-1-V5 interagem e formam complexos proteicos em solução, foi realizado um ensaio de *pulldown* no qual o extrato celular da linhagem de *E. coli* Rosetta carregando a construção pRSFduet-1-*His-rvb-2/rvb-1-v5* induzida com IPTG foi passado em coluna HisTrap *Chelating* HP 5 mL, de tal forma que, a proteína His-RVB-2 pudesse ser purificada pela afinidade ao Ni^{+2} e a proteína RVB-1-V5 co-purificada pela sua possível interação com a proteína RVB-2.

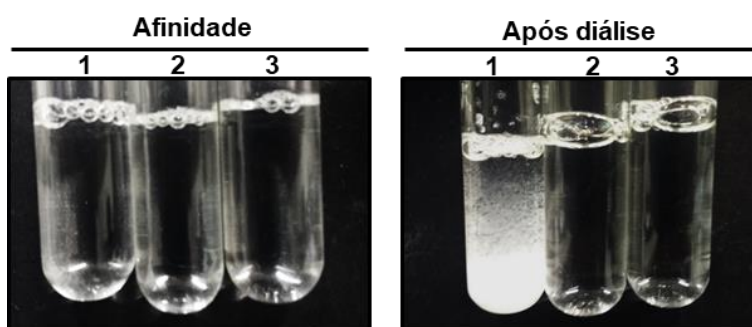
A coluna foi previamente equilibrada com tampão A, como descrito em métodos e a lavagem da coluna, após a passagem do extrato celular, foi realizada com 10 CVs de tampão A acrescido 5% de tampão B, de tal forma que pudesse diminuir qualquer interação inespecífica. Após a eluição com tampão B, a amostra foi dialisada durante a noite contra 1 L de tampão de gel filtração. O objetivo da diálise foi observar a estabilidade em solução das proteínas recombinantes. Para comparar, foram realizadas separadamente a mesma diálise com amostras obtidas após purificação nas mesmas condições utilizando as construções pET28a-*rvb-1* e pET28a-*rvb-2*. Foi observado que a amostra correspondente às duas proteínas juntas mantinha a mesma estabilidade da proteína His-RVB-2, ao passo em que a proteína His-RVB-1 precipitou durante o processo de diálise (Figura 26). Isso indica que a proteína RVB-1 recombinante, quando produzida junto com a proteína RVB-2, é estabilizada estruturalmente, mantendo-se em solução.

O próximo passo foi submeter uma amostra purificada por cromatografia de afinidade a uma cromatografia de exclusão molecular preparativa. Como é possível de ser observado na figura 27, as proteínas mostraram que interagem em solução, mantendo-se juntas em todas as etapas de purificação. É interessante ressaltar que

a análise por *Western blot* da fração que co-eluiu na coluna de gel filtração, apresentam bandas de intensidade similar (Figura 27, amostra GF), sugerindo que elas estariam em uma proporção 1 : 1. Essa informação foi importante para a quantificação das proteínas totais a ser utilizada nos ensaios bioquímicos. Devido ao fato da proteína RVB-1 não possuir triptofano, as quantificações por absorbância 280 nm apresentam erros no valor da absorvidade molar. Por esse motivo, optamos por utilizar o método colorimétrico. Outra informação interessante é que parte da proteína RVB-1-V5 foi eluída durante os processos de purificação (Figura 27, amostras FT e L), muito provavelmente por ser produzida em excesso quando comparada à proteína His-RVB-2.

Na cromatografia de exclusão molecular preparativa (Figura 28), alíquotas de todas as frações coletadas foram acompanhadas por SDS-PAGE, indicando que o processo de purificação foi bem sucedido, pois a intensidade dos picos acompanham o aparecimento do complexo purificado. Neste caso, não julgamos necessário realizar um *Western blot*, pois a alíquota eluída no pico de maior intensidade mostrou a presença de ambas as proteínas no ensaio de *pulldown*. As amostras que apresentaram as proteínas com maior pureza foram juntadas, concentradas em AMICON e utilizadas para os ensaios biofísicos.

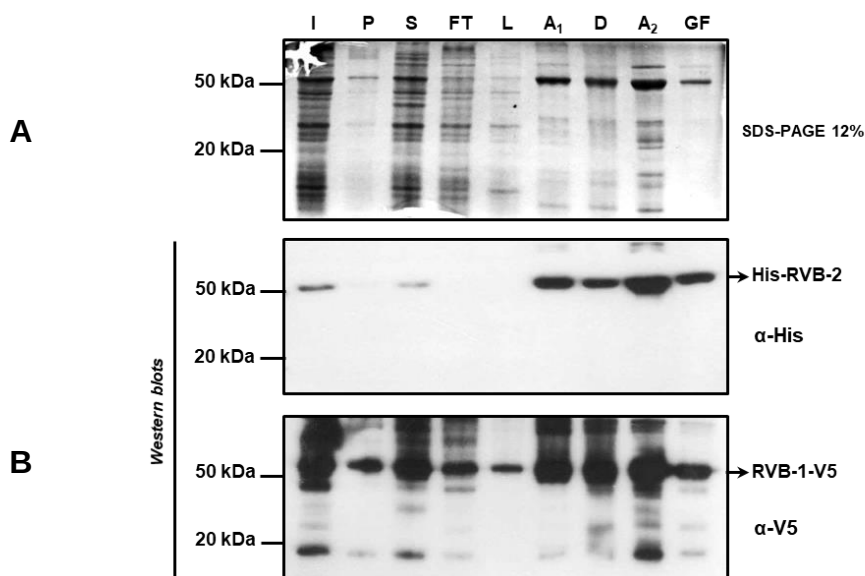
Figura 26 – Avaliação da estabilidade em solução das proteínas por diálise.



O extrato total obtido após purificação por cromatografia de afinidade das proteínas His-RVB-1, His-RVB-2 e do complexo His-RVB-1/RVB-2-V5, avaliadas após diálise realizada a 4°C. As amostras foram colocadas em tubos de ensaio de 10 mL para uma análise comparativa. **1.** His-RVB-1. **2.** His-RVB-2. **3.** His-RVB-2 / RVB-1-V5

FONTE: Autoria própria.

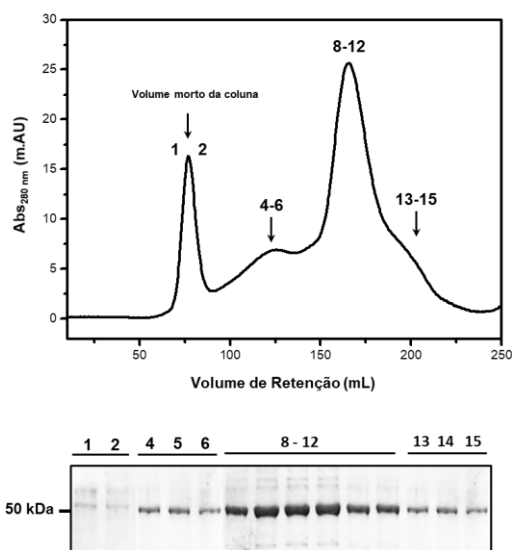
Figura 27 – Ensaio de *pull-down* com as proteínas recombinantes His-RVB-2 e RVB-1-V5.



As amostras foram purificadas por cromatografia de afinidade seguida de gel filtração. **A.** Gel SDS-PAGE corado com Coomassie Brilliant Blue. **B.** Western blot. **I.** Fração induzida. **P.** Precipitado. **S.** Fração solúvel. **FT.** Flow through. **L.** Lavagem. **A₁.** Proteínas eluídas em tampão B. **D.** Amostra dialisada. **A₂.** Amostra injetada da CEMP. **GF.** Amostra eluída no pico máximo da CEMP. **FONTE:** Autoria própria.

FONTE: Autoria própria

Figura 28 – Cromatografia de exclusão molecular preparativa das proteínas His-RVB-2 e RVB-1-V5 recombinantes.



Foi possível observar um bom perfil cromatográfico, em que as proteínas apareceram estar em diferentes estados oligoméricos. As frações coletas foram analisadas por SDS-PAGE em gel 12%, corados com Coomassie Brilliant Blue. Os números indicam as frações analisadas.

FONTE: Autoria própria.

4.5.3 Espectropolarimetria de Dicroísmo circular do complexo

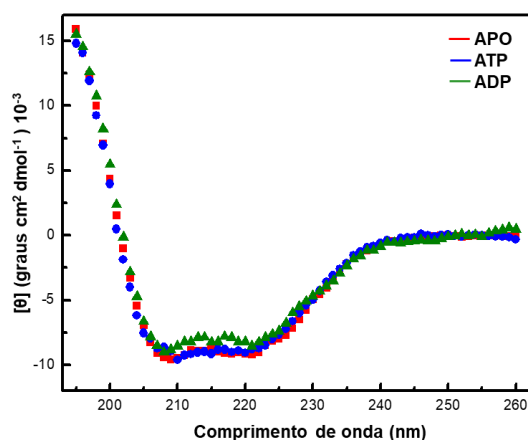
Para confirmar se as proteínas recombinantes tinham estrutura secundária, foram realizadas análises de CD do complexo em solução. As análises foram realizadas em tampão de gel filtração, e foi avaliado a influência do ATP e do ADP na estruturação do complexo. Como pode ser observado na figura 29, a presença de dois mínimos a 208 e 222 nm indicam que as proteínas apresentam majoritariamente estruturas do tipo α -hélice e os nucleotídeos ATP e ADP não influenciam na estrutura secundária da proteína.

4.5.4 Cromatografia de exclusão molecular analítica do complexo

Para estudar os estados oligoméricos do complexo His-RVB-2 / RVB-1-V5 foram realizados géis filtrações analíticas na presença e na ausência de ATP e ADP, para verificar a influência dos nucleotídeos na oligomerização do complexo.

Como pode ser observado na figura 30, a proteína possui, na ausência de qualquer nucleotídeo, majoritariamente um estado oligomérico que elui em um volume de aproximadamente 12 mL, sendo que uma pequena porção aparentemente elui em um volume ainda menor, de 10 mL. Isso é um indicativo que majoritariamente elas estão em um único estado oligomérico em solução, sendo que a coeluição foi comprovada por análises de *Western blot*, indicando que ambas as proteínas estavam presentes durante a análise. Quando ATP foi adicionado, o perfil cromatográfico foi invertido (Figura 31), mostrando que majoritariamente as proteínas apresentam volume de eluição de 10 mL, indicando que a presença do nucleotídeo induz maior oligomerização do complexo His-RVB-2 / RVB-1-V5. Por outro lado, a presença de ADP levou o complexo para um estado oligomérico ainda maior, o qual eluiu próximo à região do volume morto da coluna. Finalizando, podemos supor, com base nas corridas feitas para a proteína His-RVB-2 (discutidas no tópico 4.4.1) que: 1- aparentemente o complexo está na forma do hetero-dímero quando na ausência de nucleotídeo, 2- que ATP pode induzir a formação do hetero-hexâmero e 3- que a presença de ADP pode levar o complexo a sua forma hetero-dodecamérica. Porém, novamente, estes ensaios deverão ser validados.

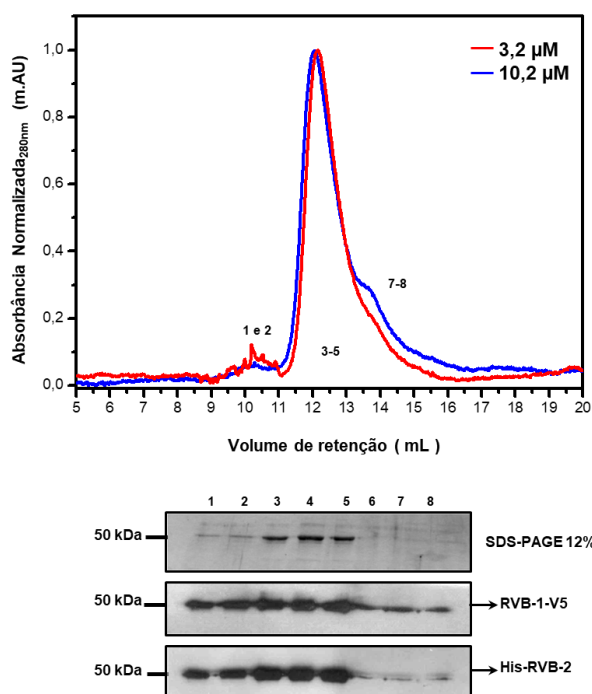
Figura 29 – Espectropolarimetria de dicroísmo circular do complexo His-RVB-2 / RVB-1-V5 recombinante.



As análises foram realizadas para verificar se as proteínas tinham estrutura secundária, e os CDs apresentaram característica de proteínas majoritariamente compostas por α -hélice, sendo que a presença de ATP e ADP não modificou o perfil espectroscópico da proteína. Os resultados foram normalizados em função da Elipsidade molar residual (EMR).

FONTE: Autoria própria.

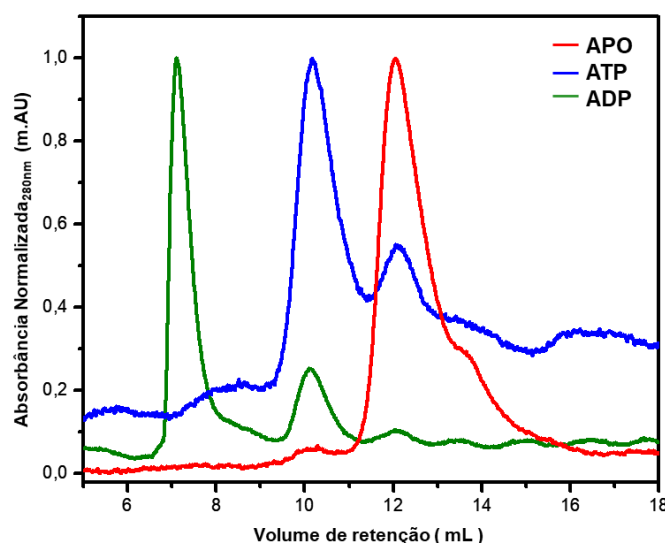
Figura 30 – Cromatografia de exclusão molecular analítica do complexo His-RVB-2 / RVB-1-V5.



As análises foram realizadas em duas concentrações diferentes e as alíquotas foram analisadas em gel SDS-PAGE e *Western blot*.

FONTE: Autoria própria.

Figura 31 – Cromatografia de exclusão molecular analítica do complexo na presença de nucleotídeos.



As análises foram realizadas na presença de ATP e ADP em tampão de gel filtração. As absorbâncias foram normalizadas.

FONTE: Autoria própria.

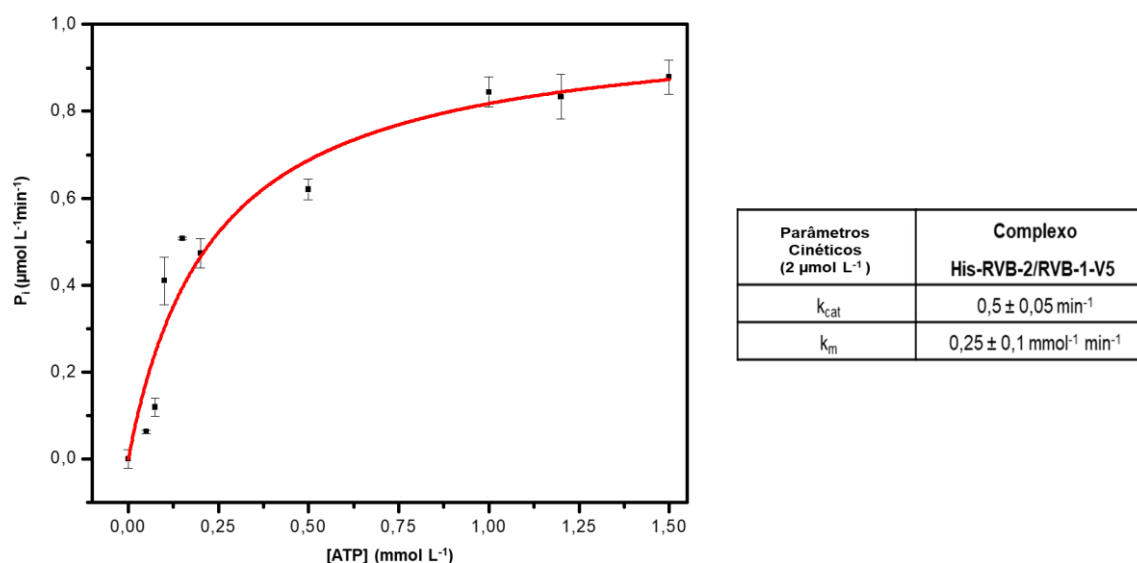
4.5.1 Atividade ATPásica do complexo

Para verificar se o complexo recombinante possui atividade ATPásica foi realizado o teste utilizando o kit *PiColorLock* (Innova Biosciences), como descrito em Materiais e Métodos. Os resultados mostraram que quando $2 \mu\text{mol L}^{-1}$ de proteínas totais foi utilizado, o complexo possui atividade ATPásica na temperatura de 30°C e um valor de constante catalítica (k_{cat}) de $0,5 \pm 0,05 \text{ min}^{-1}$ com um K_m de $0,25 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e V_{max} de $1,0 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Os valores foram obtidos através da curva de atividade enzimática feita com relação ao fosfato liberado da hidrólise do ATP em função da concentração de substrato (ATP), como pode ser observada na figura 32, com uma cinética Michaeliana. Com os dados obtidos pelo gráfico foi calculado os parâmetros cinéticos utilizando a equação de Michaelis Menten (Equação 6 e Figura 32). Como a constante catalítica tem por definição o número de moléculas de substrato liberadas por unidade de tempo, por uma molécula de enzima, seu valor foi calculado dividindo o valor da V_{max} pela concentração de proteína utilizada no experimento ($2 \mu\text{mol L}^{-1}$), como demonstra a equação 7.

Equação 6:
$$v_0 = \frac{v_{\max} \cdot [ATP]}{k_m \cdot [ATP]}$$

Equação 7:
$$k_{cat} = \frac{v_{\max}}{[proteína]}$$

Figura 32 – Atividade ATPásica do complexo His-RVB-2 / RVB-1-



Os parâmetros da cinética enzimática foram calculados a partir do gráfico, utilizando a equação de Michaelis-Menten.

FONTE: Autoria própria.

Sabe-se que as proteínas RVBs recombinantes de vários organismos modelo estudados até o momento apresentam parâmetros bioquímicos para a atividade ATPásica um tanto controversos (QUEVAL et al., 2014). Isso pode estar relacionado ao fato de que estas proteínas estão envolvidas em vários processos celulares devido a natureza oligomérica associada à sua atividade ATPásica, no entanto esta não seria a única particularidade do complexo. Contudo, para 5 μM do complexo Rvb1/2 da levedura *S. cerevisiae* recombinante em *E. coli*, Gribum et al. 2008 mostrou que estas proteínas possuem atividade ATPásica com um K_{cat} de $2,48 \text{ min}^{-1}$ e um K_m $0,27 \text{ mmol}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Podemos concluir que os parâmetros encontrados para as proteínas de *N. crassa* estão na mesma ordem, sugerindo que muito provavelmente suas funções podem ter sido conservadas mesmo se tratando de organismos tão distantes.

4.6 Eletrophoreses Mobility Shift Assay (EMSA)

Como já descrito na Introdução, a proteína RVB-1 foi anteriormente isolada como sendo uma proteína capaz de se ligar ao fragmento STRE presente no promotor do gene *gsn* durante estresse térmico. Para investigar se as proteínas recombinantes também ligam a este fragmento, ensaios de mobilidade em gel de agarose 3% foram realizados com as proteínas individualmente purificadas por afinidade. Por estarem descritas como sendo DNA helicases dependentes de ATP, fizemos o teste na presença e na ausência de ATP para verificar se a ligação é ATP-dependente. Foram visualizados complexos DNA-proteína tanto para a proteína RVB-1 como para a proteína RVB-2 de maneira independente de ATP (Figura 33), uma vez que a adição do nucleotídeo aparentemente desestabilizou o complexo DNA-proteína formado. Foi observado, durante este procedimento, que as proteínas precipitavam na presença de ATP, o que corrobora ao que foi observado nas análises de atividade ATPásica com a proteína His-RVB-2.

Neste ensaio, foi também investigado se a ligação é dependente da sequência do *motif* STRE. Para isso, utilizamos a mesma sequência de DNA com o *motif* STRE mutado. As análises mostraram que ambas as proteínas ligam no DNA dupla fita contendo STRE e também na sequência mSTRE.

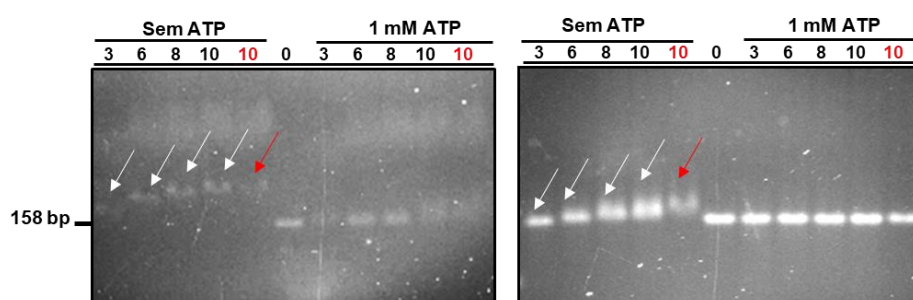
O complexo das proteínas His-RVB-2/RVB-1-V5 também foi analisado em relação à ligação a DNA e os ensaios também foram realizados na presença e na ausência de ATP. Foram visualizados complexos DNA-proteína tanto na ausência como na presença de ATP (Figura 34). Novamente, foi mostrado que o complexo liga a um fragmento de DNA independente da sequência STRE (Figura 34).

O fato das proteínas individualmente não ligarem a DNA na presença de ATP, mas ligarem quando estão juntas, pode ser um indicativo que em *N. crassa*, a atividade helicase e ATPásica das proteínas estão ligadas a formação do hetero-hexamero ou hetero-dodecâmero, e de fato, como já descrito por GRIBUN et al., 2008, as atividades tanto helicase, como ATPásica, aumentam significativamente no complexo formado por ambas proteínas, quando comparada as das proteínas sozinhas.

Na figura 34, foi possível perceber que, na presença de ATP, ocorre a formação de duas bandas, sugerindo que o complexo proteico pode estar formando complexos DNA-proteína em formas oligoméricas distintas, uma vez que esta

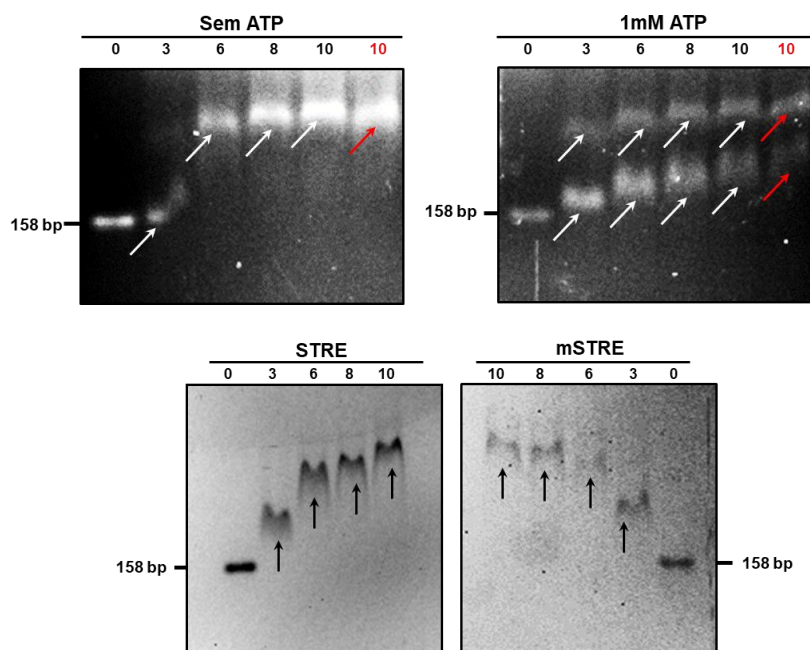
eletroforese é realizada em condições não desnaturantes. Porém, uma vez que estas proteínas também são descritas apresentar atividade DNA helicase dependentes de ATP, a banda mais baixa poderia ser correspondente à liberação de um DNA simples fita formando complexos DNA-proteína. Estas proteínas também foram descritas como sendo capazes de interagir com DNA simples e dupla fita e, até mesmo, RNA (MATIAS et al., 2006). Finalizando, é importante salientar que nenhum outro trabalho anterior mostrou a ligação destas proteínas por ensaios de retardamento em gel de maneira dependente ou não de ATP. Este resultado pode ser indicativo de que elas podem estar ligadas a grandes complexos proteicos que modulam a transcrição de genes em *N. crassa*.

Figura 33 – EMSA com as proteínas recombinantes.



A análise foi realizada em gel de agarose 3% revelado com brometo de etídio com as proteínas recombinantes His-RVB-1 e His-RVB-2 na presença de DNA dupla fita. Foi testado a dependência de ATP na ligação ao DNA. As setas brancas indicam os complexos DNA-proteína. A seta vermelha o complexo formado entre as proteínas e o fragmento mSTRE. Os números de 3 a 10 indicam a quantidade em μL de proteínas adicionadas à reação, partindo de uma concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totais (15, 30, 40, 50 μg de proteínas totais respectivamente). Foram adicionados 350 ng de DNA nas análises com a proteína His-RVB-1 e 600 ng de DNA na amostra His-RVB-2.

[FONTE: Autoria própria.

Figura 34 – EMSA com o complexo

A análise foi realizada em gel de agarose 3% e revelada com brometo de etídio, com o complexo recombinante His-RVB-2 / RVB-1-V5 na presença de DNA dupla fita. Foi testado a dependência de ATP na ligação ao DNA. As setas brancas ou pretas indicam os complexos DNA proteína. A seta vermelha o complexo formado entre as proteínas e o fragmento mSTRE. Os números de 3 a 10 indicam a quantidade em μL de proteínas adicionadas à reação, partindo de uma concentração de 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteínas totais (15, 30, 40, 50 μg de proteínas totais respectivamente). Foram adicionados 350 ng de DNA em cada reação e 1 mmol L⁻¹ de ATP, quando necessário. A. Análise com ATP. B. Análise com STRE e mSTRE.

FONTE: Autoria própria.

Principais Conclusões

5 PRINCIPAIS CONCLUSÕES

- Ambas proteínas RVB-1-GFP e RVB-2-GFP mostraram possuir localização nuclear quando o fungo foi exposto ao choque térmico;
- A expressão das proteínas RVB-1-V5 e RVB-2-GFP, foi aumentada na condição de estresse térmico (45°C), indicando fortemente que as proteínas podem participar na resposta a estresse térmico em *N. crassa*, um papel ainda não descrito para estas proteínas. Porém, as análises de expressão para a proteína RVB-2 ainda precisam ser validadas.
- As análises com as proteínas recombinantes mostraram que elas interagem entre si e são mais estáveis quando presentes na forma de complexo RVB-1/2. Possuem estrutura predominantemente em α -hélice, apresentam diferentes estados oligoméricos em solução, os quais são influenciados pela presença de nucleotídeos.
- Apresentam atividade ATPásica *in vitro* com valores de K_m $0,25 \pm 0,1 \text{ min}^{-1}$, V_{max} $1,0 \pm 0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ e K_{cat} $0,5 \pm 0,05 \text{ mmol L}^{-1} \text{ min}^{-1}$.
- Os ensaios de retardamento em gel na presença de fragmentos de DNA, mostraram que tanto as proteínas RVB-1 e RVB-2, quanto o complexo formado por ambas, ligam a DNA dupla fita, tanto na ausência como na presença de ATP, formando complexos estáveis DNA-proteína.

Referências

6 REFERÊNCIAS

- AHMED, A.; CASE, M. E.; GILES, N. H. The nature of complementation among mutants in the histidine-3 region of *Neurospora crassa*. **Brookhaven symposia in biology**, v. 17, p. 53–65, 1964.
- BAUER, A. et al. Pontin52 and Reptin52 function as antagonistic regulators of beta-catenin signalling activity. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 22, p. 6121–6130, 2000.
- BERESHCHENKO, O. et al. Pontin is essential for murine hematopoietic stem cell survival. **Haematologica**, v. 97, n. 9, p. 1291–1294, 2012.
- BOULON, S. et al. HSP90 and its R2TP/Prefoldin-like cochaperone are involved in the cytoplasmic assembly of RNA polymerase II. **Molecular cell**, v. 39, n. 6, p. 912–924, 2010.
- CAMPANELLA, JEM. Localização subcelular das proteínas RVB-1 e RVB-2 do fungo *Neurospora crassa*, duas prováveis DNA helicases dependentes de ATP. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química). Instituto de Química - UNESP. Araraquara. São Paulo. 2015
- COLOT, H. V et al. A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 27, p. 10352–7, 2006.
- CORREA, D. H. A.; RAMOS, C. H. I. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding, form and function. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 3, n. 5, p. 164–173, 2009.
- DE PAULA, R. et al. Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the gsn cDNA. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 267, n. 2, p. 241–53, 2002.
- DUNLAP, J. C. et al. Enabling a community to dissect an organism: overview of the *Neurospora* functional genomics project. **Advances in genetics**, v. 57, p. 49–96, 2007.
- EBBOLE, D.; SACHS, M. S. A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. **Fungal Genet. Newsl**, v. 37, p. 17–18, 1990.
- ESSER, K., KUENEN, R. **Genetics of fungi**. Heidelberg, Springer. p. 500. 1967.
- FORGET, D. et al. The protein interaction network of the human transcription machinery reveals a role for the conserved GTPase RPAP4/GPN1 and microtubule assembly in nuclear import and biogenesis of RNA polymerase II. **Molecular & cellular proteomics : MCP**, v. 9, n. 12, p. 2827–39, 2010.

- FREITAS, F. Z. et al. A systematic approach to identify STRE-binding proteins of the *gsn* glycogen synthase gene promoter in *Neurospora crassa*. **Proteomics**, v. 8, n. 10, p. 2052–61, 2008.
- FREITAS, F. Z. et al. The SEB-1 Transcription Factor Binds to the STRE Motif in *Neurospora crassa* and Regulates a Variety of Cellular Processes Including the Stress Response and Reserve Carbohydrate Metabolism. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 6, n. 5, p. 1327–43, 2016.
- FREITAS, F. Z.; BERTOLINI, M. C. Genomic organization of the *Neurospora crassa* *gsn* gene: possible involvement of the STRE and HSE elements in the modulation of transcription during heat shock. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 272, n. 5, p. 550–61, 2004.
- GARTNER, W. et al. The ATP-dependent helicase RUVBL1/TIP49a associates with tubulin during mitosis. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 56, n. 2, p. 79–93, 2003.
- GRIBUN, A. et al. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-Dependent DNA Helicases that Form a Heterohexameric Complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 5, p. 1320–1333, 2008.
- GRIBUN, A. et al. Yeast Rvb1 and Rvb2 are ATP-Dependent DNA Helicases that Form a Heterohexameric Complex. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 5, p. 1320–1333, 7 mar. 2008.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical biochemistry**, v. 48, n. 2, p. 422–7, 1972.
- HELLMAN, L.; FRIED, M. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) for Detecting Protein- Nucleic Acid Interactions. **Nature protocols**, v. 2, n. 8, p. 1849–1861, 2007.
- IZUMI, N.; YAMASHITA, A.; OHNO, S. Integrated regulation of PIKK-mediated stress responses by AAA+ proteins RUVBL1 and RUVBL2. **Nucleus**, v. 3, n. 1, p. 29–43, 2012.
- JEGANATHAN, A. et al. Yeast Rvb1 and Rvb2 proteins oligomerize as a conformationally variable dodecamer with low frequency. **Journal of Molecular Biology**, v. 427, n. 10, p. 1875–1886, 2015.
- JHA, S.; DUTTA, A. RVB1/RVB2: Running Rings around Molecular Biology. **Molecular Cell**, v. 34, n. 5, p. 521–533, 2009.
- JÓNSSON, Z. O. et al. Rvb1p and Rvb2p Are Essential Components of a Chromatin Remodeling Complex That Regulates Transcription of over of Yeast Genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 16279–16288, 2001.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970.

LAKOMEK, K. et al. Structural basis for dodecameric assembly states and conformational plasticity of the full-length AAA+ at pases rvb1-Rvb2. **Structure**, v. 23, n. 3, p. 483–495, 2015.

LEBOWITZ, J.; LEWIS, M. S.; SCHUCK, P. Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. **Protein Science**, v. 11, n. 9, p. 2067–2079, 2009.

MAKINO, Y. et al. TIP49, homologous to the bacterial DNA helicase RuvB, acts as an autoantigen in human. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 245, n. 3, p. 819–23, 1998.

MAO, Y.-Q.; HOURY, W. A. The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 58, 2017.

MAO, Y.-Q.; HOURY, W. A. The Role of Pontin and Reptin in Cellular Physiology and Cancer Etiology. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 4, p. 58, 24 ago. 2017.

MARTÍNEZ-PASTOR, M. T. et al. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). **The EMBO journal**, v. 15, n. 9, p. 2227–35, 1996.

MATEOS, P. A. Caracterização funcional e estrutural das proteínas RUV-1 e RUV-2 do fungo *Neurospora crassa*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Instituto de Química - UNESP. Araraquara. São Paulo. 2016

MATIAS, P. M. et al. Crystal Structure of the Human AAA + Protein RuvBL1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 50, p. 38918–38929, 2006.

MCKEEGAN, K. S.; DEBIEUX, C. M.; WATKINS, N. J. Evidence that the AAA+ Proteins TIP48 and TIP49 Bridge Interactions between 15.5K and the Related NOP56 and NOP58 Proteins during Box C/D snoRNP Biogenesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 18, p. 4971–4981, 2009.

MIR, R. A. et al. A Novel Interaction of Ecdysoneless (ECD) Protein with R2TP Complex Component RUVBL1 Is Required for the Functional Role of ECD in Cell Cycle Progression. **Molecular and cellular biology**, v. 36, n. 6, p. 886–99, 2015.

NANO, N. et al. Chaperone-like activity of the AAA + proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes Chaperone-like activity of the AAA p proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. 2013.

NANO, N.; HOURY, W. A. Chaperone-like activity of the AAA+ proteins Rvb1 and Rvb2 in the assembly of various complexes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1617, p. 20110399–20110399, 2013.

NI, H. T.; LAPORTE, D. C. Response of a yeast glycogen synthase gene to stress. **Molecular microbiology**, v. 16, n. 6, p. 1197–205, 1995.

NINOMIYA, Y. et al. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains

deficient for nonhomologous end-joining. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 33, p. 12248–53, 2004.

OHDATE, H. et al. Impairment of the DNA Binding Activity of the TATA-binding Protein Renders the Transcriptional Function of Rvb2p/Tih2p, the Yeast RuvB-like Protein, Essential for Cell Growth. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 17, p. 14647–14656, 2003.

PERKINS, D. D.; TURNER, B. C.; BARRY, E. G. Strains of *Neurospora crassa* collected from nature. **Evolution**, 30: 281-313, June 1976.

PERKINS, D. D.; DAVIS, R. H. *Neurospora* at the millennium. **Fungal genetics and biology : FG & B**, v. 31, n. 3, p. 153–67, 2000.

PUTNAM, C. D. et al. Structure and mechanism of the RuvB holliday junction branch migration motor. **Journal of Molecular Biology**, v. 311, n. 2, p. 297–310, 2001.

QIU, X. B. et al. An eukaryotic RuvB-like protein (RUVBL1) essential for growth. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 43, p. 27786–93, 1998.

QUEVAL, R. et al. Reptin and pontin oligomerization and activity are modulated through histone H3 N-terminal tail interaction. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 49, p. 33999–34012, 2014.

RADOVIC, S. et al. Functional and comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* *RVB1* and *RVB2* genes with bacterial Ruv homologues. **FEMS Yeast Research**, v. 7, n. 4, p. 527–539, 2007.

SCHULTE, U. et al. Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa* . **Journal of biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 3–13, 14 2002.

VENTEICHER, A. S. et al. Identification of ATPases Pontin and Reptin as Telomerase Components Essential for Holoenzyme Assembly. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 945–957, 2008.

ZHOU, C. Y. et al. Regulation of Rvb1 / Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin Remodeling Complex Implicates the Yeast Rvbs as Protein Assembly Chaperones Article Regulation of Rvb1 / Rvb2 by a Domain within the INO80 Chromatin Remodeling Complex Implicates the Yeast R. **CellReports**, v. 19, n. 10, p. 2033–2044, 2017.

7 APÊNDICES

A - Alinhamento de sequência das proteínas RuvBL1 de *H. sapiens* e RVB-1 de *N. crassa*

<i>Hs</i> RuvBL1	1	-MKIEEVKSTTKTORIASHSVKGGLGLDESGIAKQAASGLVGQENAREACGVIVELIKSK
<i>Nc</i> RVB-1	1	MQIASEVKGNSEDNRTAAHTHKGLGLNSQGLAEKQASGFVGQTTAREACGVVVDLIKAH
<i>Hs</i> RuvBL1	60	KMAGRAVLLAGPPGTGKTALALAI AQELGSKVPFCPMVGSEVYSTEIKKTEVLMENFRA
<i>Nc</i> RVB-1	61	KMAGRCVLLAGCPGTGKTALALAI SQELGKIPFCPI TGSEIYSTEIVKKTEVLMENFRA
<i>Hs</i> RuvBL1	120	IGLRKETKEVYEGETELTPCETENPMGGYGKTI SHVIIGLKTAKGTKQLKDPSIFES
<i>Nc</i> RVB-1	121	IGLKVPRETKEVYEGETELTP EEAENPIGGYGKTIITLLIGLKSAGQKKLRDPSIYEA
<i>Hs</i> RuvBL1	180	IQKERVEAGDVIYIEANS GAVKROGRCDTYATEFDLEAEEYVPLPKGDVHKKKEITQDVT
<i>Nc</i> RVB-1	181	IQKERVTVGDVIYIEANIGACKRVGRSDAYATEFDLEAEEYVPI PKGEVHKKKEIVQDVS
<i>Hs</i> RuvBL1	240	LHDLDVANARPQGGQDIISMMGQLMKPKKTEITDKLRGEINKVVNKYIDQGLAELVPGVL
<i>Nc</i> RVB-1	241	LHDLDVANARPQGGQDIISMMGQLMKPKMTEITDKLRSEINKVVS KYIDQGV AELVPGVL
<i>Hs</i> RuvBL1	300	FVDEVHMLDIECFITYLHRALESSIAPIVIFASNRGNCVIRGTEDITSPHGIPLDLLDRVM
<i>Nc</i> RVB-1	301	FIIDEAHMLDMECFITYLNRALESPI SPIVVLASNRGMTGIRGAEDLVAAHGIPPDFLSRL
<i>Hs</i> RuvBL1	360	IIRTMLYTPQEMKOITKIRAO TEGNISEEALNHLGEIGTKTTLRYSVQLLTPANLLAKI
<i>Nc</i> RVB-1	361	IIFPTAYDPEEIKRINKIRSTEGVKITEAALDKIAEHGVRISLRYCLQLLTPASILAKV
<i>Hs</i> RuvBL1	420	NGKDSIEKEHV EETSELFYDAKSSAKTLADQQDKYMK-
<i>Nc</i> RVB-1	421	NGENEIDVQDVAECEDLFLDARRSAALLSSEQGEFIC

B - Alinhamento de sequência das proteínas RuvBL2 de *H. sapiens* e RVB-2 de *N. crassa*

<i>Hs</i> RuvBL2	1	MATVTATTKVPEIRDVTRIERI GAHSHIRGLGLD-DALEPRQASQGMVGQLAARRAAGVV
<i>Nc</i> RVB-2	1	--MAAQVVTVGESEDLRGINLIAHSHIRGLGVADDTLEPRVASQGLVGQEKARKAAAVV
<i>Hs</i> RuvBL2	60	LEMIREGKIAGRAVLIAGQPGTGKTALAMGMAQALGPDTPFTALAGSEIFSLEMSKTEAL
<i>Nc</i> RVB-2	59	LEMIKQGIAGRAVLIAGPPSTGKTALAMGMAQSLGTDVPFTTLAASEIYSLEMSKTEAL
<i>Hs</i> RuvBL2	120	TQAFRRSIGVRIKEETEEIEGEVVEIQIDRPATGTGSKVVGKLTIKTTMETIYDIGTKMI
<i>Nc</i> RVB-2	119	TQAFRRSIGVRIKEESEIMEGEVVEIQIDRSVTGH-AKQGKLTIKTTDMEAIYDMGSKMI
<i>Hs</i> RuvBL2	180	ESITKDKVQAGDVITIDKATGKISKLRSETRARDYDAMGSQTKFVQCPDGELQKRKEVV
<i>Nc</i> RVB-2	178	DAMTKERV MAGDIISIDKSSGKIITKLGRSARSRDYDAMGVDTKFLQCPDGELQKRKEVV
<i>Hs</i> RuvBL2	240	HTVSLHEIDVINSRTQGFLALFSGDTGEIKSEVREQINAKVAEWREEGKAEIIPGVLFID
<i>Nc</i> RVB-2	238	HTVTLHEIDVINSRTQGFLALFSGDTGEIRSEIRDQINTKVAEWKEEGKAEIVPGVLFID
<i>Hs</i> RuvBL2	300	EVHMLDIESFSFINRALES DMAPVLIMATNRGITRIRGTSYQSPHGIPIDLLDRLLIVST
<i>Nc</i> RVB-2	298	EVHMLDIECFSYINRALES DAPIVIMASNRGHSKIRGTDYKSPHGLPLDFLDRLISIIINT
<i>Hs</i> RuvBL2	360	TPYSEKDTKQILIRICEEEDVEMSEDAYTVLTRIGLETSLRYAIQLITAASLVCRKRKGT
<i>Nc</i> RVB-2	358	HSYLPDELQILITIRAQEEFVDLTPDALALLTKIGAEAGLRYASNLITTSQLICAKRKAK
<i>Hs</i> RuvBL2	420	EVQVDDTKRVTSLEFLDESRS TQYMKYQDAFLFNEL-----KGETM
<i>Nc</i> RVB-2	418	QVGVEDVQRSEKLFYDPAHSVKEFVQSEKRLIGSDGVVDFRVNGGATGEPATAAGGDSM
<i>Hs</i> RuvBL2	461	DTS-
<i>Nc</i> RVB-2	478	DTSS

C - Alinhamento de sequência das proteínas Rvb-1 do fungo termófilo *C. thermophilum* e RVB-1 de *N. crassa*.

<i>Ct</i> Rvb-1	1	MVQISEVFGNTRDHR	TAAATHIKGLGLNS	SGIAEKQAAGFVGQCA	AREACGVVVDLIK	AH
<i>Nc</i> RVB-1	1	MVQISEVFGNSRDNR	TAAATHIKGLGLNS	SGIAEKQASGFVGQTT	AREACGVVVDLIK	AH
<i>Ct</i> Rvb-1	61	KMAGRGVLLAGGPGTGK	TALALAI	SQELG	TKIPFC	PITGSEIYSTEVKKTEVLMENFRA
<i>Nc</i> RVB-1	61	KMAGRGVLLAGGPGTGK	TALALAI	SQELG	TKIPFC	PITGSEIYSTEVKKTEVLMENFRA
<i>Ct</i> Rvb-1	121	IGLEVR	ETKDVYE	GEVTE	MTPEEA	ENPLGGYGKTIITLLIGLKSARGQKKRLDPSIYEA
<i>Nc</i> RVB-1	121	IGLEVR	ETKDVYE	GEVTE	MTPEEA	ENPLGGYGKTIITLLIGLKSARGQKKRLDPSIYEA
<i>Ct</i> Rvb-1	181	IQKERVQV	GDVIYIE	TNTGACKRVGR	S	DAYATEFDLEAEEYVPIPKGEVHKKKEIVQDVT
<i>Nc</i> RVB-1	181	IQKERVTV	GDVIYIE	ANTGACKRVGR	S	DAYATEFDLEAEEYVPIPKGEVHKKKEIVQDVS
<i>Ct</i> Rvb-1	241	LHDL	DVANAR	PQGGQDI	ISMMGQ	LMKPKMTEITDKLRMEINKVVQKYINQGV
<i>Nc</i> RVB-1	241	LHDL	DVANAR	PQGGQDI	ISMMGQ	LMKPKMTEITDKLRSEINKVVSKYIDQGV
<i>Ct</i> Rvb-1	301	FIDEAHMLD	IECF	TYLNKALESPI	APIV	VLASNRGIATIRGADDLKA
<i>Nc</i> RVB-1	301	FIDEAHMLD	IECF	TYLNKALESPI	APIV	VLASNRGMTGIRGAEDLVAAHGIPPDFLSRLL
<i>Ct</i> Rvb-1	361	IIP	THPYEP	PEIR	RIV	IRAO
<i>Nc</i> RVB-1	361	IIP	TTAYDP	PEIR	RIV	KIRST
<i>Ct</i> Rvb-1	421	NGRTQVD	VQDAE	AEEL	FLDARR	SANILISTGESGGLHGFIS
<i>Nc</i> RVB-1	421	NGRNEID	VQDAE	CE	FLDARR	SAAILSSEQQEF----IC

D - Alinhamento de sequência das proteínas Rvb-2 do fungo termófilo *C. Thermophilum* e RVB-2 de *N. crassa*

<i>Ct</i> Rvb-2	1	----MVQSEVFGNTRDHRATAAHTHIRGLGNSSGIAEK-QAAGFVGQCAAREACGVVVD
<i>Nc</i> RVB-2	1	MAAQVVTVGESKDLRGLNLIAAHSHIRGLGVADDTLEPRVASOGLVGQEKARKAAAVVLE
<i>Ct</i> Rvb-2	56	IIKAHKMAGRCVLIAGGPGTGKTALALAIISOELGTKIPFCPIITGSEIYSTEVKKTEVLME
<i>Nc</i> RVB-2	61	MIKQKLIAGRAVLIAGPPSTGKTALAMGMAQSLGTDVPFTTLAASEIYSLEMSKTEALTQ
<i>Ct</i> Rvb-2	116	NFRFAIGLRVRET KDVEGEVTEMTPEEAENPLGGYKGTISTLLIGLKSARGQKKLR LDP
<i>Nc</i> RVB-2	121	AFRKSIGVRIKEESEIMEGEVVEIQIDRSVTGHAKQGKL-----TIKTTDMEAIYDMGS
<i>Ct</i> Rvb-2	176	SIYEATQKERVQVGDVIYIETNIGACKRVGRSDAYATEFDLE--AEEYVPIPKGEVHKKK
<i>Nc</i> RVB-2	175	KMIDAMTKERV MAGDIISIDKSSGKITKIGRSYARSROYDAMGVDTKFLQCPDGELQKRK
<i>Ct</i> Rvb-2	234	EIVQDVTLHDIDVANARPQGGQDIISMMGQLMKPKMTEITDKLRMEINKVVQKYINQGVA
<i>Nc</i> RVB-2	235	ENVHTVTLHEIDVINSRTOGFLAIFS-----GDTGEIRSEIRDQINTKVAEWKEEGKA
<i>Ct</i> Rvb-2	294	ELIPGVLFIDEAHMLDIECFYINKALESPIAPIVVIASNRGIATIRGADDLKA AHGIPP
<i>Nc</i> RVB-2	288	EIVPGVLFIDEVHMLDIECFSYINRALES DLAPIVIMASNRGHSKIRGT-DYKSPHGLPL
<i>Ct</i> Rvb-2	354	DFLQRLIIPTHPYEPDEIRRIVRIRAQTEGVQLTDAAVDRVAEHGVRI SLRYCLOLLAP
<i>Nc</i> RVB-2	347	DFLDRLSIINTHSYTPDELROIITIRAQEEVDLTPDALALTKIGAEAGLRYASNLITT
<i>Ct</i> Rvb-2	414	ASIIARVNGRTQVDVQDAEAEELFLDARRSANILTSIGE-SGGLHGFIS-----
<i>Nc</i> RVB-2	407	SQITCAKRKAKQGVVEDVQRSFKLFYDPARSVKFFVQSEKRLIGSDGVVDFRVNGGATGE
<i>Ct</i> Rvb-2		-----
<i>Nc</i> RVB-2	467	PAATAAGGDSMDTSS